

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DINÁMICA DE LOS SWITCHES REGULATORIOS PARA EL
USO JERÁRQUICO DE FUENTES DE CARBONO EN
Escherichia coli”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

RUTH SARAHI PÉREZ ALFARO

DIRIGIDA POR

Dr. AGUSTINO MARTÍNEZ ANTONIO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DINÁMICA DE LOS SWITCHES REGULATORIOS
PARA EL USO JERÁRQUICO DE FUENTES DE CARBONO
EN *Escherichia coli*”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

RUTH SARAHI PÉREZ ALFARO

DIRIGIDA POR

Dr. AGUSTINO MARTÍNEZ ANTONIO

SINODALES

Dr. AGUSTINO MARTÍNEZ ANTONIO
(DIRECTOR)

Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ
(SINODAL)

Dra. SOFÍA MARÍA ARVIZU MEDRANO
(SINODAL)

Dra. MONTSERRAT HERNÁNDEZ ITURRIAGA
(SINODAL)

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 <i>Escherichia coli</i> K-12 como modelo de estudio	3
II.1.1 Tecnología de las fusiones transcripcionales	4
II.2 Represión catabólica por fuentes de carbono en <i>Escherichia coli</i>	5
II.3 Sistemas de transporte de carbohidratos en <i>Escherichia coli</i>	5
II.3.1 El sistema de la fosfotransferasa (PTS)	7
II.3.2 Transporte de cassette de unión a ATP (ABC)	8
II.3.3 Transportadores simporter H ⁺ /azúcar	9
II.4 Regulación de la expresión genética en <i>E. coli</i>	10
II.4.1 Control transcripcional en <i>E. coli</i>	11
II.4.1.1 Proteínas reguladoras del consumo de carbohidratos	12
II.4.1.1.1 Regulación del consumo de L-arabinosa	14
II.4.1.1.2 Regulación del consumo de D-galactosa	16
II.4.1.1.3 Regulación del consumo de D-sorbitol (D-glucitol)	16
III. HIPÓTESIS	20
IV. OBJETIVO	21
V. METODOLOGÍA	22
V.1 Materiales	22
V.1.1 Cepas bacterianas	22
V.1.1.1 Cepa silvestre	22
V.1.1.2 Cepas con mutaciones en genes regulatorias (de la colección Keio)	22

V.1.1.3 Banco de fusiones transcripcionales (de la colección de Alon)	22
V.1.1.4 Fusiones transcripcionales construidas en este trabajo (BioSistemas)	22
V.1.2 Medios	23
V.1.3 Azúcares	23
V.1.4 Otros reactivos	23
V.1.5 Kits para extracción de plásmido	24
V.1.6 Equipos	24
V.2 Métodos	24
V.2.1 Preparación de células quimiocompetentes	24
V.2.2 Extracción de plásmidos	25
V.2.3 Transformación de células competentes	25
V.2.4 Verificación de células transformadas	25
V.2.5 Crecimiento diauxico y evaluación de la actividad promotora	28
V.2.6 Procesamiento de los datos	31
VI. RESULTADOS	32
VI.1 Emisión de fluorescencia por el plásmido pUA66 sin promotor	32
VI.2 Estudio del crecimiento de <i>E. coli</i> K-12 en distintas fuentes de carbono	34
VI.3 Actividad promotora de los FT involucrados en el consumo de fuentes alternas de carbono	38
VI.4 Estudio de las actividades de los promotores de los genes reguladores para el uso preferencial de fuentes de carbono alternas a glucosa	42
VI.5 Crecimiento de <i>E. coli</i> en ausencia de FT involucrados en el consumo de fuentes alternas a glucosa	45
VI.6 Dinámica de los FT involucrados en los <i>switches</i> regulatorios del consumo de fuentes alternas de glucosa	49
VI. DISCUSIÓN	56

