



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Identificación de factores involucrados en la regulación del sistema de dos
componentes BarA/UvrY en *Escherichia coli*.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Licenciado en Biología

PRESENTA

Vázquez Ciros Oscar Jair

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Alvarez Adrián Fernando



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular en el laboratorio 226 norte bajo la tutoría del Dr. Adrián F. Álvarez.

Agradezco al Dr. Dimitris Georgellis titular del Laboratorio 226 norte por permitirme la realización de este trabajo en su laboratorio.

Agradezco el apoyo técnico en el desarrollo de este trabajo de Tesis a la M. en C. Claudia Rodríguez Rangel.

Agradezco el apoyo económico brindado a los proyectos:

- Bacterial Plasma Membrane Microdomains: Control of Two Component System Signaling and Beyond. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) #178033.
- Control of Microbial Gene Expression by Extra-cellular Stimuli. De la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), # IN209215.
- Estudio de los microdominios membranales y su relación con los sistemas de regulación global BarA/UvrY y Csr de *Escherichia coli*. De la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), # IA203216.
- Al Sistema Nacional de Investigadores (SNI) por el apoyo de Beca de ayudante de Investigador No. De expediente: 12692

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

El presente trabajo es la culminación de una de las etapas más importantes de mi vida y a lo largo de la misma, muchas personas me han brindado su apoyo, principalmente mi familia, a la cual le agradezco infinitamente todo.

A mis padres Leticia Ciro y Patricio Vázquez quienes a lo largo de mi vida me han permitido alcanzar muchas metas, siendo esta tesis una de las más importante de todas. Por su incondicional apoyo y cariño, así como sus enseñanzas y valores que me han permitido llegar hasta donde estoy ahora.

A mi padrino Jorge y a Mimi quienes me abrieron la puerta de su hogar en uno de los momentos más difíciles de mi vida y me han apoyado en todo momento.

A mi segunda madre Evis por ayudarme siempre y enseñarme que la vida se disfruta más en compañía de los seres amados.

A mis hermanos Daniela, Miguel y Marcela por siempre sacarme una sonrisa y ayudarme a ver lo divertido de la vida.

A mi tía Malena por su incondicional apoyo en cada etapa de mi vida

A mis amiguitos de la FESI por tantos y tan divertidos momentos, así como enseñanzas y experiencias: Ale, Fer, Karen, Dianita, Lalín, Guigo, Metalito, Brayan, Ferrer....

A Sammy por ayudarme a ver la vida desde otro punto de vista y siempre creer en mi

Al Dr. Alvarez por guiarme a lo largo de esta tesis, enseñarme el lado divertido de la ciencia y ser un gran tutor.

A Claus por brindarme su apoyo en la elaboración de esta tesis y ser una gran amiga

Al Dr. Dimitris por darme la oportunidad de incorporarme al laboratorio 226 norte del IFC y poder iniciar este camino.

A mis amigos del laboratorio 226 norte: Fer, Lidia, Esme, Isa, Marianita, Quique, Luis, Chuanchi, Eder

Gracias por todo

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Transducción de señales	2
Sistemas de dos componentes.....	2
Cinasas de histidina	3
BarA/UvrY.....	6
OBJETIVO GENERAL.....	8
OBJETIVOS PARTICULARES.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	9
Antibióticos	10
Electroporación	10
Células competentes (Quimio competencia).....	10
Mutagénesis por transposón	12
Transducción por el fago P1vir.....	12
Extracción de DNA cromosomal de <i>E. coli</i>	13
Genoteca	14
Ubicación del transposón en el genoma	14
Electroforesis en gel de agarosa	15
Extracción de plásmidos por lisis alcalina	15
Extracción de plásmidos por KIT	16
Ensayo de β -galactosidasa	16
Western Blot	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
Genoteca	20
Mutagénesis	21
i) Incorporación del transposón en la región regulatoria de <i>csrB-lacZ</i>	22
ii y iii) BglF es capaz de provocar la degradación de algunos compuestos β -galactósidos.....	23

v) BarA como cinasa constitutiva	26
vi) PurA como posible mecanismo de regulación	30
vi) ArgR en la activación cinasa de BarA.....	33
CONCLUSIONES	36
REFERENCIAS.....	37
APÉNDICES	41

RESUMEN

El sistema de dos componentes BarA/UvrY de *Escherichia coli* se compone de la cinasa de histidina BarA y su regulador de respuesta UvrY. La función de este sistema es regular la expresión de los RNA's no codificantes CsrB y CsrC, quienes actúan secuestrando al regulador global CsrA, por lo que el sistema BarA/UvrY indirectamente regula el metabolismo del carbono, factores de virulencia, entre otros. Además se sabe que CsrA regula positivamente la expresión de CsrB y CsrC, afectando tanto la actividad de BarA como la expresión de UvrY, ambas de manera indirecta a través de proteínas o factores que no han sido identificados, generando así un sistema autorregulatorio. Para poder determinar la identidad de dichos factores, se utilizaron dos estrategias: genoteca y mutagénesis aleatoria. En la primera de las aproximaciones, se utilizaron 4 colecciones de plásmidos de aproximadamente 2,000 clonas cada una para transformar la cepa IFC5010 pMX543 con ellas, sin encontrar una posible candidata.

Para la segunda aproximación, después del cribado de aproximadamente 25,000 clones obtenidos por la inserción del transposón pBSL181, se identificaron 7 mutantes con mayor expresión del gen reportero *csrB-lacZ*. En un primer caso se observó que la activación del operón críptico *bgIGFD* induce la degradación de compuestos β -galactósidos como el X-gal, pero no como el ONPG. Posteriormente se encontró que una copia de BarA codificada a partir del residuo 249 producto de la inserción del transposón, generaba una actividad de cinasa constitutiva, por lo que es muy posible que el factor o factores que reprimen a BarA interactúan con esta en los primeros 248 residuos.

Además se encontró que la adenilosuccinato sintasa codificada por el gen *purA*, de alguna manera reprime la expresión del sistema BarA/UvrY. Finalmente se determinó que algún gen regulado río abajo por el gen *argR*, es el responsable de la inhibición de la actividad cinasa de BarA en una cepa con fondo $\Delta csrA$.

INTRODUCCIÓN

Transducción de señales

La sobrevivencia de los organismos, principalmente aquellos de vida libre, depende en gran medida de su capacidad de respuesta frente a diferentes estímulos externos, como pueden ser la temperatura, la presencia de nutrientes, el pH, entre otros (Barba-Ostria, 2014).

La respuesta ante estas señales se da en primer lugar en receptores que comúnmente se encuentran anclados a la membrana celular, los cuales al momento de interactuar con su ligando sufren una serie de cambios conformacionales, generando por consiguiente una cascada de reacciones bioquímicas que regulan la expresión de un grupo genes específicos conforme el estímulo dado, para así poder efectuar una respuesta rápida y específica.

En organismos eucariontes, esta respuesta se da principalmente por una cascada de fosforilaciones en residuos de treonina, tirosina o serina, (Stock *et al.*, 2000) mientras que en organismos procariontes, las fosforilaciones son en su mayoría en residuos de histidina o aspartato, los cuales presentan una energía libre más alta y dada la relación ATP/ADP intracelular, la mayoría de estos residuos involucrados en la transducción de señales, se encuentran desfosforilados (Stock *et al.*, 2000) y debido a esto, el flujo de información dependerá directamente de los estímulos extracelulares que provoquen estas reacciones.

Sistemas de dos componentes

Los sistemas de dos componentes (SDC) son mecanismos de estímulo-respuesta que se encuentran distribuidos ampliamente entre los tres dominios de la vida (*Eubacteria*, *Archea* y

Eukarya), siendo los procariontes los mayores representantes. Los SDC's permiten a los organismos que los poseen, tener la capacidad de percibir su ambiente y así tener la capacidad de responder eficientemente según el estímulo. Estos mecanismos se componen de una cinasa de histidina (CH) y un regulador de respuesta (RR) altamente específico para dicha CH.

Los SDC's regulan una amplia gama de procesos celulares que pueden ir desde la utilización de carbono y nitrógeno, crecimiento en condiciones aerobias o anaerobias hasta la formación de biopelículas, esporulación entre otros (Parkinson & Kofoed, 1992). Asimismo se ha planteado que un mejor entendimiento de los circuitos regulatorios de los SDC's permitirá su aplicación y aprovechamiento en diversos procesos que pueden ir desde los industriales como la elaboración de fármacos hasta ecológicos como la biorremediación (Stock *et al.*, 2007).

La presencia y cantidad de CH's y RR's se ha visto que dependen en gran medida de las condiciones ambientales ante las cuales tenga que responder el organismo en cuestión, ya que un organismo como *Escherichia coli* que es un comensal del sistema digestivo presenta 30 CH's y 32 RR's (Mizuno, 1997), mientras que organismos del género *Synechocystis* los cuales son organismos de vida libre y por tal razón deben enfrentarse a un ambiente poco estable, presentan alrededor de 80 CH's. Por otro lado, organismos que viven en un ambiente altamente estable como los son parásitos intracelulares obligados como *Mycoplasma*, no presentan ninguna CH (Mizuno, 1998). Otra relación que se ha encontrado con los genes involucrados en los SDC's es que su número crece proporcionalmente al tamaño del genoma del organismo (Capra & Laub, 2014).

Cinasas de histidina

La CH canónica o más simple funciona en un estado de homodímero normalmente anclado a la membrana plasmática. Al momento en que la CH percibe un estímulo específico a través de su dominio sensor (DS), se autofosforila a expensas de ATP en el residuo de histidina conservado del dominio transmisor (DT), para posteriormente transmitirlo al residuo de aspartato conservado del

dominio receptor (DR) del RR específico, quien en este estado actúa como regulador transcripcional de sus genes blancos (Álvarez *et al.*, 2016) (Fig. 1A).

Por otro lado, las CH's híbridas que igualmente se encuentran en un estado de homodímero y ancladas a la membrana plasmática, presentan una transferencia secuencial del grupo fosfato en un sentido His → Asp → His → Asp (Georgellis *et al.*, 1997) denominado fosfo-relevo. Cabe señalar que cada uno de estos residuos de aminoácidos se encuentra en un dominio diferente, que no necesariamente se encuentran en la misma proteína y por ello, existe una amplia gama de estructuras de estas CH's híbridas. Sin embargo y basándose en homologías, se ha determinado que la arquitectura típica de estas CH's consiste en: i) el dominio transmisor (DT) que alberga a la primera histidina conservada; ii) el dominio receptor (DR) que contiene al primer aspartato conservado y finalmente iii) el dominio de fosfotransferencia (DF) en donde la segunda histidina conservada dona el grupo fosfato al aspartato del dominio receptor (DR) del RR cognado (Alvarez *et al.*, 2016;) actuando de esta manera como regulador transcripcional (Fig. 1B).

El silenciamiento del sistema ocasionado por la falta de la señal activadora tanto en las CH's canónicas como híbridas, consiste en la defosforilación del RR y está dado por tres eventos independientes: i) por la capacidad bifuncional de la CH, quien puede defosforilar específicamente al RR cognado en ausencia del estímulo; ii) por la actividad de fosfatasas no involucradas en la regulación directa del SDC y iii) por la ruptura espontánea del enlace covalente entre el RR y el grupo fosfato (Álvarez *et al.*, 2016) (Figura 1C).

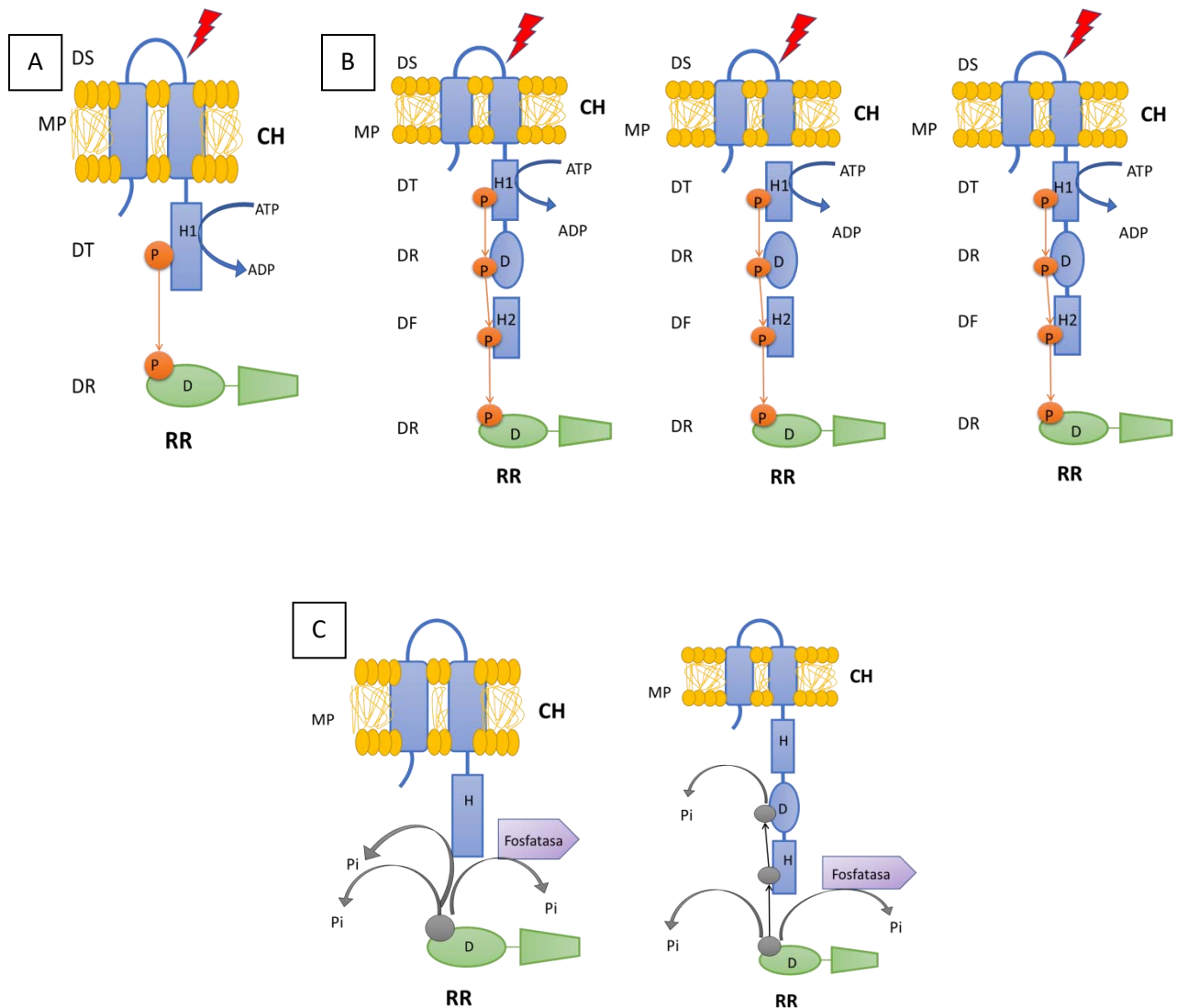


Figura 1. Arquitectura típica de los sistemas de dos componentes en bacterias.