VII. CONCLUSIONES	58
VII. PERSPECTIVAS	59
VIII. BIBLIOGRAFÍA	60

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Zonas promotoras clonadas	27
2	Oligonucleótidos utilizados para la construcción de fusiones transcripcionales en este trabajo	27
3	Combinaciones entre cepas de la colección Keio y fusiones transcripcionales	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Sistema de transporte de la fosfotransferasa (PTS)	8
2	Organización modular de los transportadores ABC	9
3	Parte de la red de regulación transcripcional en <i>E. coli</i>	13
4	Mecanismo de regulación para el consumo de L-arabinosa	15
5	Mecanismo de regulación para el consumo de D-galactosa	17
6	Mecanismo de regulación para el consumo de D-sorbitol	18
7	Integración de rutas metabólicas para el consumo de L-arabinosa, D-glucosa, D-sorbitol y D-galactosa	19
8	Mapa del plásmido pUA66 y zonas promotoras utilizadas en este trabajo	26
9	Metodología general	29
10	Comparación de la actividad promotora del plásmido pUA66 con o sin promotor	32
11	Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> K-12 cargando el plásmido pUA66 con el promotor de <i>galS</i> y sin promotor	33
12	Crecimiento poblacional de <i>E. coli</i> K-12 en distintas fuentes de carbono y sus combinaciones por pares	36
13	Actividad promotora de los FT involucrados en el consumo de L-arabinosa, D-glucosa y D-sorbitol en <i>E. coli</i> K-12	39
14	Actividad promotora de los FT involucrados en el consumo de L-arabinosa, D-glucosa y D-sorbitol en <i>E. coli</i> K-12	41
15	Actividad promotora de <i>araC</i> , <i>galS</i> y <i>gutM</i> con respecto al uso preferencial de fuentes de carbono	43
16	Curva de crecimiento de la cepa de <i>E. coli</i> K-12 silvestre y la cepa mutada en <i>galR</i> conteniendo la fusión transcripcional de <i>galS</i> o <i>galR</i>	46
17	..Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> K-12 y las cepas mutadas en los genes codificantes de los reguladores GalR y GalS	47

18	Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> K-12 y las cepas mutadas en los genes codificantes de los reguladores SrlR y GutM	48
19	Regulación del operon <i>gut</i> en cantidades limitantes de glucosa y en presencia o ausencia de D-sorbitol	50
20	Actividad promotora de la fusión transcripcional de <i>gutM</i> en fondo silvestre de <i>E. coli</i> K-12 y en las cepas mutadas en <i>crp</i> , <i>gutM</i> y <i>srlR</i>	51
21	Actividad promotora de <i>araC</i> en la cepa silvestre de <i>E. coli</i> K-12 y en las cepas mutadas en <i>araC</i> y <i>crp</i>	52
22	Actividad promotora de la fusión transcripcional de <i>galS</i> en la cepa silvestre de <i>E. coli</i> K-12 y las cepas mutadas en <i>crp</i> , <i>galR</i> y <i>galS</i>	53
23	Actividad promotora de las fusiones transcripcionales de <i>galR</i> , <i>crp</i> y <i>srlR</i> en las cepas mutadas de sus propios genes o de los genes que los están regulando	54

RESUMEN

La compilación de estudios experimentales y sus análisis teóricos nos han mostrado que las actividades de las bacterias son controladas en su mayor parte por proteínas reguladoras de la transcripción. En los procesos de regulación, los mecanismos de señalización celular, son centrales para entender la manera en que los sistemas biológicos perciben, procesan la información y modifican la expresión de los genes más adecuados para contender con un cambio en el estado endógeno o ambiental. Este estudio tiene como objetivo entender la estructura de una parte de la red regulatoria en *Escherichia coli*, particularmente la parte que incluye a los factores de transcripción, que controlan la expresión de los genes para el consumo de fuentes de carbono alternas a glucosa. Puesto que la composición química de los azúcares hacen que tengan distinta calidad como fuentes de carbono, se hipotetiza que es posible definir el orden de utilización de tres fuentes de carbono (D-sorbitol, L-arabinosa y D-galactosa) en *E. coli*, mediante el registro de la actividad promotora de los reguladores que controlan su utilización en cultivos con diferentes combinaciones de estas fuentes de carbono. Los resultados de este trabajo nos permitieron establecer el uso jerárquico de tres fuentes de carbono alternas (L-arabinosa > D-sorbitol > D-galactosa) y conocer con mayor detalle la dependencia regulatoria entre los factores de transcripción involucrados en la regulación de su consumo.