- Los sistemas de dos componentes que presentan una cinasa de histidina (CH) canónica normalmente anclada a la membrana plasmática (MP), al momento de percibir un estímulo específico a través del dominio sensor (DS), se autofosforilan a expensas de ATP en la histidna conservada del dominio transmisor (DT) para luego donarlo al residuo de aspartato del dominio receptor (DR) del regulador de respuesta (RR).
- Las CH's híbridas normalmente ancladas a la MP presentan gran diversidad estructural, pero comparten una misma arquitectura típica. El DT con la primera His conservada se autofosforila a expensas de ATP, posteriormente lo dona al Asp del DR y este a su vez lo dona a la segunda His conservada ubicada en el dominio de fosfotransferencia (DF) para finalmente donarlo al Asp del DR del RR. A este proceso se le conoce como fosforrelevo
- Los procesos por los cuales la señal se interrumpe tanto en CH's canónicas como híbridas consisten en la desfosforilación del RR por medio de tres mecanismos independientes. El mecanismo más común es a partir de la actividad fosfatasa de la CH en ausencia del estímulo, así mismo una fosfasa no propia del sistema es capaz de romper el enlace entre el RR y el grupo fosfato. El tercer mecanismo por el cual esto sucede, es la ruptura espontánea del enlace.

BarA/UvrY

El sistema de dos componentes BarA/UvrY de *Escherichia coli* es un sistema de transducción de señales conformado por la CH híbrida BarA y el RR UvrY (Pernesting et al., 2001). La función de este sistema es la activación de la expresión de los RNA's no codificantes CsrB y CsrC (Suzuki et al., 2002; Gudapaty et al., 2001), los cuales se unen a la proteína CsrA evitando así la actividad regulatoria que esta ejerce sobre los mRNA que tiene como blanco (Liu et al., 1997; Wellbacher et al., 2003).

La proteína CsrA es un homodímero que actúa en la regulación traduccional al bloquear la unión de los ribosomas en el extremo 5' no traducido de los mRNA's, mediante su unión a secuencias GGA en estructuras tallo-asa (Mercante *et al.*, 2009). Esta secuencia asemeja a un Shine-Dalgarno típico de bacterias, por lo que CsrA modula la expresión de una amplia gama de mRNA's y por tal razón, el sistema BarA/UvrY, a través de CsrA, regula el metabolismo del carbono (Romeo et al., 1993), motilidad, factores de virulencia (Fortune et al., 2005), formación de biopelículas (Jackson et al., 2002) entre otros.

La activación del sistema BarA/UvrY depende de muchos factores, siendo uno de ellos el pH, ya que durante el crecimiento a pH fisiológico, el sistema se activa en la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria mientras que en condiciones de pH menores a 5.5 dicho sistema no se activa (Mondragón et al., 2006).

Recientemente se determinó que el sistema BarA/UvrY responde directamente a la presencia de productos intermediarios del metabolismo de la glucosa, como lo son el acetato y el formato, así como otros ácidos carboxílicos de cadenas cortas, los cuales son detectados por BarA (González et al., 2010). Sin embargo el acetato puede activar directamente al regulador de respuesta UvrY mediante la formación de acetil-P (Wolfe, 2005).

Se ha observado que la activación de la transcripción de *CsrB* y *CsrC* depende de la presencia de la proteína *CsrA* (Gudapaty et al., 2001; Wellbacher et al., 2003), generando así un sistema de autorregulación. Este efecto regulatorio es debido a dos procesos independientes: i) *CsrA* regula la expresión de *uvrY* tanto a nivel transcripcional como traduccional, y ii) la proteína *CsrA* es necesaria para la activación de la cinasa de histidina *BarA* (Camacho et al., 2015). Y como se mencionó antes, el modo de acción de *CsrA* es mediante su unión a mRNA's, la regulación de la transcripción de *UvrY* y la activación de *BarA* deben ser mediadas por factores intermediarios regulados por *CsrA*, que aún no han sido identificados (Fig. 2).

Por tal motivo, en el presente trabajo se utilizaron técnicas de biología molecular para identificar el o los factores intermediarios en el circuito autoregulatorio *BarA/UvrY-CsrA*, principalmente los involucrados en la activación de *BarA* como cinasa representados por X en la figura 2.

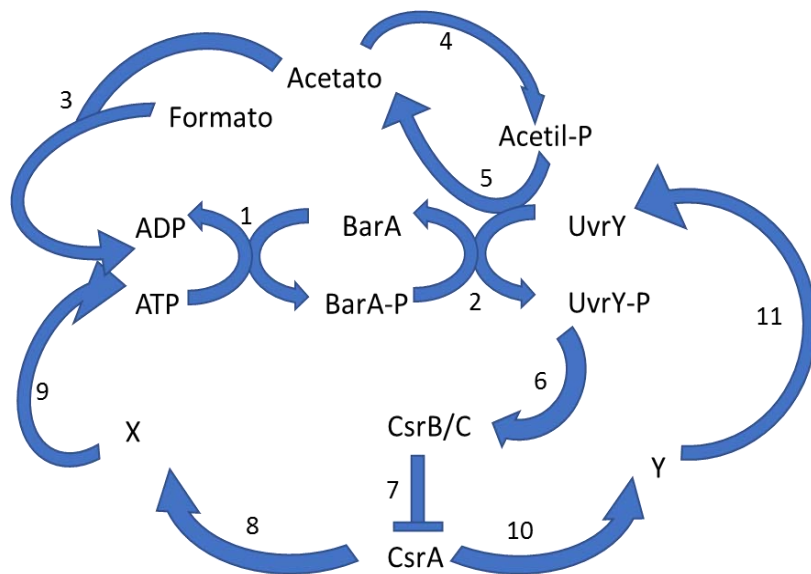


Figura 2. Representación del circuito regulatorio del sistema *BarA/UvrY/Csr*. 1) Fosforilación de *BarA* a expensas de ATP; 2) Fosforilación de *UvrY* por *BarA-P*; 3) Productos intermediarios del metabolismo de la glucosa como el formato y acetato activan la fosforilación de *BarA* a expensas de ATP; 4) Formación de acetil-P a partir de acetato; 5) Fosforilación de *UvrY* por acetil-P; 6) *UvrY-P* activa la transcripción de los RNA's pequeños no traducidos *CsrB* y *CsrC*; 7) *CsrB* y *CsrC* secuestran a *CsrA*; 8) *CsrA* regula la traducción del factor X; 9) el factor X regula la activación cinasa de *BarA*; 10) *CsrA* regula la traducción del factor Y; 11) el factor Y regula la transcripción y traducción de *UvrY*. Modificado de Camacho et al., 2015

OBJETIVO GENERAL

- Identificar factores involucrados en la regulación del sistema de dos componentes BarA/UvrY en *Escherichia coli*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Elaborar una genoteca a partir de DNA cromosomal de una cepa $\Delta csrA$ y $\Delta uvrY$
- Transformar dicha genoteca en una cepa $\Delta csrA$, *csrB-lacZ* que contiene un plásmido con el gen *uvrY* bajo el control del promotor de *barA* (IFC5010 pMX543)
- Mutar aleatoriamente con un transposón una cepa $\Delta csrA$, *csrB-lacZ* que contiene un plásmido con el gen *uvrY* bajo el control del promotor de *barA* (IFC5010 pMX543)
- Identificar los genes mutados/codificados en las clonas seleccionadas anteriormente, e investigar sobre una relación funcional de los productos de estos con BarA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Como medio líquido se utilizó Luria Bertani (LB) disuelto en agua bidestilada según las condiciones del fabricante y se esterilizó por autoclave a 121°C durante 20 minutos. Los medios sólidos se prepararon adicionando agar a la solución de LB a una concentración final de 1.5% w/v. Para preparar medio LB a pH 5, se disolvió LB con 100mM de buffer MES en agua bidestilada y se esterilizó por filtración.

El medio mínimo M9 se preparó de acuerdo a las siguientes especificaciones:

Sales M9 (1L - Esterilizar por autoclave)

- 64g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 15g KH_2PO_4
- 2.5g NaCl
- 5.0g NH_4Cl

Medio mínimo M9 (1L)

- 200ml de Sales M9
- 2mM MgSO_4
- 20ml de glucosa (20%)
- 10 μM CaCl_2

Los cultivos líquidos fueron crecidos aeróbicamente a 37°C con una agitación constante de 250 rpm, mientras que las placas con medio sólido se incubaron igualmente a 37°C durante al menos 12 horas.

Antibióticos

Se prepararon soluciones concentradas de los antibióticos necesarios en agua bidestilada, excepto el cloranfenicol el que se disolvió en etanol absoluto; se esterilizaron por filtración, se alícuotaron y se almacenaron a -20°C.

Antibiótico	Concentración
Ampicilina (Amp)	100mg/ml
Kanamicina (Km)	50mg/ml
Cloranfenicol (Cm)	25mg/ml
Espectinomicina (Sp)	100mg/ml

Electroporación

Uno de los métodos usados para transformar células de *E. coli* fue la electroporación. Para ello se creció el cultivo deseado en medio LB hasta una D.O._{600nm} de 0.5 y posteriormente se colocó en hielo para detener su crecimiento. Las células se recolectaron por centrifugación a 4,000 RPM durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente se realizaron 2 lavados en las mismas condiciones con glicerol al 10 % frío. Resuspendiendo en el último lavado con 500 µl.

Una vez lavadas las células, se electroporó 1µl del DNA exógeno en 100µl de células lavadas y se recuperaron con 1ml de LB a 37°C durante 1 hora mínimo. Finalmente, se sembraron alícuotas de cada transformación sobre placas con LB/agar y los antibióticos correspondientes.

Células competentes (Quimio competencia)

El otro método para realizar transformaciones fue el uso de células competentes. Para ello se creció el cultivo deseado en medio LB hasta una D.O._{600nm} de 0.3. Posteriormente se colocó en hielo para detener su crecimiento y se recolectaron las células por centrifugación a 4,000 RPM

durante 15 minutos a 4° C. La pastilla resultante se resuspendió en 18 ml de solución RF1, se incubó sobre hielo por otros 30 min y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. La pastilla resultante se resuspendió en 4 ml de solución RF2, se fraccionó en alícuotas de 200 µl en tubos cónicos de 1.5 ml y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido, para almacenarlas finalmente a -70°C.

Para realizar la transformación, se descongelaron las células competentes en hielo, se adicionó 1 µl del DNA exógeno y se incubaron en hielo por 30 minutos. Posteriormente se realizó un coque térmico a 42°C durante 1.30 minutos, para luego volverlas a incubar en hielo por 1 minuto. Este cambio repentino de temperatura permite que el DNA exógeno entre en la célula. Luego se agregó 700 µl de medio LB y se dejaron recuperar las células a 37°C por 1 hora mínimo. Finalmente, se sembraron alícuotas de cada transformación sobre placas con LB/agar y los antibióticos correspondientes

Solución RF1 (esterilizado por filtración)

- 100 mM RbCl
- 50 mM MnCl₂
- 30 mM Acetato de potasio
- Se ajustó a pH 5.8 con ácido acético concentrado

Solución RF2 (esterilizado por filtración)

- 10 mM RbCl
- 10 mM MOPS
- 75 mM CaCl₂ × 6 H₂O
- 15 % (v/v) Glicerol
- Se ajustó a pH 6.5 con NaOH

Mutagénesis por transposón

Se generaron mutantes aleatorias por electroporación con el transposón contenido en el plásmido pBSL181 (Cm^r) (Alexeyev & Shokolenko, 1995) en la cepa IFC5010 (KSB837 *csrB-lacZ*; *csrA::Km^r*) que contiene el plásmido pMX543 (*uvrY* bajo el promotor de *barA*), el cual permite la expresión de *uvrY* independientemente de CsrA. De esta manera, intentamos identificar factores regulados por CsrA y que afecten la activación de BarA. El efecto de dichas mutaciones se evaluó mediante la expresión del gen reportero *csrB-lacZ*, obteniendo cambios en el fenotipo (coloración azul) de las colonias sembradas sobre LB/agar con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido)

Transducción por el fago P1vir

La transducción mediante el fago P1vir se llevó a cabo en dos etapas:

- Lisis de la cepa donadora: Para esta etapa se inocularon 50μl de un cultivo crecido toda la noche de la cepa donadora en 5ml de medio LB estéril adicionado con 25μl de CaCl₂ 1M y 50μl de glucosa al 20% (w/v), este paso se hizo por duplicado. Después de haber incubado por 30 minutos a 37°C, se adicionó 1μl de fago P1vir a uno de los tubos, dejando el otro tubo como control. Ambos tubos se incubaron nuevamente a 37°C hasta que se observó lisis en el tubo con fago en comparación con el tubo control. Una vez lisado el cultivo, se colocó en hielo y se tomaron 900μl del lisado al cual se le adicionaron 100μl de cloroformo y se agitó vigorosamente, para así romper las células que no habían sido lisadas. Finalmente se centrifugó a 10,000 rpm y se recuperó la fase acuosa, la cual se guardó a 4°C.
- Transducción: Para esta etapa, la cepa receptora se creció en 5ml de medio LB estéril adicionado con 50μl de glucosa al 20% (w/v). Una vez crecido el cultivo, se tomaron 500μl del mismo y se recolectaron las células a 9,000 RPM durante 5 minutos, este paso se hizo por triplicado. Las pastillas resultantes fueron resuspendidas en 300μl de solución fago y se adicionaron 1, 10 y 100μl respectivamente del lisado de la cepa donadora, esto con el fin de titular la concentración del fago resultante. Se incubaron

a 37°C durante 30 minutos y pasado este tiempo se recuperaron las células con 100µl de citrato de sodio 1M y 500µl de medio LB. Posteriormente se incubaron a 37°C durante 1 hora y finalmente, se sembraron alícuotas de cada transducción sobre placas con LB/agar y los antibióticos correspondientes.

Solución fago

- 10mM CaCl₂
- 5mM MgSO₄

Extracción de DNA cromosomal de *E. coli*

Para la extracción de DNA cromosomal de cepas de *E. coli*, se partió de un cultivo de 50ml crecido hasta punto de saturación. Las células fueron recolectadas a 5,000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente se lisaron a 37°C durante 1 hora con ayuda de 20ml de buffer de lisis. Transcurrido el tiempo, se realizaron 2 extracciones utilizando una solución de fenol/cloroformo y finalmente una más con cloroformo para remover el fenol.

Para poder precipitar el DNA se utilizó etanol ultra puro frío en una proporción 2.5:1 y después se realizó un lavado con etanol al 70%, para finalmente secar el DNA y resuspenderlo en buffer TE.

Buffer TE

- 1 mM EDTA (Sal disódica) (pH 8)
- 10 mM Tris/HCl (pH 8)

Buffer de lisis (20ml)

- 18.68 ml buffer TE
- 1.2 ml SDS 10%
- 120 µl de proteinasa K (20 mg/ml)

Genoteca

Se elaboró una genoteca con fragmentos de aproximadamente 5kb, a partir de DNA cromosomal extraído de una cepa mutante en *csrA* y *uvrY* cortados con la enzima *Sau3AI*. Posteriormente, dichos fragmentos se ligaron con un plásmido de alto número de copias pBSK^rCm (Cm^r). Posteriormente dichas ligaciones se utilizaron para transformar la cepa IFC5010 pMX543 (misma cepa usada en la mutagénesis) y se sembraron sobre LB/agar con los antibióticos correspondientes (Amp, Km, Sp y Cm) adicionado con X-gal. De la misma forma que la mutagénesis antes mencionada, se seleccionaron colonias mediante la expresión del gen reportero *csrB-lacZ*.

Ubicación del transposón en el genoma

Al igual que la genoteca previamente descrita de las mutantes obtenidas se realizaron digestiones parciales del DNA de cada una, se ligaron con el plásmido pUC18 (Am^r) y se transformaron en una cepa Top 10 por quimio competencia la cual no presenta endonucleasas. Se seleccionaron las transformantes en LB/agar con cloranfenicol. Los plásmidos seleccionados se secuenciaron en la Unidad de Biología Molecular del IFC utilizando el oligonucleótido pKD3C1 (5'-TTATACGCAAGGCGACAAGG -3') que hibrida dentro de la resistencia a cloranfenicol y tiene una direccionalidad río abajo del mismo.

Posteriormente y con base en los resultados obtenidos, se mutaron de manera dirigida los genes identificados por recombinación homóloga de productos de PCR utilizando la recombinasa del fago λ Red (Datsenko & Wanner, 2000). Ya mutados los genes candidatos, se comprobó el fenotipo encontrado en la mutagénesis por transposón mediante la expresión del gen reportero *csrB-lacZ*.

Electroforesis en gel de agarosa

Para observar y determinar los tamaños de fragmentos de DNA, se utilizó la electroforesis en geles de agarosa. Para ello, la agarosa se disolvió en buffer TBE a una concentración de 1% w/v por calentamiento en microondas, hasta disolución total y homogénea, y se vertió en una cámara horizontal, para luego colocar el peine para formar de esta manera los pozos. Una vez solidificado el gel, se cubrió con buffer TBE y se retiró el peine. Las muestras de DNA se mezclaron con 0.2 volúmenes de buffer de carga y se cargaron en los pozos del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 150 V durante 40-60 min. Finalizada la migración, el gel de agarosa se tiñó en una solución de bromuro de etidio ($2 \mu\text{g ml}^{-1}$) durante 10-20 min. Después de 5 minutos de lavado en agua, el DNA se observó en luz UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) en un transiluminador

Buffer TBE (10X)

- 50 mM Tris
- 50 mM Ácido bórico
- 2.5 mM EDTA (sal disódica)

Extracción de plásmidos por lisis alcalina

Con el fin de comprobar las clonaciones correctas de los diferentes plásmidos, se recurrió a la extracción de los mismos utilizando lisis alcalina en donde a partir de cultivos crecidos toda la noche, se tomaron 1.5ml de los mismos en tubos de centrifuga de 1.5ml y por centrifugación a 13,000 RPM durante 5 minutos, se recuperaron todas las células en una pastilla, que después fue resuspendida en 100 μl de buffer GTE frío. Posteriormente, las células fueron lisadas al agregar 200 μl de una solución de SDS alcalina. Después de 5 min de incubación sobre hielo, las proteínas y el DNA cromosomal se precipitaron tras agregar 150 μl de solución de acetato de potasio. Para separar el sobrenadante del precipitado, se centrifugó a 13.000 RPM durante 10 minutos y este primero se pasó a un tubo limpio.

Finalmente se precipitó el plásmido con ayuda de etanol e igualmente por centrifugación se obtuvo una pastilla (plásmido) quien una vez seca, se resuspendió en un volumen adecuado de buffer TE con 0,01 % (v/v) de RNasaA. Los plásmidos se conservaron a -20°C.

Solución GTE

- 25 mM Tris/HCl (pH 8,0)
- 10 mM EDTA (Sal disódica)
- 50 mM Glucosa

Solución de SDS alcalina

- 200mM NaOH
- 1% (w/v) SDS

Buffer TE

- 1 mM EDTA (Sal disódica) (pH 8)
- 10 mM Tris/HCl (pH 8)

Extracción de plásmidos por KIT

Los plásmidos que fueron mandados a secuenciar fueron extraídos utilizando el KIT “QIAprep Spin Miniprep Kit” de Qiagen según las especificaciones del fabricante.

Ensayo de β -galactosidasa

Con el fin de seguir la actividad β -galactosidasa del gen reportero *csrB-lacZ*, se utilizó una aproximación colorimétrica mediante la degradación del compuesto β -galactósido ONPG. Para esto, se inocularon a una D.O. _{600nm} de 0.01 las cepas correspondientes en matraces con LB pH7 o

pH5 según fuera el caso, colocándolos en agitación a 37°C hasta que alcanzaran una D.O._{600nm} de 0.15, donde se tomó el primer punto del ensayo colocando 100µl del cultivo en 900µl de buffer Z, cada punto se realizaba por duplicado y se tomaba su D.O._{600nm}. La toma de muestra se realizó cada 30 minutos por 4 horas después de que el cultivo llegó a una D.O._{600nm} de 0.15.

Para poder revelar el ensayo, se adicionó 200µl de ONPG (4mg/ml) a cada punto, dejando que la reacción transcurriera durante 20 minutos. Para parar la reacción se adicionó 500µl de Na₂CO₃ 1M y se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 420nm y 550nm, en donde la primera refiere a la longitud de onda a la cual el amarillo tiene su pico de absorción, mientras que la segunda refiere a la turbidez presentada por el medio. Los resultados fueron obtenidos en unidades Miller utilizando la siguiente fórmula:

$$1000 * \frac{(Abs_{420} - (1.75 * Abs_{550}))}{(t * v * Abs_{600})}$$

Donde *t* es el tiempo de la reacción y *v* es el volumen del cultivo en la misma.

Buffer Z

- 57.7 mM Na₂HPO₄
- 42.3 mM NaH₂PO₄
- 3.3 M KCl
- 3.3 M MgSO₄

(Antes de utilizar el buffer Z, se le adicionaron a 50ml del mismo: 135 µl de β-mercaptoetanol y 555 µl de SDS 0.1%)

Western Blot

Para la detección de proteínas se utilizó la técnica de *Western Blot*, la cual consiste en separar las proteínas de acuerdo a su tamaño y posteriormente detectarlas mediante el uso de anticuerpos. Para ello se elaboró un gel de poliacrilamida de acuerdo a las especificaciones de Sambrook y Russell (2001).

La preparación de las muestras consistía en tomar 1 ml del cultivo deseado en fase estacionaria, posteriormente las células se recolectaban a 12,000 rpm durante 5 minutos y se resuspendían en 100 μ l de buffer de carga adicionado con β -mercaptoetanol (10% v/v). Finalmente las muestras se calentaron 5 minutos a 95°C. Una vez preparadas las muestras, se cargaron 10 μ l de las mismas en el gel con la ayuda de una jeringa Hamilton y se corrieron en una cámara vertical con buffer de corrida a 20 mA constantes hasta que el frente de corrida llegara al final del gel. Como marcador de peso se utilizó *Blue Prestained Protein Standard, Broad Range*.

Posteriormente se utilizó una transferencia en cámara húmeda para poder tener las muestras en una membrana de nitrocelulosa. Para ello se colocó en un baño de buffer de transferencia una celda de transferencia y dentro de esta: almohadilla, papel filtro, gel de poliacrilamida, membrana, papel filtro y almohadilla (en ese orden desde el cátodo hacia el ánodo), evitando dejar burbujas entre el gel y la membrana. Una vez armada la celda, esta se pasó a la cámara de transferencia llena con el mismo buffer de transferencia y se corrió a 100 voltios constantes durante 1 hora en frío.

Transcurrida la transferencia, se recuperó la membrana y se bloqueó con caseína durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente se lavó la membrana 3 veces con buffer TBS-Tween. El anticuerpo primario se adicionó en una solución 1:10,000 en buffer TBS-Tween durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante.

Posteriormente la membrana se lavó de la misma manera que antes. Se realizó lo mismo con el anticuerpo secundario.

Para revelar el ensayo, se utilizó el kit *Immobilon Western* de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Buffer de corrida (5X)

- 15 g Tris base
- 72 g Glicina:
- 5 g SDS
- Aforar a 1 litro

Buffer de carga

- 100 mM Tris- HCl (pH 6.8):
- 4 % (w/v) SDS
- 0.2% Azul de bromofenol
- 0.20 % Glicerol

Buffer de transferencia (10X)

- 30 g Tris base
- 142.7 g Glicina
- 3.72 g EDTA (Sal disódica)
- 200 mL Metanol
- Aforar a 1 litro

Buffer tris salino (TBS, 10X, pH7.6)

- 24 g Tris base
- 88 g NaCl
- Aforar a 1 litro
- Se ajustó el pH con HCl

(Se adicionó el TweenTM-20 en buffer TBS 1X a una concentración de 0.1% (v/v))

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de identificar el o los factores regulados por CsrA que intervengan en la activación o represión de la actividad cinasa de BarA, se recurrió al uso de dos aproximaciones: i) elaboración de una genoteca y ii) mutagénesis aleatoria. Con la primera buscamos un gen necesario para la activación de BarA como cinasa y que debido a su bajo o nulo nivel de expresión en una cepa $\Delta csrA$, BarA no se active. Por otro lado, con la mutagénesis buscamos un gen que impida la activación de BarA como cinasa y cuya expresión esté reprimida por CsrA, de tal manera que en una cepa $\Delta csrA$ su mayor expresión no permita la activación del sistema BarA/UvrY.

Genoteca

Para la primera aproximación, se construyó una genoteca a partir de DNA cromosomal de una cepa $\Delta uvrY$, $\Delta csrA$ con la cual se transformó directamente la cepa IFC5010 pMX543 mediante electroporación. Como resultado de esta transformación se obtuvieron alrededor de 30 colonias por μl de ligación, las cuales fueron insuficientes para poder representar el tamaño del cromosoma completo de *E. coli*. Esta baja eficiencia en la transformación pudo deberse a que CsrA regula una amplia gama de procesos celulares y al no encontrarse, la adquisición y estabilización de material genético exógeno se vea mermada.

Por lo tanto, se decidió utilizar la cepa TOP10, la cual carece de endonucleasas y debido a ello es ampliamente utilizada en técnicas de biología molecular para estabilizar y replicar plásmidos. La cepa se transformó mediante choque térmico con la genoteca antes mencionada. Mediante el uso de esta cepa, se obtuvieron alrededor 8,000 colonias con plásmido. Posteriormente estas colonias fueron levantadas de la caja y resuspendidas en medio LB estéril para formar 4 colecciones de plásmidos de aproximadamente 2,000 clonas cada uno, a las cuales por medio de purificación por columnas Quiagen se extrajeron los plásmidos generados. Después

la cepa IFC5010 pMX543 fue transformada por electroporación con las colecciones de plásmidos, obteniendo de esta manera un aproximado de 20,000 clonas en total por colección. Cabe señalar que esto fue repetido en varias ocasiones para asegurar que todos los plásmidos de la colección original estuvieran representados en las clonas obtenidas de la cepa IFC5010 pMX543. Sin embargo, en ninguno de los casos se encontró alguna clona que presentara una mayor expresión del gen reportero *csrB-lacZ*, juzgado por la coloración azul de la colonia debido a la degradación del sustrato X-gal.

La ausencia de colonias azules puede deberse a tres razones: i) el número de plásmidos obtenidos a partir de la genoteca realizada no fueron los suficientes para abarcar el tamaño completo del genoma de *E. coli*; ii) el factor que interviene en la activación de BarA como cinasa no se encuentra reprimido en una cepa $\Delta csrA$ y más bien se encuentra sobre expresado inhibiendo la actividad cinasa de BarA, o iii) hay más de un gen/proteína regulados por CsrA que son necesarios para la activación de BarA.

Mutagénesis

Para la otra aproximación propuesta (mutagénesis aleatoria) en donde se buscó algún factor que reprimiera la actividad cinasa de BarA en una cepa $\Delta csrA$, a diferencia de la genoteca antes mencionada, se obtuvieron aproximadamente 40,000 mutantes directamente en la cepa IFC5010 pMX543. Esto puede deberse a que el transposón utilizado se encuentra contenido en un plásmido Pir dependiente inducible por IPTG, por lo que al entrar en la célula se insertaba en alguna región del genoma de *E. coli* sin necesidad de estabilizarse o replicarse dentro de la misma.

Con el fin de encontrar la ubicación del transposón dentro del genoma de *E. coli*, se optó por realizar una genoteca a partir de cada mutante obtenida. Para esto, en primer lugar se extrajo DNA total de la mutante en cuestión y posteriormente se realizó una digestión parcial del mismo con la enzima Sau3AI y se clonó dentro del sitio BamHI del plásmido pUC18 (Amp^r). La genoteca

resultante se utilizó para transformar la cepa TOP10 por choque térmico, seleccionando las clonas resultantes con cloranfenicol, por lo que las colonias resistentes contendrían la resistencia del transposón y posiblemente las secuencias río arriba y río abajo de donde se había insertado. Para comprobar la clonación y tamaño de los insertos, los plásmidos resultantes fueron digeridos con las enzimas *HindIII* y *EcoRI*, las cuales flanquean al sitio *BamHI* donde se realizó la clonación, provocando así la liberación del inserto, por lo que al correr una electroforesis en gel de agarosa y observar el plásmido en una conformación lineal y otras bandas, se podría inferir que el mismo estaba bien clonado.