I. INTRODUCCIÓN

Los estudios históricos de la biología molecular y la disponibilidad del genoma completo de *Escherichia coli* K-12 desde 1997, la convierte en un modelo aprovechable para el estudio de las funciones biológicas en organismos procariontes, completar el conocimiento acerca de estas funciones en organismos simples nos ayuda a entender el funcionamiento de organismos complejos dando bases para el desarrollo de nuevos proyectos con aplicaciones en distintos campos científico-tecnológicos.

A través de diversos análisis teóricos se ha demostrado que las funciones bacterianas son controladas mediante la interacción entre proteínas reguladoras de la transcripción de una manera jerárquica y diferencial. Estas proteínas reguladoras, también llamadas factores de transcripción (FT), se pueden clasificar dentro de módulos biológicos según la función final que desempeñen los productos de los genes que están regulando. El uso de fuentes de carbono alternativas a glucosa involucra a alrededor de veinte factores de transcripción regulados por CRP (proteína receptora de AMPc o proteína de represión catabólica), un regulador maestro dentro de la red de regulación transcripcional de *Escherichia coli*.

Conocer la jerarquía en la utilización de las diferentes fuentes de carbono alternas a glucosa y el papel que desempeñan las proteínas regulatorias dentro de la transcripción de enzimas responsables del catabolismo de estas fuentes, es importante porque el crecimiento bacteriano se encuentra ligado a la habilidad de las células para metabolizar los diferentes nutrientes disponibles en el ambiente.

En este trabajo se buscó determinar la influencia regulatoria de los genes que codifican para los factores de transcripción que regulan el uso de fuentes de carbono alternas, cuando la célula tiene ante sí más de una fuente de carbono alterna a glucosa. Para esto hicimos uso de distintas herramientas y colecciones de bacterias, como el banco de fusiones transcripcionales de *E. coli* que incluye

algunas de las regiones promotoras de este organismo fusionadas al gen *gfpmut2*, sin promotor y la colección de mutantes de *E. coli*, Keio (que incluye una delección en cada uno de los genes no esenciales de *E. coli*). A partir de estos recursos disponibles se localizaron las fusiones transcripcionales que reportaron la actividad (transcripción) de los reguladores para la utilización de estas fuentes de carbono alternas y se construyeron las que faltan. Luego medimos su actividad en una combinación de glucosa (0.03%) y la presencia de azúcares alternos por pares en el medio de cultivo (0.2% de cada azúcar). De esta manera pudimos establecer una matriz de actividad de los reguladores correspondientes a la utilización de las siguientes fuentes de carbono alternas (en paréntesis): CRP (glucosa) AraC (arabinosa), GutM/SrlR (glucitol), GalS/GalR (galactosa).

En la segunda parte de este trabajo evaluamos la actividad de las distintas fusiones de los reguladores alternos en un fondo mutado en CRP y en el primero de los reguladores de dos cascadas, por ejemplo, en el caso de GutM/SrlR probamos la actividad del promotor de cada regulador en la mutante del otro, de manera recíproca, puesto que forman un circuito genético de dos elementos. Estableciendo así, la importancia de los factores de transcripción involucrados en el consumo de fuentes de carbono alternas a glucosa y el orden jerárquico para la asimilación de estas fuentes en *E. coli*; todo esto por medio de un análisis de fluorometría.

II. ANTECEDENTES

II.1 *Escherichia coli* K-12 como modelo de estudio

E. coli K-12 es la bacteria mejor caracterizada molecularmente, la disponibilidad de la secuencia completa de su genoma (Blattner y col, 1997) y la información actualizada (RegulonDB, Gama-Castro y col, 2008) sobre los mecanismos individuales de regulación transcripcional (regulador-promotor), la convierte en el mejor modelo para estudios de bioquímica, biología molecular y biotecnología.