Una vez recibidas las secuencias, se realizó un BLAST nucleótido-nucleótido utilizando la herramienta *blastn suite* del NCBI, disponible en: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

Del total de mutantes obtenidas, fueron 7 las que presentaron el fenotipo deseado (expresión del gen reportero *csrB-lacZ*), en donde el transposón se incorporó en: i) *csrB-lacZ*; ii y iii) *bglF*; iv) *rhaA*; v) *barA*; vi) *purA* y; vii) *argR*. Las cuales se describirán a continuación.

i) Incorporación del transposón en la región regulatoria de *csrB-lacZ*

En el primero de los casos donde obtuvimos una mayor expresión del gen reportero *csrB-lacZ*, se procedió a realizar, como control, la transferencia de la mutación generada a una cepa $\Delta uvrY$ *csrB-lacZ* mediante transducción por fago P1, para descartar que el transposón generara una modificación en la expresión de UvrY que no tuviera que ver con el fin del presente trabajo. Después de haber obtenido mediante genoteca la ubicación del transposón en el genoma y la secuencia correspondiente, observamos que este se había incorporado en la región regulatoria de *csrB-lacZ* (Apéndice A).

Este efecto observado se puede explicar debido a que la inserción del transposón en esta región generó un promotor putativo (Fig. 3), provocando de esta manera una expresión constitutiva e independiente de la actividad propia del sistema, dándonos así un falso positivo.

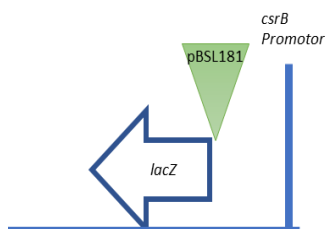


Figura 3. Ubicación del transposón pBSL181 en la región reguladora del gen reportero *csrB-lacZ*. Provocando la expresión constitutiva del mismo sin necesidad de la actividad cinasa de BarA

ii y iii) BglF es capaz de provocar la degradación de algunos compuestos β -galactósidos

Para descartar la incorporación del transposón en la región reguladora de *csrB-lacZ* con el resto de las mutantes obtenidas, se transfirió la mutación generada a una cepa sin reportero mediante transducción por fago P1, en donde sí se presentaba este caso, las mutantes resultantes presentarían una tonalidad azul en presencia de X-gal y serían descartadas.

En otras dos mutantes obtenidas, identificamos que el transposón se incorporó río arriba del gen *bglF* (Apéndice B), el cual pertenece a un operón críptico quien codifica para tres genes estructurales involucrados en la utilización de β -glucósidos aromáticos (Prasad & Schaeffler, 1974): i) *bglF* que es la enzima II^{Bgl}; ii) *bglG* que es el antiterminador específico del operón; y iii) *bglB* que es una fosfo- β -glicosidasa (Fig. 4) (Schnetz *et al.*, 1987).

Se sabe que la expresión de este operón se encuentra silenciada en una cepa silvestre sin embargo, existen múltiples mutaciones capaces de revertir esto y se les conoce como “activación”, las cuales generan un fenotipo constitutivo (Amster-Choder, 2005). Uno de estos mecanismos de activación, es la inserción de un elemento “IS” río arriba o río abajo del operón (Schnetz 1995).

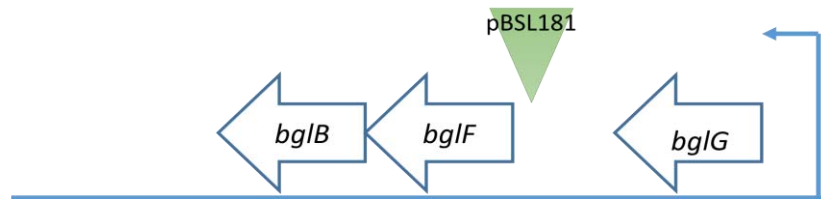


Figura 4. Ubicación del transposón pBSL181 dentro del operón *bgIBFG*. Al incorporarse el transposón entre el gen que codifica para la enzima *BgIF* y el gen regulador *bgIG*.

Se sabe que *bgIF* codifica para una enzima perteneciente a la superfamilia funcional dependiente de fosfoenolpiruvato capaz de fosforilar y transportar β -glucósidos a través de la membrana plasmática (Postma *et al.*, 1993). Sin embargo, en el presente trabajo se observó que una mutante con una inserción, por un transposón, río arriba del marco de lectura abierto de *bgIF*, posiblemente activa constitutivamente al operón y genera una tonalidad azul en colonias sembradas sobre LB/agar adicionado con X-gal. Posteriormente, al realizar una cinética enzimática de la β -galactosidasa, en donde se utiliza ONPG en lugar de X-gal como sustrato, observamos que no había activación del sistema. Por lo tanto, la degradación del X-gal en las placas debería involucrar otro mecanismo.

Posiblemente y debido a que *BgIF* transporta compuestos β -glucósidos a través de la membrana, pueda tener cierta inespecificidad al momento de transportar compuestos β -galactósidos como el X-gal y no el ONPG, provocando que este primero se acumule dentro de la célula y sea más fácilmente degradado por la expresión basal del gen reportero *csrB-lacZ*. Sin embargo, es necesario realizar los experimentos pertinentes para comprobar o refutar esto. En lo que concierne al presente trabajo, este resultado fue otro falso positivo que no se había contemplado en un inicio.

iv) Al mismo tiempo que la obtención de las secuencias de las mutantes anteriores, recibimos la secuencia correspondiente a una mutante más, que al igual que los casos anteriores, las colonias obtenidas presentaban una ligera tonalidad azul pero en el ensayo de β -galactosidasa, la activación no era significativa. En esta mutante se encontró que el transposón había

interrumpido el gen *rhaA* (Apéndice C), quien al igual que *bglF* se encuentra codificado dentro de un operón.

El operón donde se encuentra *rhaA*, codifica para tres genes estructurales involucrados en el metabolismo de la L-ramnosa: i) *rhaA* que es la L-ramnosa isomerasa; ii) *rhaB* que es la L-ramnosa cinasa involucrada en la fosforilación de la ramnosa y; iii) *rhaD* quien codifica para la ramnosa-1-fosfato aldolasa (Fig. 5).

Para comprobar el fenotipo observado por la mutagénesis producto del transposón, se procedió a mutar directamente a *rhaA*, mediante la utilización de la recombinasa del fago λ Red (Datsenko & Wanner, 2000) quien por homología sustituye al gen de interés por un gen de resistencia a cloranfenicol. Para esto, se diseñaron los oligonucleótidos (Apéndice D) del-*rhaA*-Fw (5'-TCACTCTACACGACAGACAAAGGAGCTTTGCGCATGACCATGTGT AGGCTGGAGCTGC-3') y del-*rhaA*-Rv (5'-GTGTTTACCCGCGGCGACTCAAATTTCTTTCATAAGCCATATGAATATCCTCCTTAG-3') que presentan una homología de 40 nucleótidos río arriba y río abajo respectivamente de *rhaA* y que en el extremo 3' presentan 18 nucleótidos que hibridan con el plásmido pKD4 quien contiene el gen de resistencia a cloranfenicol. Para comprobar la correcta mutación del gen se diseñaron los oligonucleótidos *rhaB*-inORF-Fw (5'-TCGACAGTCTGGCGCTGC-3') y *rhaD*-inORF-Rv (5'-ATCGGCGTCATCCAGGCG-3') quienes hibridan río arriba y río abajo respectivamente de *rhaA* (Apéndice D) y dan un tamaño más grande cuando el gen de resistencia a cloranfenicol se encuentra presente (Fig. 6).



Figura 5. Ubicación del transposón pBSL181 dentro del operón *rhaABD*

Una vez mutada y comprobada la integración del gen de resistencia por *rhaA*, se transdujo por P1vir a la cepa IFC5010 pMX543 y se plaqueó sobre LB/agar con X-gal, sin embargo no se obtuvo el fenotipo observado en la mutagénesis por transposón. Esto podría deberse a alguna mutación propia de *E. coli* que produjo el fenotipo observado en esta mutante, que a pesar de dar una tonalidad ligeramente más azul, no es debido al sistema BarA/UvrY/Csr. Produciendo por consiguiente otro falso positivo.

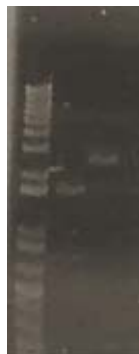


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa 1%w/v teñido con bromuro de etidio y observado bajo luz UV. En el primer carril de izquierda a derecha se observa el marcador de peso molecular utilizado (1KB Plus Ladder; en el segundo carril está el producto de la amplificación de una cepa silvestre utilizando los oligonucleótidos *rhaB*-inORF-Fw y *rhaD*-inORF-Rv (1,700 pares de bases); en el tercer carril está el producto de la amplificación, utilizando los mismo oligonucleótidos antes mencionados, de la cepa Δ *rhaA* donde este gen fue sustituido por el gen se resistencia a cloranfenicol (2,100 pares de bases)

Con base en este resultado y para descartar mutaciones aleatorias que no hayan sido provocadas por el transposón así como que no estuvieran relacionadas con el sistema BarA/UvrY, se procedió a transferir la mutación generada a la cepa IFC5010 e IFC5010 pMX543 mediante transducción por el fago P1 y si el fenotipo era el mismo que en la mutante original, el efecto observado se debería a la inserción del transposón.

v) BarA como cinasa constitutiva

Posteriormente y con base en los resultados obtenidos de *bglF*, *rhaA* y *lacZ*, se procedió a realizar, además de las transducciones por P1vir a las cepas que nos permitieran descartar incorporaciones del transposón en el gen reportero *csrB-lacZ*, cinéticas enzimáticas de la β -galactosidasa las cuales nos permitieron descartar mutaciones en el operón críptico *bglFGB* o cualquier otro falso positivo que no estuviera involucrado con la activación del sistema. Gracias a esto, se generó un filtro más fino de las posibles candidatas.

Una vez elaborados los controles correspondientes, encontramos una mutante en la que se observó que el transposón se había incorporado dentro de *barA* en la secuencia correspondiente al aminoácido 248 (Apéndice E). Es importante señalar que este aminoácido se encuentra en la región ubicada entre el *linker* que conecta la región transmembranal con la región citosólica y el dominio H1 de la CH BarA (Fig. 7) donde se encuentra el primer residuo de histidina conservado (Pernesting *et al.* 2001), generando de esta manera una proteína truncada que pudo expresarse a partir del residuo 249 gracias a un promotor putativo generado por el mismo transposón dilucidado mediante el uso del programa BPROM (Solovyev & Salamov, 2011).

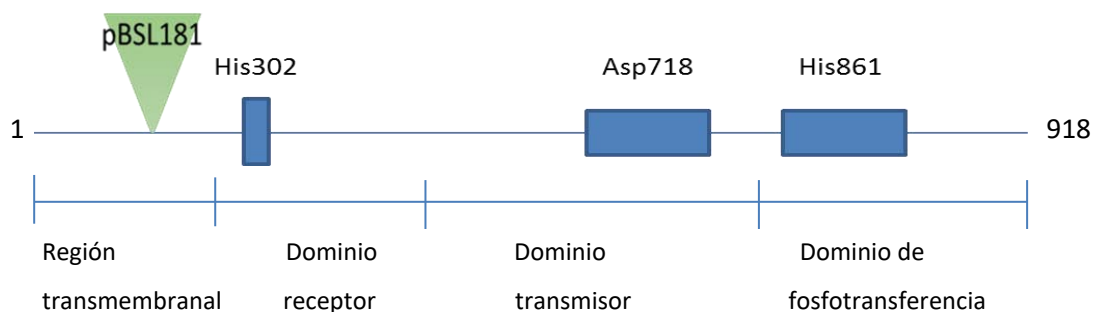


Figura 7. Representación esquemática del ORF de *barA*. La ubicación del transposón pBSL181 se encontró entre la región *linker* y el dominio transmisor o H1 de la CH BarA, formando una proteína funcional a partir del residuo 249. El dominio transmisor está representado por el residuo de histidina conservado ubicado en la posición 302 de la proteína. El dominio receptor está representado por el residuo de aspartato ubicado en la posición 718. El dominio de fosfotransferencia o H2 está representado por el residuo de histidina ubicado en la posición 861. La región transmembranal se encuentra en el extremo N-terminal.

Con el fin de comprobar la expresión de la mutante BarA-249, se procedió a realizar un *Western Blot* contra BarA (Fig. 8), en donde encontramos que la mutante de BarA-249 presentaba un tamaño menor con respecto a la copia silvestre de la misma. Por lo tanto se puede concluir que el promotor putativo generado por el transposón en efecto permitía la expresión de esta copia de BarA.

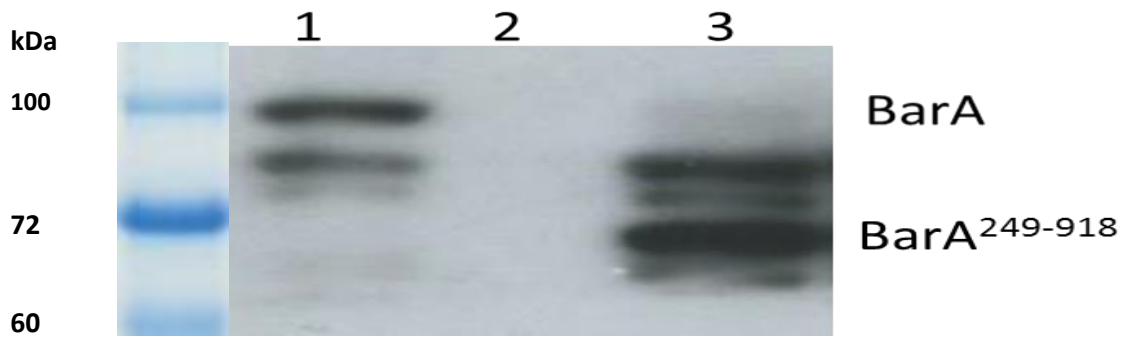


Figura 8. Western Blot contra BarA utilizando anticuerpos policlonales de conejo. En el carril 1 se observa BarA silvestre (106 kilo Daltons); el carril 2 se dejó vacío; y en el carril 3 se observa la copia de BarA expresada a partir del residuo de aminoácidos 249 (72 kDa) agregando 5 veces más proteína con respecto a la cepa silvestre.

Al realizar el ensayo enzimático (Fig. 9) de la β -galactosidasa de la cepa IFC5010 pMX543 barA-249, encontramos que su activación alcanzaba valores similares a los presentados por una cepa silvestre, por lo que con base en este resultado y sabiendo que esta mutante de BarA se encontraba codificada a partir del residuo 249, se podría inferir que el o los factores involucrados en la regulación de BarA como cinasa en una cepa $\Delta csrA$, interactúan reprimiéndola en alguna región dentro de los primeros 248 residuos de BarA. Sin embargo, es necesario comprobar dicha hipótesis mediante ensayos de interacción de proteínas.

Para determinar el efecto de esta mutante y con resultados recientemente obtenidos en el laboratorio, en donde una mutante de *barA* que es codificada a partir de la región *linker*, presenta actividad de fosfatasa constitutiva a pH 5 en fondo silvestre (no publicado) y sabiendo que la mutante BarA-249 es capaz de activar el sistema. Se procedió en primer lugar a transferir la mutación a la cepa KSB837 mediante transducción por el fago P1 y posteriormente realizar una cinética enzimática de β -galactosidasa de la cepa KSB P1:BarA-249 en LB pH5 con acetato, formato y sin estímulo, tomando a la cepa KSB837 $\Delta barA$ como control (Fig. 10).

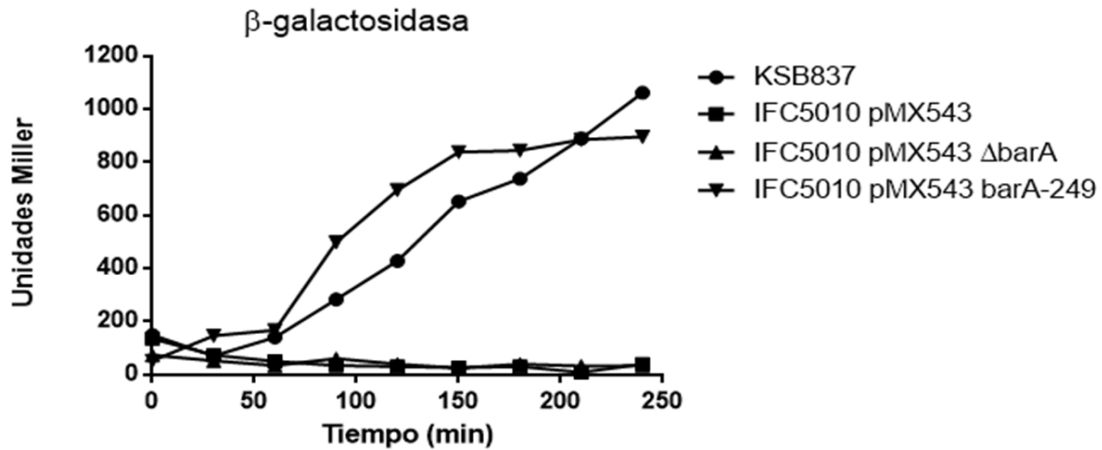


Figura 9. Ensayo de la actividad β -galactosidasa de la mutante de BarA codificada a partir del residuo 249 por un promotor putativo generado por la inserción del transposón pBSL181. La activación del sistema en la cepa IFC5010 pMX543 barA-249 (triángulo invertido) alcanza valores similares a los presentados por la cepa KSB837 (círculo), por lo que el o los factores que inhiben la actividad cinasa de BarA en una cepa con fondo $\Delta csrA$, posiblemente interactúan en alguna región dentro de los primeros 248residuos de BarA. Como controles negativos se utilizaron las cepas IFC5010 pMX543 (triángulo) e IFC5010 pMX543 $\Delta barA$ (cuadros). Se realizaron 3 ensayos independientes encontrando valores similares en todos los casos.

Bajo estas condiciones, encontramos que la activación del sistema, con esta mutación, es independiente de la presencia de acetato o formato en el medio, por lo que se podría inferir que la región *linker* está directamente relacionada con la regulación de la actividad de BarA y al no encontrarse esta, el sistema se desregula provocando una actividad de cinasa constitutiva en estas condiciones.

Cabe señalar que no se tenía contemplado que una mutación dentro de *barA* pudiera producir un fenotipo donde el sistema se viera activado, por lo que nunca se hizo un control contra ello. Sin embargo, esta mutante de *barA* nos permitirá entender el sistema río abajo en la transducción de la señal, es decir, en la fosforilación de UvrY, la expresión de los RNA's pequeños CsrBC y la regulación de CsrA. Así mismo, este resultado puede permitirnos entender la relación estructura-función de BarA y ubicar las regiones involucradas en la percepción de los estímulos que permiten activar o reprimir la actividad cinasa de la misma.

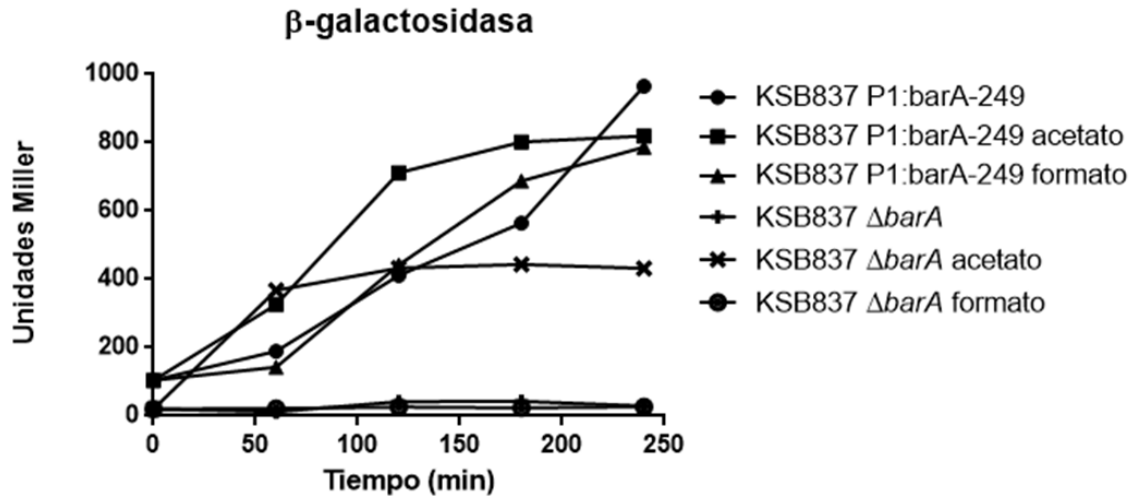


Figura 10. Ensayo de la actividad β-galactosidasa de KSB P1:barA-249 en LB pH5 con acetato (cuadros), formato (triángulo) y sin estímulo externo (círculo), en donde se observa que la activación del sistema es constitutiva independientemente del estímulo específico del sistema. Como control, se realizaron los mismos ensayos con la cepa KSB837 Δ*barA*, en donde se observa que sin estímulo (rombo) y con formato (círculo) no hay activación del sistema, mientras que con acetato (cruz) el sistema se activa debido a la fosforilación de UvrY por acetil fosfato. Se realizaron 3 ensayos independientes encontrando valores similares en todos los casos.

Teniendo esto último en mente, además de los controles antes mencionados, para descartar una mutación dentro de *barA*, se optó por realizar PCR de las nuevas candidatas utilizando el oligonucleótido BarA100up-Fw (5'-GACGCGTCGTCGTGCGTC-3') que hibrida en la región promotora de *barA* y el oligonucleótido BarAHind-Rv (5'-CCCAAGCTTGCCGATTGCTACTCGACAAGA-3') que hibrida al terminar el marco de lectura abierto del mismo (Apéndice F). Por lo que al encontrar un amplificado más grande que la copia silvestre, se sabría que el transposón se había incorporado en alguna región dentro del gen (resultados no mostrados).

vi) PurA como posible mecanismo de regulación

Después de continuar con la mutagénesis y los filtros correspondientes, obtuvimos una mutante en donde el transposón se incorporó dentro del gen *purA* (Apéndice G). La enzima codificada por *purA* es una adenilosuccinato sintasa que interviene en la síntesis *de novo* de AMP a partir de L-aspartato e inosina monofosfato mediado por la hidrólisis de GTP (Honzakto &

Fromm, 1999) y que se ve fuertemente inhibida por la presencia de la alarmona ppGpp de manera alostérica como inhibidor competitivo con respecto al GTP (Hou *et al.*, 1999). Recientemente se reportó que la alarmona ppGpp regula positivamente la expresión del gen *csrB* mediante un mecanismo no identificado aún (Zere *et al.* 2015), por lo que posiblemente la actividad/presencia de PurA sea dicho mecanismo que interviene en la expresión de *csrB*.

Para comprobar que el genotipo era correcto, se procedió a transferir mediante transducción por el fago P1 la mutación $\Delta purA$ de la colección Keio (Baba *et al.*, 2006) a la cepa KSB837 y se hizo lo mismo con la mutación producto del transposón. Posteriormente y sabiendo que una cepa $\Delta purA$ es incapaz de crecer en medio mínimo M9 con glucosa como única fuente de carbono (Brien & Herschlang, 1998), debido a que bajo estas condiciones la obtención de AMP es principalmente por esta vía (Kim *et al.*, 2015), se inocularon en tubos separados la cepa KSB P1: $\Delta purA$ (Keio), KSB P1:TnpurA y KSB837 y se dejaron creciendo toda una noche. Transcurrida la noche, observamos que la mutante producto de la inserción del transposón (TnpurA) no creció a diferencia de la cepa $\Delta purA$ de la colección Keio, que junto con la silvestre crecieron, comprobando así la mutación del gen *purA* por parte del transposón, lo cual no se observó en la mutación de la colección Keio.

Con el fin de observar el efecto de esta mutación dentro de *purA*, se procedió a realizar los ensayos de β -galactosidasa en cepas con fondo silvestre y $\Delta csrA$. Para el primero de los casos se tomó la cepa KSB P1:TnpurA construida anteriormente frente a la cepa KSB837 como control, en donde encontramos que la activación de esta primera era incluso mayor que la cepa silvestre (Fig. 11). Por lo que basándonos en este resultado, es posible inferir que la presencia de PurA en un cepa silvestre de alguna manera reprime la actividad de sistema Bar/UvrY, siendo esta la razón por la cual ppGpp induce la expresión de *csrB*, sin embargo es necesario generar los experimentos necesarios para comprobar esto.

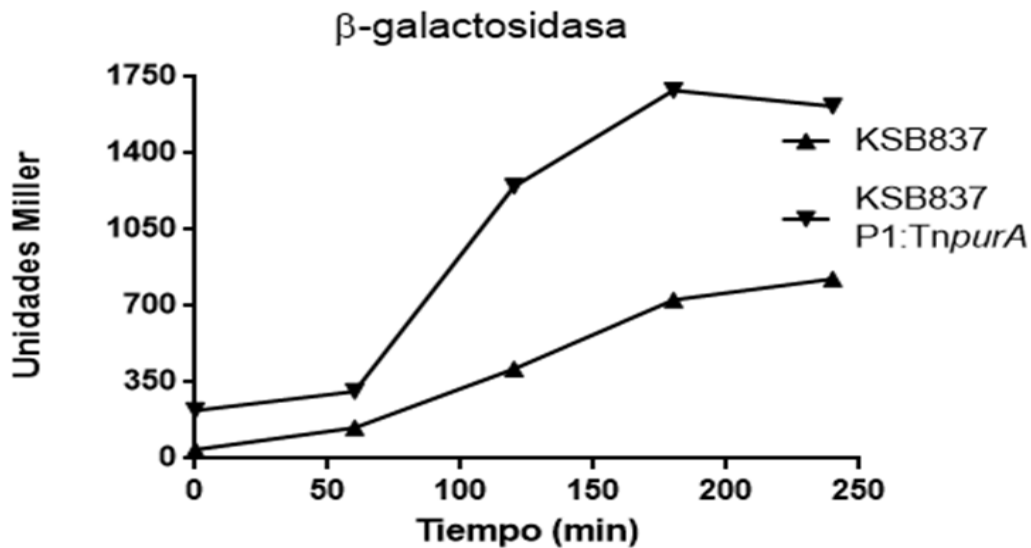


Figura 11. Ensayo de la actividad β -galactosidasa de la cepa KSB837 P1:TnpurA (triángulo invertido), en donde la activación del sistema en esta mutante es mayor con respecto a la cepa KSB837 (triángulo), por lo que PurA de alguna manera reprime al sistema BarA/UvrY en una cepa silvestre, posiblemente mediante la alormona ppGpp. Se realizaron 3 ensayos independientes encontrando valores similares en todos los casos.

Por otro lado, en la cepa IFC5010 pMX543 TnpurA fue imposible realizar el ensayo de β -galactosidasa debido a que al momento de crecer en medio líquido a la cepa, esta generaba gran cantidad de biopelícula, provocando que la toma de muestra no fuera posible. Este efecto posiblemente se deba al exceso de UvrY generado por el plásmido pMX543 y que al momento en que BarA se activa como cinasa, el efecto de UvrY-P y por ende la expresión de *csrB/C* se magnifica, provocando con ello el secuestro de la proteína CsrA deficiente que está en el medio, lo cual genera la disminución de los niveles de esta última, magnificando así la formación de biopelícula (Jackson *et al.*, 2001). Por dicha razón, se procedió a transferir la mutación TnpurA a la cepa IFC5010 mediante transducción por el fago P1, permitiendo de esta manera que la formación de biopelícula no fuera un impedimento en la toma de muestra. El efecto observado en esta mutante, IFC5010 P1:Tnpur,A fue similar al presentado en la cepa con fondo silvestre, ya que la activación del sistema en la mutante era mayor con respecto a la cepa IFC5010 usada como control (Fig. 12).

Al afectar la biosíntesis de purinas, principalmente la de AMP, se ha visto que se generan intermediarios como los son AICAR (5-amino-4-carboxamida imidazol ribosido 5'-fosfato), SAICAR (5-amino-4-imidazol N-succinocarboxamida ribonucleótido-5-fosfato) y FAICAR (5-formamido-4-imidazolecarboxamida ribonucleótido) los cuales presentan un gran interés en la regulación de varios genes, mediante mecanismos llamados *Riboswitchs*, los cuales actúan estabilizando las regiones 5' no traducidas de varios genes (Kim et al., 2015), favoreciendo así su traducción. Por lo tanto, es posible que un mecanismo que incluya el gen *purA* esté involucrado en la regulación de la actividad de BarA, incluso en una cepa donde los niveles de CsrA son los de una silvestre.