La disponibilidad de herramientas como librerías genómicas y la continua actualización de las bases de datos nos hacen elegir a *E. coli* como el modelo para este trabajo. Entre estas herramientas destacan las que utilizaremos en este proyecto: i) una librería de mutantes “*in frame*” para cada uno de los marcos de lectura abiertos (ORFs por sus siglas en inglés) en *E. coli*, denominada la colección Keio (Baba y col, 2006) y ii) la librería de fusiones transcripcionales con las regiones promotoras de *E. coli*, realizada en el grupo de Uri Alon en Israel (Zaslaver y col, 2006).

Las mutaciones en los ORFs para obtener la colección Keio fueron construidas mediante sustitución de regiones codificantes con un cassette de inserción que le confiere resistencia a kanamicina (Km^R), la secuencia de dicho cassette puede ser posteriormente resuelta para dejar finalmente las mutaciones sin la resistencia (Km^S). Con esta metodología se pudieron obtener mutaciones en 3,985 ORFs conocidos y predichos y no se pudieron obtener en 303 ORFs, a los que se les considero que codificaban para genes esenciales en esta condición de cultivo.

En tanto que la librería de fusiones transcripcionales fue construida utilizando el plásmido con bajo número de copias pUA66 que confiere resistencia al antibiótico kanamicina (Km). En este plásmido se encuentra clonado el gen *gfpmut2* que codifica para una versión de rápido plegamiento de la proteína verde fluorescente

(GFP) con su propio sitio (secuencia) para unión de ribosoma, (Shine-Dalgarno fuerte) pero sin región promotora. De esta manera, en la región río arriba del gen *gfpmut2* fueron clonados cada una de las regiones intergénicas de *E. coli* con secuencias mayores a 40 pares de bases. Para asegurarse que las secuencias clonadas incluyeran a toda la región reguladora (el promotor y los sitios de unión para proteínas reguladoras) se incluyó de 50-100 pares de bases de las regiones intergénicas asegurándose de incluir fragmentos internos del ORF de interés y del ORF anterior. De tal forma que esta versión de la GFP permite reportar la actividad de las regiones promotoras clonadas en tiempos tan cortos como son menos de 5 minutos una vez iniciada la transcripción, se ha observado que la acumulación de la proteína resulta no tóxica para la célula (Zaslaver y col, 2006).

II.1.1 Tecnología de las fusiones transcripcionales

Una de las herramientas ampliamente utilizadas para el estudio de la expresión genética, son los genes reporteros. Los genes reporteros son usados cuando el producto del gen de interés es difícil de analizar. La fusión a un gen reportero nos permite identificar los factores que controlan la expresión de los genes u operones de interés.

Los genes reporteros pueden ser empleados como fusiones transcripcionales o traduccionales. En el caso de las fusiones traduccionales el gen reportero es fusionado dentro del marco de lectura del gen a analizar, de forma que cuando el gen de interés es transcrito y traducido, el producto es una proteína híbrida entre el gen de interés y el gen reportero. Por otro lado, en una fusión transcripcional el gen reportero es colocado río abajo del promotor controlando la transcripción del gen u operon de interés. De tal forma que el gen reportero es transcrito en lugar de la proteína de interés y permitiéndonos de manera indirecta cuantificar la transcripción del gen de interés (mediante el producto del gen reportero), (Ratledge y Kristiansen, 2001).

II.2 Represión catabólica por fuentes de carbono en *Escherichia coli*

Si *E. coli* crece en un medio conteniendo como fuentes de carbono a glucosa en combinación con otro azúcar como lactosa, la bacteria usa de manera preferencial la glucosa. La lactosa es metabolizada hasta que la glucosa del medio es consumida en su totalidad, una vez consumida la glucosa existe una corta fase lag (de retraso) antes de iniciar el consumo de lactosa, este comportamiento es conocido como crecimiento diauxico (Dale y Park, 2004; Görke y Stülke, 2008).

Un caso específico de la represión de un conjunto de genes en presencia de un substrato fácilmente metabolizable es la represión por un catabolito de carbono. La represión catabólica es definida como un fenómeno regulatorio por el cual la expresión de genes para el uso de fuentes de carbono alternas y las actividades de las enzimas correspondientes a este proceso, son reducidas en presencia de la fuente de carbono preferida (Görke y Stülke, 2008).