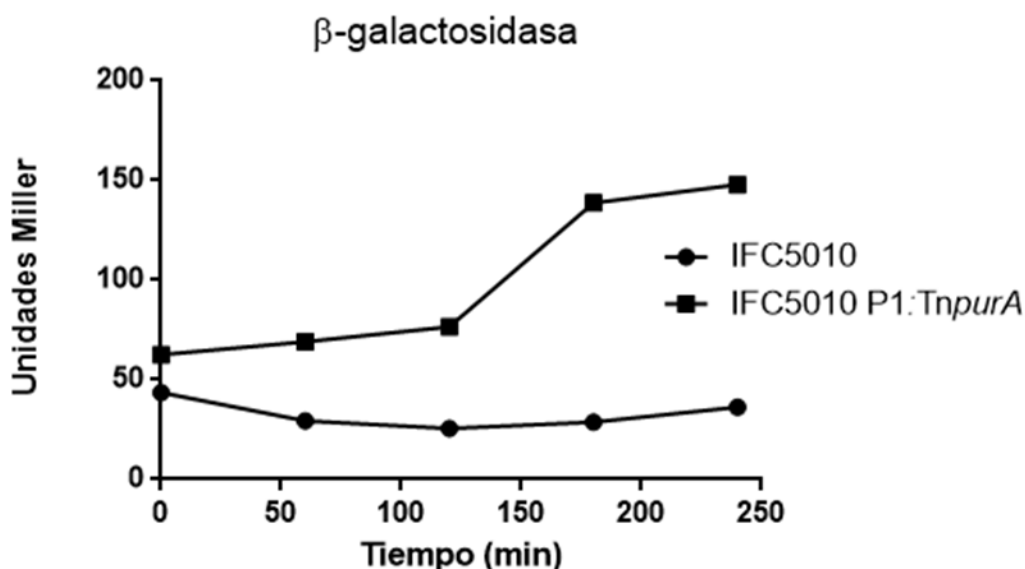


Figura 12. Ensayo de la actividad β-galactosidasa de la cepa IFC5010 (círculo) y la cepa IFC5010P1:TnpurA (cuadros), encontrando que la actividad de la cepa mutante era mayor. Se realizaron 3 ensayos independientes encontrando valores similares en todos los casos.

vi) ArgR en la activación cinasa de BarA

En otra mutante que encontramos, el transposón se había incorporado en la región regulatoria incluyendo el codón de inicio del gen *argR*, quien es un regulador transcripcional. Es importante mencionar que la mutación provocada por la inserción de transposón generó un promotor putativo y un codón de inicio alternativo (Apéndice H), por lo que no se descarta que la proteína se

esté expresando de manera diferente a como es su regulación en una cepa silvestre y haya mayores, menores o nula presencia de la proteína.

Con el fin de evaluar el efecto de la mutante en *argR*, al igual que en la mutante anterior (*purA*) se tuvo que transferir la mutación mediante transducción por el fago P1 a la cepa IFC5010, debido a la formación de biopelícula. Al realizar el ensayo de β -galactosidasa de la cepa IFC5010 P1:*argR*, se observó que la actividad llegaba a valores similares a los presentados por una cepa silvestre (Fig. 13). Sin embargo, esta mutación en fondo silvestre no presentó diferencias significativas con respecto a la cepa KSB837 utilizada como control, este se puede deber a que la mutación *TnargR* solamente presenta su efecto en una cepa Δ *csrA*.

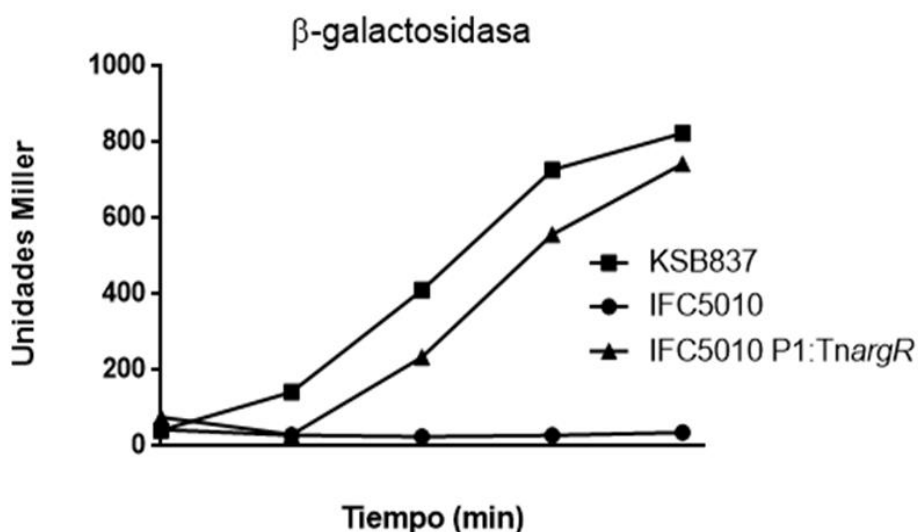


Figura 13. Ensayo de la actividad β -galactosidasa de la cepa mutante en *argR* transducida en la cepa IFC5010 (triángulos) que alcanza valores similares a los de una cepa silvestre (rombos). La cepa IFC5010 (cuadros) se usó como control. Se realizaron 3 ensayos independientes encontrando valores similares en todos los casos.

El gen *argR* es un regulador transcripcional que en conjunto con L-arginina, reprime o activa la expresión de varios genes entre los que destacan transportadores de arginina e histidina, así como las enzimas involucradas en el metabolismo de la L-arginina (Caldara *et al.*, 2006). Este efecto es mediante la unión de ArgR/L-arginina a secuencias de 18 pares de bases denominadas cajas ARG ubicadas en los promotores (Cunin *et al.*, 1983). Estas secuencias no se encuentran ni en

barA, *uvrY* o *csrBC*, por lo tanto el efecto observado es muy posible que se deba a alguno de los genes regulados río abajo por ArgR, entre los que se encuentran proteínas de membrana y citosólicas que podrían interactuar con BarA provocando su activación como cinasa, aunque no se descarta la opción de que dicho factor se esté expresando menos bajo estas condiciones y por ello permita que BarA se active.

Por lo tanto es necesario en primer lugar generar una mutante dirigida donde *argR* esté ausente o clonar *argR* bajo un promotor inducible, para así evaluar si el fenotipo observado se debe a la ausencia del mismo o a su expresión constitutiva. Posteriormente, podrían construirse mutantes de genes que están bajo el control del regulador ArgR, para averiguar si alguno de ellos afecta directamente la actividad de BarA. Estos experimentos están siendo realizados en el laboratorio, aunque ya no forman parte de esta tesis.

CONCLUSIONES

- La activación del operón críptico *bgl* es capaz de degradar compuestos β -galactósidos como el X-gal pero no como el ONPG
- El o los elementos que inhiben la actividad cinasa de BarA en una cepa $\Delta csrA$ posiblemente interactúan en alguna región dentro de los primeros 248 residuos de la proteína
- BarA codificado a partir del dominio H1 presenta una actividad de cinasa constitutiva
- La mutación de PurA permite la mayor expresión de *csrB* tanto en una cepa silvestre como una $\Delta csrA$, además es posible que sea el intermediario en el efecto de ppGpp sobre la mayor expresión de *csrB*
- Algún gen cuya expresión está regulada por ArgR podría estar involucrado en la regulación de la actividad de BarA.

REFERENCIAS

Alexeyev M.F. & Shokolenko I.N. 1995. Mini-Tn10 transposon derivatives for insertion mutagenesis and gene delivery into the chromosome of gram-negative bacteria. *Gene*, 160: 59-62

Alvarez, A.F., Barba-Ostria, C., Silva-Jiménez, H., & Georgellis, D. (2016). Organization and mode of action of two component system signaling circuits from the various kingdoms of life. *Environmental Microbiology*, 0: 1-17.

Amster-Choder O. 2005. The *bgl* sensory system: a transmembrane signaling pathway controlling transcriptional antitermination. *Curr Opin Microbiol*, 8(2): 127-34.

Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L. & Mori H. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol*, 2: 2006-0008.

Barba-Ostria C.A. 2014. Los sistemas de dos componentes: circuitos moleculares versátiles. *Tip*, 17(1): 62–76.

Brien P. J. O. & Herschlag D. 1998. Sulfatase Activity of *E. coli* Alkaline Phosphatase Demonstrates a Functional Link to Arylsulfatases , an Evolutionarily Related Enzyme Family Recent crystallographic analyses have revealed structural similarity between alkaline phosphatases and arylsulfatases. *J Am Chem Soc*, 120: 12369–12370.

Caldara M., Charlier D., & Cunin R. 2006. The arginine regulon of *Escherichia coli*: Whole-system transcriptome analysis discovers new genes and provides an integrated view of arginine regulation. *Microbiology*, 152(11): 3343–3354.

Camacho M.I., Álvarez A.F., Chávez R.G., Romero T., Merino E. & Georgellis D. 2015. Effects of the Global Regulator CsrA on the BarA/UvrY Two Component Signaling System. *J Bacteriol*. 197(5):983-991.

- Capra E.J. & Laub M.T. 2014. The Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. *Annu Rev Microbiol.*, 66: 325–347.
- Cunin R., Eckhardt T., Piette J., Boyen A., Piérard A. & Glansdorff N. 1983. Molecular basis for modulated regulation of gene expression in the arginine regulon of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res*, 11: 5007–5019.
- Datsenko K. A. & Wanner L. B. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci*, 97(12): 6640–6645.
- Fortune D.R., Suyemoto M. & Altier C. 2006. Identification of CsrC and characterization of its role in epithelial cell invasion in *Salmonella enteric* serovar *Typhimurium*. *Infect Immun.* 74(1):331–339.
- Gao R., Mack T.R. & Stock A.M. 2007. Bacterial Response Regulators: Versatile Regulatory Strategies from Common Domains. *Trends Biochem Sci.*, 32(5): 225–234.
- Georgellis D., Lynch A.S. & Lin E.C. 1997. In vitro phosphorylation study of the arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*, 179(17): 5429-35.
- González C.R., Alvarez A.F., Romeo T. & Georgellis D. 2010. The Physiological Stimulus for the BarA Sensor Kinase. *J Bacteriol.* 192(7):2009-2012.
- Gudapaty S., Suzuki K., Wang X., Babitzke P. & Romeo T. 2001. Regulatory interactions of Csr components: the RNA binding protein CsrA activates *csrB* transcription in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 183(20):6017–6027.
- Honzatko R.B., & Fromm, H.J. 1999. Structure-function studies of adenylosuccinate synthetase from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 370(1): 1–8.
- Hou Z., Cashel M., Herbert J., Honzatko R.B., & Fromm H.J. 1999. Effectors of the stringent response target the active site of *Escherichia coli* adenylosuccinate synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(25), 17505–17510.

- Jackson D.W., K. Suzuki, L. Oakford, J.W. Simecka, Hart ME & Romeo T. 2002. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 184(1):290–301.
- Kim P.B., Nelson J.W. & Breaker R.R. 2015. An Ancient Riboswitch Class in Bacteria Regulates Purine Biosynthesis and One-carbon Metabolism. *Mol Cell*, 57(2): 317–328.
- Liu M.Y., Gui G, Wei B.M., Preston J.F., Oakford L, Yüksel U., Giedroc D.P. & Romeo T. 1997. The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 272(28):17502–17510.
- Mercante J., Edwards A.N., Dubey A.K., Babitzke P. & Romeo T. 2009. Molecular geometry of CsrA (RsmA) binding to RNA and its implications for regulated expression. *J Mol Biol*, 392(2): 511–528.
- Mizuno T. 1997. Compilation of All Genes Encoding Two-component Phosphotransfer Signal Transducers in the Genome of *Escherichia coli*. *DNA Research*, 4(2): 161–168.
- Mizuno, T. 1998. His-Asp Phosphotransfer Signal. *JB Review*, 563: 555–563.
- Mondragón V., Franco B., Jonas K., Suzuki K., Romeo T., Malefors Ö. & Georgellis D. 2006. pH-Dependent Activation of the BarA-UvrY Two-Component System in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 188(23):8303-8306.
- Parkinson J.S & Kofoed E.C. 1992. Communication module in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Gen.*, 26: 71-112.
- Pernestig A.K., Melefors O. & Georgellis D. 2001. Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *J BiolChem*, 276(1):225–231.
- Postma P.W., Lengeler J.W. & Jacobson G.R. 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev*, 57(3): 543-94.
- Prasad I. & Schaeffler S. 1974. Regulation of the beta-glucoside system in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 120(2): 638-50.

Romeo T., M. Gong, M.Y. Liu, A.M. & Brun-Zinkernagel. 1993. Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J Bacteriol* 175(1):4744–4755.

Schnetz K. 1995. Silencing of *Escherichia coli bgl* promoter by flanking sequence elements. *EMBO J*, 14(11): 2545-50.

Schnetz K., Toloczyki C. & Rak B. 1987. Beta-glucoside (*bgl*) operon of *Escherichia coli* K-12: nucleotide sequence, genetic organization, and possible evolutionary relationship to regulatory components of two *Bacillus subtilis* genes. *J Bacteriol*, 169(6): 2579-90.

Solovyev V, Salamov A. 2011. Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In *Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies* (Ed. R.W. Li), *Nova Science Publishers*: 61-78

Stock A.M., Robinson V.L. & Goudreau P.N. 2000. Two -Component Signal Transduction. *Reactions*, 69: 183–215.

Suzuki K., Wang X., Wellbacher T, Pernestig A.K., Melefors O., Georgellis D., Babitzke P. & Romeo T. 2002. Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 184(18): 5130–5140.

Wellbacher T., Suzuki K., Dubey A.K., Wang X., Gudapaty S., Morozov I., Baker C.S., Georgellis D., Babitzke P. & Romeo T. 2003. A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 48(3):657–670.

Wolfe A.J. 2005. The acetate switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69(1): 12-50.

Zere, T.R., Vakulskas C.A., Leng Y., Pannuri A., Potts A.H., Dias R. Tang D., Kolaczowski B., GeorgellisD., Ahmer B.M.M. & Romeo T. 2015. Genomic targets and features of BarA-UvrY (-SirA) signal transduction systems. *PLoS ONE*, 10(12): 1–29.