Por ejemplo, los genes del operon *lac* encargados del transporte y metabolismo de lactosa son reprimidos cuando la glucosa está presente. Esto es debido a que en presencia de glucosa los niveles de AMP cíclico (AMPc) disminuyen impidiendo la formación del complejo CRP-AMPc, el cual funciona como activador del operon *lac*, esta regulación ocurre en conjunto con el sistema de transporte de la fosfotransferasa (PTS, por sus siglas en ingles), por medio de este sistema la glucosa es introducida a la célula (Dale y Park, 2004).

II.3 Sistemas de transporte de carbohidratos en *Escherichia coli*

Muchas bacterias como *E. coli* tienen dos membranas separadas por una pared celular, la membrana celular es una barrera biológica que previene que las moléculas generadas dentro de la célula sean liberadas y que moléculas no deseadas se difundan dentro de la célula. La membrana interna actúa como barrera de permeabilidad y la membrana externa y pared celular proveen protección

adicional. La membrana externa es permeable a moléculas pequeñas debido a la presencia de porinas. La región entre las dos membranas donde se encuentra la pared celular es llamada periplásma.

Uno de los tipos de moléculas que necesitan ser transportadas al interior de la célula para ser metabolizadas son los carbohidratos. Estos compuestos forman parte de las cuatro más importantes biomoléculas junto con las proteínas, los ácidos nucleicos y los lípidos. Estas moléculas juegan diversos roles en la vida, como almacenes de energía, combustibles, intermediarios metabólicos o como elementos estructurales de los ácidos nucleicos y de la pared celular de plantas y bacterias (Berg y col, 2002).

En los estudios de la toma de nutrientes se ha demostrado que las bacterias son capaces de asimilar distintos compuestos orgánicos carbonados. Esto se logra mediante sistemas de percepción de la concentración de estos compuestos en el ambiente que resulta en la elección entre el consumo de una u otra fuente de carbono. Muchas señales percibidas del ambiente son convertidas por la célula en respuestas que involucran un cambio en la síntesis de proteínas, regulación de la actividad enzimática, entre otros procesos (Madigan y col, 2003). El transporte de azúcares es un mecanismo que se encuentra involucrado en la asimilación de fuentes de carbono y juega un papel clave en la regulación de la expresión de los genes en los operones necesarios para el consumo de estos azúcares.

Existen dos tipos principales de transporte de alta afinidad para la internalización de azúcares a la célula: el sistema de la fosfotransferasa (PTS, por sus siglas en inglés); y los cassettes de unión a ATP (ABC, por siglas en inglés). Además existe otro tipo de transporte de azúcares pero este es de baja afinidad, el cual es un transportador simporter de protones que pertenece a la superfamilia de transporte facilitado (MFS, por sus siglas en inglés). Estos tres tipos de transportadores son descritos brevemente a continuación.

II.3.1 El sistema de la fosfotransferasa (PTS)

El sistema PTS es un tipo de transporte activo exclusivo de bacterias, está involucrado en el transporte, fosforilación de azúcares y regulación de diferentes vías metabólicas, se compone de al menos tres proteínas: Enzima I (EI), proteína histidina (HPr) y la enzima II (EII). El sistema funciona como se presenta en la Figura 1; la proteína EI es autofosforilada usando fosfoenolpiruvato como donador de fosfato, luego el grupo fosfato es transferido al residuo His15 en HPr. A su vez, HPr dona el grupo fosfato a un residuo de histidina en el dominio A de la enzima EII, este grupo fosfato a su vez es transferido a el dominio B de la enzima EII. Este es el dominio encargado de la fosforilación del carbohidrato durante su transporte al interior de la célula, a través del dominio C de membrana de la enzima EII (Postma y col, 1993; Görke y Stülke, 2008).