APÉNDICES

En todas las secuencias de las mutantes se muestran aproximadamente los primeros 1,100 nucleótidos río arriba del inicio de la secuenciación, es decir, los obtenidos por parte de la Unidad de Biología Molecular del IFC. En algunos casos no se muestran en su totalidad algunos marcos de lectura abiertos o regiones regulatorias. En color gris se marca la secuencia correspondiente al transposón pBSL181, subrayado en amarillo se marca la secuencia río abajo del mismo, la cual corresponde al genoma de *E. coli* y la estrella roja (*) delimita una región de la otra.

Apéndice A) Ubicación del transposón pBSL181 en el gen reportero *csrB-lacZ*

TGTGATGGCTTCCATGTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGC
GGGGCGTAATTTTTTTAAGGCAGTTATTGGTGCCCTTAAACGCCTGGTTGCTACGCCTGAATAAGT
GATAATAAGCGGATGAATGGCAGAAATTCGGACGCGTCAATTCGAGCTCCACCGATCCGGGATCAT
ATGACAAGATGTGTATCCACCTTAACCTAATGATTTTTTACC AAAATCATTAGGGGATTCATCAG ***A**
GCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAG
TTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGGAAGC
TGGCTGGAGTGCATCTTCTGAGGCCGATACTGTCGTCTGTCCTCAAACCTGGCAGATGCACGGT
TACGATGCGCCATCTACACCAACGTAACCTATCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCACG
GAGAATCCGACGGTGTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAG
ACGCGAATTATTTTTGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGGGCGCTGGGTCCGT
TACGGCCAGGACAGTCTGTTTCCGTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTTACGCGCCGGAGAAAAC
CGCTCGCGGTGATGGTGCTGCGTTGGAGTGACGGCAGTTATCTGGAAGATCAGGATATGTGGCGG
ATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCCTGTTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAGCGATTTCCAT
GTTGCCACTCGCTTTAATGATGATTTACGCCGCGTGTACTGGAGGCTGAAAGTTCAGATGTGCGGC
GAGTTGCGTGACTACCTACGGGTAACAGTTTCTTTATGGCAGGGTCAAACGCAGGTCGCCAGCGGC
ACCGCGCCTTTCGGCGGTGAAATTATCGATG

La inserción del transposón dentro del gen *lacZ* se produjo en el nucleótido 77.

Apéndice B) Ubicación del transposón pBSL181 en el operón *bg/FGD*

GCAGTTAATGCGCGAAATGCTGCAATTAATAAAAATTTTCAGTTCAGCCTTAATTACCAGGAAGAAAG
CTTGAGTTATCAGCGACTGGTTACACATCTGAAGTTTTTATCCTGGCGTATTCTTGAACATGCTTC
AATTAACGATAGTGATGAATCATTACAACAAGCAGTAAAACAAAATTACCCGCAAGCATGGCAATG
TGCGGAACGGATCGCCATTTTTATTGGTTTTGCAGTATCAACGTAAAATTTACCCGCAGAGATTAT
GTTTTTAGCCATAAATATAGAGCGCGTGCGCAAAGAACACTGAAATATTATTACTGAGTAAAGGAT
TGTTACCGCACTAAGCGGGCAAAAACCTGAAAAAAATTTGCTTGATTCACGTCAGGCCGTTTTTTTCA
GGTTTTTTTTT ***TGGAGTTTTGCCGCAAAGCGGTAGAGGGCAAGTTATGACGGAGTTAGCCAGAAA**
ATAGTCGCAGGAGTCGGGGGCGCAGATAACATTTGTGAGTCTGATGCATTGCGCAACGCGATTACGT
TTTAAATTAAGGATGAAAGCAAAGCGCAAGCAGAGGTAAGGAAAGACCCCGGTATTATTATG
GTGGTGGAAAGCGGTGGCCAGTTTCAGGTGGTTCATAGGTAACCATGTGGCCGATGTCTTCTTGGCG

GTTAACAGTGTGGCAGGCCTTGACGAAAAAGCGCAACAGGCACCGGAAAATGATGATAAAGGTAAT
CTGCTAAACCGCTTTGTTTATGTTATTTTACGGTATTTTTACGCCTCTGATCGGTTTGGTGGCGCA
ACCGGGATCTTGAAAGGTATGCTGGCTCTGGCGCTCACTTTTTCAGTGGACGACCGAACAAAGTGGT
ACTTATTTAATTTTATTTCAGCGCCAGTGTGCTTTGTTTTGGTTCTTCCCGATAATCCTGGGATAC
ACCGCGGGGAAACGCTTCGGCGGTAATCCATTTACTGCCATGGTATTGGTGGAGCGTTAGTGCAT
CCATTAATTCTGACTGCTTTTCGAGAACGGGCAAAAAGCGGATGCGCTGGGGCTGGATTTCTGGGT
ATTCGGTACATTTGTTGAATTACTCGTCATCGGTTATTCCCATTTTTTTCTGCCTGGTTGTGC

En rojo se marca el codón de inicio del gen *bglF*.

Apéndice C) Ubicación del transposón pBLS181 en el operón *rhaBAD*

GTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCATGTTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCG
ATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAATTTTTTAAAGGCAGTTATTGGTGCCCTTAAACGCCTGGTTGCT
ACGCCTGAATAAGTGATAATAAGCGGATGAATGGCAGAAATTCGGACGCGTCAATTCGAGCTCCAC
CGATCCGGGATCATATGACAAGATGTGTATCCACCTTAACTTAATGATTTTTTACAAAATCATTAG
GGATTTCATCAG*CGTTTTCGGCCCGGAATCAGCCGCATAGCCTGTTCCAGATCGGCACGTAGCTC
ACTGGCATTACGCGCTTTGCCCGATAATTGCCCTGTGGCCTGAATCCCCCGGTCAGCGAACCTTC
CGGGTTTTCAAACCGGAAACATCATCGCCCTGCCAGCAGTGCATTGAAACGGGTAAACGATCAAG
TTGGCGCAGCGCTCCTCGACATCATCCCCACCGCCGCGAAACGCTGTTTCGCTAGCTCCCAGGCC
TGTTCCAGTTGAGTGGTCATGCGCAAAGCTCCTTTGTCTGTCGTGTAGAGTGAATCTGCGCCACAT
AGTGGCAATTTCACTGTGAGGATTAGGGGTAAAGGTGGTCAGATTCGCGGTGGTGTGCTGACGACCT
GACGGAATCATCCACATTGTTGAGTTCATCCAGCGTCATTAACGGATGCCGATATTGCCGAGCG
TCGAGGCTTCAACAGGCCCGGCGATCACCCGAATACCGCAGGCATCGGCGCATAGCTGGTTGAGCA
GCGTGTCTGGCAGCTCCGCCGACAATATGCAGTTGCGAGAAATCTTACCGCGCAGCTGCGCCA
GCTCATGCAACACATCGGCATACAGCAGCGCCAGACTGTGCAAAAATGCAGCGCGCCAGTTACGCAT
CACTTTTCCGGGATCGGTTGCGCCTTCCCGACACGCGAGCCTGAATTTGCTGCACATCGTCTCAGT
AATAAAAGCGCTCATTGGGGAATTG

La inserción del transposón dentro del gen *rhaA* se produjo en el nucleótido 195.

Apéndice D) Secuencia de nucleótidos del operón *rhaBAD*

CAACAAAGCCTGGTTTGGTTCGCCCAGGCATCCGGGTAATGTCATAGGTCAGTGGATTTGCCCGCA
GGTAATGAGATTCCAGTGGTTCGCCGTTGCCAGCCATGATACCGCCAGCGCGGTTATCGCCTCGCC
GTTAAACGGCTCACGTGCTGCTTATCTCTCTTCTGGCACCTGGTTCATTGATGGGCTTCGAAAGCCA
GACGCCATTTACCAATGACACGGCAGTGGCAGCCAACATCACCAATGAAGGCGGGGCGGAAGTTCG
CTATCGGGTGTGAAAAATATTATGGGCTTATGGCTGCTTCAGCGAGTGTTCAGGAGCAGCAAAT
CAACGATCTTCCGGCGCTTATCTCCGCGACACAGGCACTTCCGGCTTCCGCTTCATTATCAATCC
CAATGACGATCGCTTTATTAATCCTGAGACGATGTGCAGCGAAATTCAGGCTGCGTGTGCGGAAAC
GGCGCAACCGATCCCGGAAAGTGATGCTGAACTGGCGCGCTGCATTTTCGACAGTCTGGCGCTGC
GTATGCCGATGTGTTGCATGAGCTGGCGCAGCTGCGCGGTGAAGATTTCTCGCAACTGCATATTGT
CGGCGGAGGCTGCCAGAACACGCTGCTCAACCAGCTATGCGCCGATGCCTGCGGTATTCCGGTGAT

CGCCGGGCTGTTGAAGCCTCGACGCTCGGCAATATCGGCATCCAGTTAATGACGCTGGATGAACT
CAACAATGTGGATGATTTCCGTCAGGTCGTCAGCACCACCGGAATCTGACCACCTTTACCCCTAA
TCCTGACAGTGAAATTGCCACTATGTGGCGCAGAT**TCACTCTACACGACAGACAAAGGAGCTTTG**
CGCATGACCACTCAACTGGAACAGGCCTGGGAGCTAGCGAAACAGCGTTTCGCGGCGGTGGGGATT
GATGTCGAGGAGGCGCTGCGCCAACTTGATCGTTTACCCGTTTCAATGCACTGCTGGCAGGGCGAT
GATGTTTCCGGTTTGGAAAACCGGAAGGTTGCTGACCGGGGGATTAGGCCACAGGCAATTAT
CCGGGCAAAGCGCGTAATGCCAGTGAGCTACGTGCCGATCTGGAACAGGCTATGCGGCTGATTCGG
GGCCGAAACGGCTTAATTTACATGCCATCTATCTGGAATCAGATACGCCAGTCTCGCGCGACCAG
ATCAAACCAGAGCACTTCAAAAACCTGGGTTGAAATGGGCGAAAAGCCAATCAGCTCGGTCTGGATTTT
AACCCCTCCTGCTTTTCGCATCCGCTAAGCGCCGATGGCTTTACGCTTTCCCATGCCGACGACAGC
ATTCGCCAGTTCTGGATTGATCACTGCAAAGCCAGCCGTGCGGTTTCGGCCTATTTTGGCGAGCAA
CTCGGCACACCATCGGTGATGAACATCTGGATCCCGGATGGTATGAAAGATATCACCGTTGACCGT
CTCGCCCCGCGTCAGCGTCTGCTGGCAGCACTGGATGAGGTGATCAGCGAGAAGCTAAACCCCTGCG
CACCATATCGACGCCGTTGAGAGCAAATTGTTTGGCATTGGCGCAGAGAGCTACACGGTTGGCTCC
AATGAGTTTTACATGGGGTATGCCACCAGCCGCCAGACTGCGCTGTGCCTGGACGCCGGGCATTC
CACCCGACTGAAGTGATTTCCGACAAGATTTCCGCCGCCATGCTGTATGTGCCGAGTTGCTGCTG
CACGTCAGCCGTCCGGTTCGCTGGGACAGCGATCACGTAGTGCTGCTGGATGATGAAACCCAGGCA
ATTGCCAGTGAGATTGTGCGTCACGATCTGTTTGACCGGGTGCATATCGGCCTTGACTTCTTCGAT
GCCTCTATCAACCGCATTGCCGCGTGGGTCAATTGGTACACGCAATATGAAAAAGCCCTGCTGCGT
GCGTTGCTGGAACCTACCGCTGAGCTGCGCAAGCTGGAAGCGGCGGGCGATTACACTGCGCGTCTG
GCACTGCTGGAAGAGCAGAAATCGTTGCCGTGGCAGGCGGTCTGGGAAATGTATTGCCAACGTCAC
GATACGCCAGCAGGTAGCGAATGGCTGGAGAGCGTGCGGGCTTATGAGAAAGAAATTTTGGATCGC
CGCGGGTAAACACTGCCGGATGCGGCGGAGCGCCTTATCCGGCCTACGGGTGCGCAACAGTTGTA
GGCCTGATAAGACGCGACAGCGTCGCATCAGGCATTGATTGCCGGATGCGGCACAAGTGCCTTATC
CGGCCTACAGGTGCGCAATAGTTGTAGGCCTGATAAGACGCGACAGCGTCGCATCAGGCATTGATT
GCCGGATGCGGCACAAGTGCCTTATCCGGCCTACAGGTGCGCAACAGTTGTAGGCCTGATAAGACG
CGACAGCGTCGCATCAGGCATTGATTGCCGGATGCGGCACAAGTGCCTTATCAGGCCTACAGGTGCG
GCAATAGTTGTAGGCCTGATAAGACGCGACAGCGTCGCATCAGGCATTGATTGCCGGATGCGGCGC
GAGCGCCTTATCCGGCCTACGGTTCGTGCATCCGACAACACCGAATTTACAGGAACACAGAACATG
CAAAACATTACTCAGTCTGGTTTGTCCAGGGAATGATCAAAGCCACCACCGACGCCTGGCTGAAA
GGCTGGGATGAGCGCAACGGCGGCAACCTGACGCTA**CGCCTGGATGACGCGGAT**ATCGCACCATAT
CACGACAATTTCCACCAACAACCGCGCTATATCCCGCTCAGCCAGCCCATGCCTTTACTGGCAAAT
ACACCGTTTTATTGTCACCGGCTCGGGCAAATTTCTCCGTAACGTCCAGCTTGATCCTGCGGCTAAC
TTAGGCATCGTAAAAGTCGACAGCGACGGCGGGCTACCACATTTCTTTGGGGTTAACCAACGAA
GCCGTCCCCTACTTCCGAACTTCCGGCTCACTTCTTTCCCACTGCGAGCGCATTAAGCCACCAAC
GGCAAAGATCGGGTGATCATGCACTGCCACGCCACCAACCTGATCGCCCTCACCTATGTACTTGAA
AACGACACCGCGGTCTTCACTCGCCAACCTGTGGGAAGGCAGCACCGAGTGTCTGGTGGTATTCCCG
GATGGCGTTGGCATTTTGC

En amarillo se marca la secuencia donde hibrida el oligonucleótido del-rhaA-Fw, en gris del-rhaA-Rv, en verde rhaB-inORF-Fw y en rojo rhaD-inORF-Rv. El codón de inicio de BglF se marca en púrpura y en azul el codón de término de *rhaA*.