La glucosa es el principal carbohidrato transportado por este sistema, su solo transporte ejerce cierta represión para el uso de otras fuentes de carbono. La disponibilidad del donador del fosfato del sistema PTS, el fosfoenolpiruvato, es importante ya que si la relación fosfoenolpiruvato:piruvato es alta, el dominio del transportador de glucosa ($EIIA^{GLC}$) esta predominantemente fosforilado, cuando la concentración de piruvato es más alta que la de fosfoenolpiruvato, entonces $EIIA^{GLC}$ se encuentra defosforilado. El dominio $EIIA^{GLC}$ fosforilado regula la activación de la enzima adenilato ciclasa que sintetiza AMP cíclico (AMPC), lo que permite la formación del complejo AMPC-CRP. Este último complejo es capaz de activar a los promotores de los reguladores de genes necesarios para el transporte y catabolismo de otros azúcares distintos a glucosa (Görke y Stülke, 2008).

Se supone que muchos carbohidratos que usan el sistema PTS son utilizados en preferencia a otras fuentes de carbono, ya que inducen una total defosforilación de $EIIA^{GLC}$. Esta defosforilación es la que provoca una baja expresión de los operones catabólicos respectivos y en algunos casos la inhibición de los sistemas de consumo de azúcares no acoplados al sistema PTS (Postma y col, 1993).

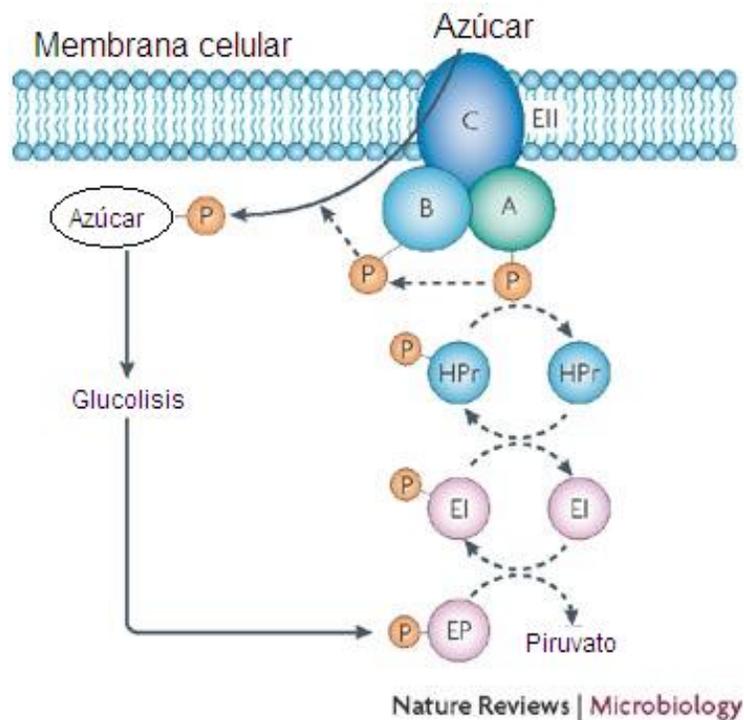


Figura 1. Sistema de transporte de la fosfotransferasa (PTS). La proteína EI inicia la cadena de fosforilaciones por autofosforilación con el uso de fosfoenolpiruvato, el grupo fosfato es transferido a HPr que posteriormente transfiere este fosfato al dominio A de la enzima EII, finalmente el grupo fosfato es donado al dominio B de EII. Este fosfato es el que servirá para fosforilar el carbohidrato una vez que es internalizado a la célula por el dominio C de EII (Görke y Stülke, 2008).

II.3.2 Transporte de cassette de unión a ATP (ABC)

Los transportadores ABC son proteínas integrales de membrana que transportan activamente moléculas a través de la membrana lipídica, contra un gradiente de concentración usando la energía derivada de la hidrólisis de ATP a ADP. Estos transportadores juegan un papel importante al habilitar a las bacterias para sobrevivir en diferentes ambientes (Linton y Higgins, 1998). En bacterias, la mayoría de transportadores ABC consisten de una proteína de unión al sustrato, dos componentes integrales de membrana y dos cassettes de unión a ATP asociados a membrana (Moussatova y col, 2008).

En bacterias Gram-negativas la proteína de unión al azúcar es una proteína periplásmica soluble que participa en la translocación del sustrato y genera señales de reconocimiento para quimiotaxia (movimiento de las bacterias usando sus flagelos), estas proteínas son capaces de unir su sustrato incluso cuando están a concentraciones tan bajas como uno micromolar. Tras la unión del sustrato a la proteína correspondiente, el complejo interactúa con el componente transmembranal respectivo y tiene lugar el transporte de la molécula al interior de la célula, esto con la ayuda de la energía liberada por la hidrólisis de ATP a ADP (Madigan y col, 2003). Una representación de los componentes y funcionamiento de los transportadores ABC se presenta en la siguiente Figura 2.

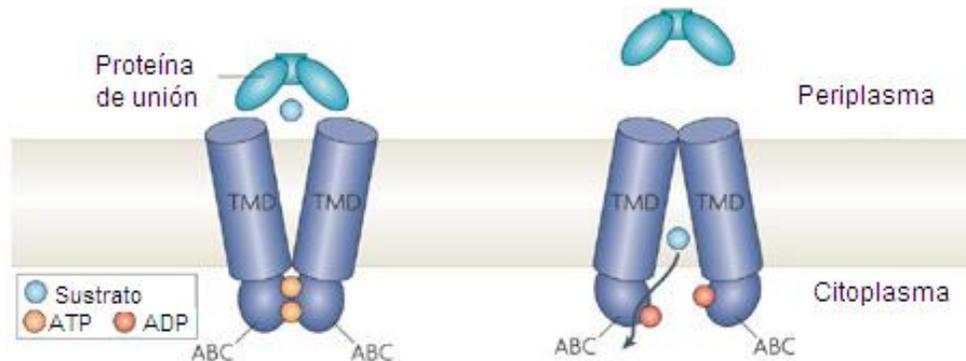


Figura 2. Organización modular de los transportadores ABC. Los transportadores ABC están compuestos de dos dominios transmembranales (TMD) y dos dominios ABC, la proteína de unión forma parte importante en el transporte de moléculas. A la izquierda se muestra la orientación del transportador al exterior, y en la parte derecha se muestra el transportador con orientación hacia el interior de la célula (Rees y col, 2009).

II.3.3 Transportadores symporter H⁺/azúcar

Los transportadores MFS son polipéptidos capaces de transportar solamente pequeños solutos en respuesta a gradientes quimiosmóticos de iones. La primera función atribuida a estas proteínas fue la de transporte de azúcares. Los transportadores MFS se dividen en 17 familias, de las cuales la familia más grande

es la de transportadores simporter de azúcares (SP, por sus siglas en inglés) con 133 miembros identificados derivados de bacterias, arqueas y eucariontes. Estas proteínas pueden funcionar como transportadores uniporter o simporter de H⁺ y sus sustratos incluyen: galactosa, arabinosa, xilosa y glucosa en bacterias (Pao y col, 1998). Como este tipo de transportadores funcionan a través de un gradiente de protones y no necesitan de otro tipo de energía como ATP, son de baja afinidad al sustrato (140-170 μM) lo que lleva a una baja eficiencia de transporte (Daruwalla y col, 1981).

Los tres tipos de transportadores mencionados arriba se encuentran localizados en la membrana interna de la célula. Una porina localizada en la membrana externa que es codificada por el gen *bglH* es la encargada de transportar los carbohidratos del espacio extracelular al espacio periplásmico. La proteína BglH forma canales en la membrana externa permitiendo la internalización de los carbohidratos. Esta porina aunque es específica de carbohidratos, no tiene predilección por un carbohidrato en particular.

II.4 Regulación de la expresión genética en *E. coli*

La regulación de la expresión genética es controlada en tres etapas principales: la producción de RNAm, la traducción del RNAm a proteína y el control de la actividad de esta proteína. Por lo que dentro de este proceso existen un gran número de pasos regulatorios: (i) el número de copias del gen, (ii) la eficiencia con la que el gen es transcrito (actividad del promotor), (iii) la estabilidad del RNAm, (iv) la eficiencia con la que el RNAm es traducido a proteína, (v) la estabilidad del producto y (vi) los eventos post-transcripcionales (Dale y Park, 2004). Sin embargo, se ha demostrado que la correlación entre la presencia de todos los productos de los genes y su transcripción es de hasta en un 80% en *E. coli*, por lo que este paso es considerado como el más importante en la expresión de genes. Por lo tanto en este trabajo nos enfocaremos en el punto (ii), es decir, a cuantificar la expresión de los genes.