Apéndice E) Ubicación del transposón pBS181 dentro del ORF de *barA*

TGCCGTTTGTGATGGCTTCCATGTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTG
GCAGGGCGGGGCGTAATTTTTTTAAGGCAGTTATTGGTGCCTTAAACGCCTGGTTGCTACGCCTG
AATAAGTGATAATAAGCGGATGAATGGCAGAAATTCGGACGCGTCAATTCGAGCTCCACCGATCCG

GGATCATATGACAAGATGTGTATCCACCTTAACTTAATGATTTTTACCAAATCATTAGGGGATTC
ATCAG***TGCTTATCACGAAGAGATGCAGCACAATATCGACCAGGCGACGTCCGATCTGCGTGAAAC**
GCTGGAGCAGATGAAATTGAAACGTTGAGTTAGATCTGGCGAAAAGCGCGCCAGGAAGCGGC
GCGTATTAATCCGAGTTTCTGGCAAATATGTCACACGAGCTGCGTACACCACTGAATGGTGTAT
TGGCTTTACCCGCTGACGCTGAAAACAGAATTAACACCAACGCAGCGCGATCACCTGAATACGAT
TGAACGTTGCGCAAATAATTTGCTGGCAATTATTAATGATGTTCTCGACTTCTCGAAACTGGAAGC
AGGTAAGCTGATTCGGAAAGTATTCATTCCCACTACGCAGCAGCTGGATGAAGTCGTTACTCT
GCTGGCACATTCTTCTCACGATAAAGGGTTAGAACTGACGCTCAATATTAAGCGACGTGCCTGA
TAACGTGATCGGCGACCCGCTGCGATTACAGCAAATCATCACTAACCTGGTGGGGAATGCAATTAA
ATTCACCGAGAATGGCAACATTGATATTCTGGTAGAAAACGTGCGCTGAGTAATACCAAAGTGCA
GATTGAAGTGCAGATTCGGGATACCGGCATTGGTATTCCTGAACGCGATCAATCGCGCTTATTCCA
GGCCTTCGACAGGCTGATGCCAGTATTTCCCGCCGTATGGTGGCACCGGGCTGGGGCTGGTGA
TTACACAAAACCTGGTTAATGAAATGGGGCCGGCGATA

Subrayado en negro se encuentra el promotor putativo.

Apéndice F) Secuencia de nucleótidos de *barA*

CCGGGGATAAATAGCGTTTTGCCGTTATGTCGCGCCACGCCCTGACCAAAGAGTCGAGGTCGTTG
ACTGAAACGGTTATGATCT**GACGCGTCGTCGTGCGTC**GTTTTGCAGAGTAGAATTGCGCCATTGGC
GAGACTTTCTCAATTTAACAGTGTGACCTTAATTGTCCATAACGGAACCTCC**ATG**ACCAACTACAG
CCTGCGCGCACGCATGATGATTCTGATCCTGGCACCGACCGTCTTATTGGTTTATTGCTGAGTAT
CTTTTTCGTCGTGCATCGCTATAACGACTTGCAGCGTCAACTGGAAGATGCCGGTGCCAGCATTAT
TGAGCCGCTTGCAGTTTCTACTGAATATGGCATGAGCCTGCAAAATCGCGAATCTATCGGTGAGTT
AATAAGCGTACTGCATCGTCGCCATTCCGATATTGTTGCGCGGATTTGCGTTTATGATGAAAATAA
CCGACTCTTTGTCACCTCCAATTTTCATCTTGATCCCTCATCAATGCAGCTCGGCAGCAACGTGCC
GTTTCCTCGCCAGCTCACTGTCACCTCGTGACGGCGATATTATGATCCTCCGCACGCCGATTATTTTC
TGAGAGTTACTCCCCGACGAATCGCCAGTAGCGATGCCAAAATAGTCAAAATATGTTGGGATA
TATTGCGCTGGAGCTGGATCTTAAATCGGTTGCTTGCAGCAATATAAAGAGATCTTTATTTCCAG
CGTGATGATGCTGTTTTGTATCGGTATTGCGCTTATTTTTGGCTGGCGCTTAATGCGCGATGTAAC
CGGTCCGATTGCAACATGGTGAATACCGTCGACCGCATCCGTGCGGGGCAACTCGACAGCCGGGT
GGAAGGATTTATGCTCGGCGAGCTGGATATGCTGAAAACGGTATCAACTCGATGGCAATGTCGCT
GGCTGCTTATCACGAAGAGATGCAGCACAATATCGACCAGGCGACGTCCGATCTGCGTGAAACGCT
GGAGCAGATGAAATTCAGAACGTTGAGTTAGATCTGGCGAAAAGCGCGCCAGGAAGCGGCGCG
TATTAAATCCGAGTTTCTGGCAAATATGTCACACGAGCTGCGTACACCACTGAATGGTGTATTGG
CTTTACCCGCTGACGCTGAAAACAGAATTAACACCAACGCAGCGCGATCACCTGAATACGATTGA
ACGTTGCGCAAATAATTTGCTGGCAATTATTAATGATGTTCTCGACTTCTCGAAACTGGAAGCAGG
TAAGCTGATTCTGGAAAGTATTCATTCCCACTACGCAGCACGCTGGATGAAGTCGTTACTCTGCT
GGCACATTCTTCTCACGATAAAGGGTTAGAACTGACGCTCAATATTAAGCGACGTGCCTGATAA
CGTGATCGGCGACCCGCTGCGATTACAGCAAATCATCACTAACCTGGTGGGGAATGCAATTAAAT
CACCGAGAATGGCAACATTGATATTCCTGGTAGAAAACGTGCGCTGAGTAATACCAAAGTGCAGAT
TGAAGTGCAGATTCGGGATACCGGCATTGGTATTCCTGAACGCGATCAATCGCGCTTATTCCAGGC
CTTCCGACAGGCTGATGCCAGTATTTCCCGCCGTATGGTGGCACCGGGCTGGGGCTGGTGTATTAC
ACAAAACCTGGTTAATGAAATGGGCGGCGATATTTGTTCCATAGCCAGCCGAATCGCGGTTCAAC
TTTCTGGTTCCACATTAATCTCGATCTGAACCCGAACATTATTATCGAAGGGCCATCCACCCAGTG
CCTCGCAGGTAAGCGCCTGGCCTATGTCGAACCAAACCTCCGCAGCAGCGCAATGCACGCTGGATAT
TTTAAGTGAACGCCGCTGGAAGTGGTTTATAGCCCAACGTTCTCCGCGCTGCCTCCCGCGCATTA

CGACATGATGTTGTTAGGCATCGCGGTGACCTTCCGCGAGCCGCTAACAAATGCAACATGAGCGATT
 AGCGAAAGCGGTATCGATGACCGATTTCCTGATGCTGGCACTTCCTTGCCATGCACAAGTCAATGC
 TGAAAAACTCAAGCAAGATGGTATCGGGCGGTGTCTGCTGAAACCATTAACACCTACACGCCTGTT
 GCCTGCCCTGACGGAATTTTGTTCATCACAACAAAACACGCTTTTGCCTGTAACCGATGAAAGTAA
 GCTGGCAATGACAGTCATGGCGTTGATGACAACCCCGCTAACCTGAAACTTATCGGCGCATTGCT
 GGAAGATATGGTGCAACATGTGGAACCTTTCGATAGCGGGCATCAGGCGGTTGAAACGGGCGAAACA
 GATGCCGTTTCGATTTGATCTTAATGGATATTCAAATGCCGGACATGGATGGCATTTCGGGCCTGCGA
 ACTCATCCACCAACTCCCGCATCAGCAACAAACGCGGTTATCGCGGTAACGGCGCATGCAATGGC
 CGGGCAAAAAGAGAAGCTGCTTGGCGCAGGGATGAGCGATTATCTGGCGAAAACCGATTGAAGAAGA
 GCGATTGCATAATTTGTTGTTGCGCTACAAGCTGGCAGCGGTATTTCTCTCGCGTTCGTGACGCC
 CGAAGTCAACGAAATTTGTGGTGAACCCGAATGCGACCCTCGACTGGCAACTGGCACTACGCCAGGC
 AGCAGGAAAAACCGATTTAGCGCGCATATGCTGCAAATGTTACTCGATTTCTGCCTGAAGTTTCG
 CAACAAAGTTGAGGAACAGCTGGTTGGAGAAAACCCGGAAGGCCGTTGGTTGATTGATTCAAACT
 GCATGGCAGTTGCGGCTATAGCGGTGTGCCACGTATGAAGAATCTCTGCCAACTGATCGAACACA
 GCTACGTAGCGGTACTAAAGAAGAAGATTTGGAACCGGAGCTGCTGGAAGTGTGGACGAGATGGA
 TAATGTCGCGCGCGAAGCCAGCAAAATTTCTCGGGTAATGGATGCTTGTGCGAGTAGCAATCGGC
 TTTATGACGCTGGTTTCAGATTGGTGACAAAGTGCCTGTGTTTATGCCGGATGCGGCGTTAACGCC
 TTATCCGGCCTACAAAACCAATTAATTAATGAATAAAAAATGATGTAGACCTGATACATAGCA
 CAACAGGCTATTTGCGTTTAGCATCAGTCTCAAACCGGCTCCAGATAGAGCCGTTTTGGTTTTTC
 TGTCTTAACGCACCATGCACGGGCGTTGTTATCGAACGTCCAGCCAGGAATCAGA

En amarillo se marca la secuencia donde hibrida el oligonucleótido BarA100up-Fw, en verde se marca la secuencia donde hibrida el oligonucleótido BarAHind-Rv. El codón de inicio de BarA se marca en color rojo y el codón de término en azul.

Apéndice G) Ubicación del transposón pBLS181 dentro del ORF del gen *purA*

AAAGTAGGACTGGAGTTTTATGCCGTTTGTGATGGCTTCCATGTCGGCAGAATGCTTAATGAATTA
 CAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAATTTTTTTAAGGCAGTTATTGGTGCCCTTAA
 ACGCCTGGTTGCTACGCCTGAATAAGTGATAATAAGCGGATGAATGGCAGAAAATTCGGACGCGTCA
 ATTTCGAGCTCCACCGATCCGGGATCATATGACAAGATGTGTATCCACCTTAACTTAATGATTTTTA
 CCAAATCATTAGGGGATTTCATCAG*CTGCAAGCAGGGTAACGAATTCGGCGCAACTACGGGGCGT
 CGTTCGTTCGTACCGGCTGGCTGGACACCGTTGCCGTTTCGTTCGTGCGGTACAGCTGAACTCCCTGTCT
 GGCTTCTGCCTGACTAAACTGGACGTTCTGGATGGCCTGAAAGAGGTTAAACTCTGCGTGGCTTAC
 CGTATGCCGGATGGTTCGCGAAGTGACTACCACTCCGCTGGCAGCTGACGACTGAAAGGTGTAGAG
 CCGATTTACGAAACCATGCCGGCTGGTCTGAATCCACCTTCGGCGTGAAAGATCGTAGCGGCCTG
 CCGCAGGCGGGCTGAACTATATCAAGCGTATTGAAGAGCTGACTGGTGTGCCGATCGATATCATC
 TCTACCGGTCCGATCGTACTGAAACCATGATTCTGCGCGACCCGTTTCGACGCGTAATTCTGGTAC
 GCCTGGCAGATATTTTGCCTGCCGGGCGAACAGTGTGATACATTGCTGTGTGCGGTAAGCCATTAC
 GCTATCCGACACAGTGTAAATCCCTCGCTTTTTTTCCTTCCCCGAACTGAAATAAATTAGCGACACA
 GCTTGTGGCTGGTTTATCATCAATATAAATGTATTTTTTCCCGATTTCCCTTTTGGAGTTGATGTG
 CAGTTAACGAGTTTCACTGATTACGGATTACGTGCGCTGATCTACATGGCGTCATTGCCAGAAGGG
 CGGATGACCAGTATTTCTGAAGTGACTGACGCTACGGCGTCTCCCGTAATCATATGGTCAAAAATA
 ATCAATCAACTTAGTTCGTGCGGCTACGTGACTGCTGTTTCGTGAAAAAATGCGCATTTCGCTGGGTA
 ACGCGAGTGGCAGTATTGATGATGTGATGCGCGACTTGGAGCCATTTCGCTGCTGAATTGCAA
 GA

La inserción del transposón dentro del gen *purA* se produjo en el nucleótido 873 y en rojo se marca el último codón del ORF de *purA*.

Apéndice H) Ubicación del transposón pBLS181 en la región reguladora de *argR*

TCAGCGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAATTTTT
TTAAGGCAGTTATTGGTGCCCTTAAACGCCTGGTTGCTACGCCTGAATAAGTGATAATAAGCGGAT
GAATGGCAGAAATTCGGACGCGTCAATTCGAGCTCCACCGATCCGGGATCATATGACAAGATGTGT
ATCCACCTTAACTTAATGATTTTTACCAAAATCATTAGGGGATTCATCA**G*TCGGAAGCTCGGCTA**
AGCAAGAAGAACTAGTTAAAGCATTAAAGCATTACTTAAAGAAGAGAAATTTAGCTCCCAGGGCG
AAATCGTCGCCGCGTTGCAGGAGCAAGGCTTTGACAATATTAATCAGTCTAAAGTCTCGCGGATGT
TGACCAAGTTTGGTGCTGTACGTACACGCAATGCCAAAATGGAAATGGTTTACTGCCTGCCAGCTG
AACTGGGTGTACCAACCACCTCCAGTCCATTGAAGAATCTGGTGCTGGATATCGACTACAACGATG
CAGTTGTGCGTATTCATACCAGCCCTGGCGCGGCGCAGTTAATTGCTCGCCTGCTGGACTCACTGG
GCAAAGCAGAAGGTATTCTGGGCACCATCGCTGGCGATGACACCATCTTTACCACCCCTGCTAACG
GTTTCACAGTCAAAGACCTGTACGAAGCGATTTTAGAGCTGTTTCGACCAGGAGCTTTAA**TCTCTGC**
CCCGTCGTTTCTGACGGCGGGGAAAATGTTGCTTATCCCTCTCAACCCCTGCTTTCCCTGCGAT
TAATTTAACGAATAGTGCGTTTTACTGCGACATGTCATTACACAATGAATACATAAAGGTA
AAAAAAAGCACATTATGCAAAATTTCAATTTATCTAAATTGAAAAAACTAGAAATTAACGATA
AAAAATAACCGTATTTTTTAAATTTCTTTTTTTTTGCTATAAAAATCACATTTTTAACACTTAGTATCCACTG
AACCAGCTTAGCGCGGTATTAATAGGCTCATAACTTTAGCTGGTAATAAACTATTGCATATG

Subrayado en negro se encuentra el promotor putativo; en rojo se marca el codón alternativo de inicio y en verde el codón de paro de *argR*