II.4.1 Control transcripcional en *E. coli*

Uno de los principales mecanismos de regulación de la expresión genética en bacterias esta dado por la eficiencia de transcripción de un gen, es decir, la cantidad de RNAm producida por este gen. La eficiencia de transcripción es dependiente de la afinidad de la RNA polimerasa al promotor. En este proceso de reconocimiento del promotor por parte de la RNA polimerasa están involucradas un tipo de proteínas capaces de aumentar o disminuir la afinidad de la RNA polimerasa al promotor; estas proteínas son nombradas factores de transcripción (FT), (Dale y Park, 2004).

Los FT son proteínas reguladoras de la transcripción que normalmente poseen dos dominios: uno de control alostérico y otro de unión al DNA. El sitio de regulación alostérico en estas proteínas funciona para percibir señales ambientales mediante su unión a ciertos metabolitos (producidos endógenamente o en el ambiente) o mediante su modificación por fosforilación o mediante la interacción proteína-proteína (Kaplan y col, 2008). El dominio de unión al DNA por otro lado, permite que los FT se unan al DNA y esta acción ayuda o interfiere la actividad de la RNA polimerasa en las regiones promotoras, convirtiéndose así en activadores o represores de la transcripción respectivamente. De esta manera, los FT se pueden considerar como *switches* regulatorios puesto que tienen como *input* una señal endógena o ambiental y dan como *output* una respuesta transcripcional (Jacob, 1970).

En *E. coli* se predicen alrededor de 300 FT (Pérez-Rueda y Collado-Vides, 2000), de los cuales se tienen caracterizados molecularmente, de manera experimental, a la mitad de estos y se han revelado más de tres mil interacciones regulatorias entre estos FT y sus genes regulados (Martínez-Antonio y col, 2008).

Un conjunto de genes bacterianos pueden ser parte de una sola unidad transcripcional, conocida como operon, un operon es transcrito a partir de un solo

promotor por lo que los genes en este operon son regulados de manera coordinada. La mayoría de los genes en *E. coli* se encuentran organizados en 578 operones conocidos. Sin embargo no todos los genes controlados de manera coordinada, se encuentran arreglados en operones. En algunos casos, grupos de genes en diferentes sitios del cromosoma son regulados por una misma proteína reguladora, a este conjunto de genes bajo el control de un mismo FT se le llama, regulon (Dale y Park, 2004).

La información que conocemos sobre la estructuración del cromosoma bacteriano nos indica que muy probablemente se encuentra superenrollado en dominios individuales, esto permite que mientras se transcribe un trozo de DNA el restante permanezca sin modificaciones (Worcel y Burgi, 1972), la disponibilidad de estos dominios para su transcripción depende de la fase de crecimiento en que se encuentre la célula, es aquí donde los factores de transcripción desempeñan su papel como proteínas reguladoras de la transcripción uniéndose a sitios específicos del DNA, a otros factores de transcripción o directamente a la RNA polimerasa. La activación o inactivación de estos reguladores depende de señales o metabolitos que pueden ser producidas por la célula o percibidas en el ambiente.

II.4.1.1 Proteínas reguladoras del consumo de carbohidratos

Un tipo de sistemas de percepción del ambiente son aquellos sistemas involucrados en la percepción de metabolitos catabolizables del ambiente, como lo son las fuentes de carbono, las cuales requieren de diferentes proteínas de transporte y catabolismo para su asimilación. El uso de fuentes de carbono alternas a glucosa involucra a alrededor de veinte factores de transcripción regulados por CRP (proteína receptora de AMPc), un regulador maestro dentro de la red de regulación transcripcional de *Escherichia coli* (Martínez-Antonio y col, 2008). La estructura actual de la parte de la red, que se conoce en *E. coli* para la utilización de fuentes alternas a glucosa se presenta en la Figura 3.

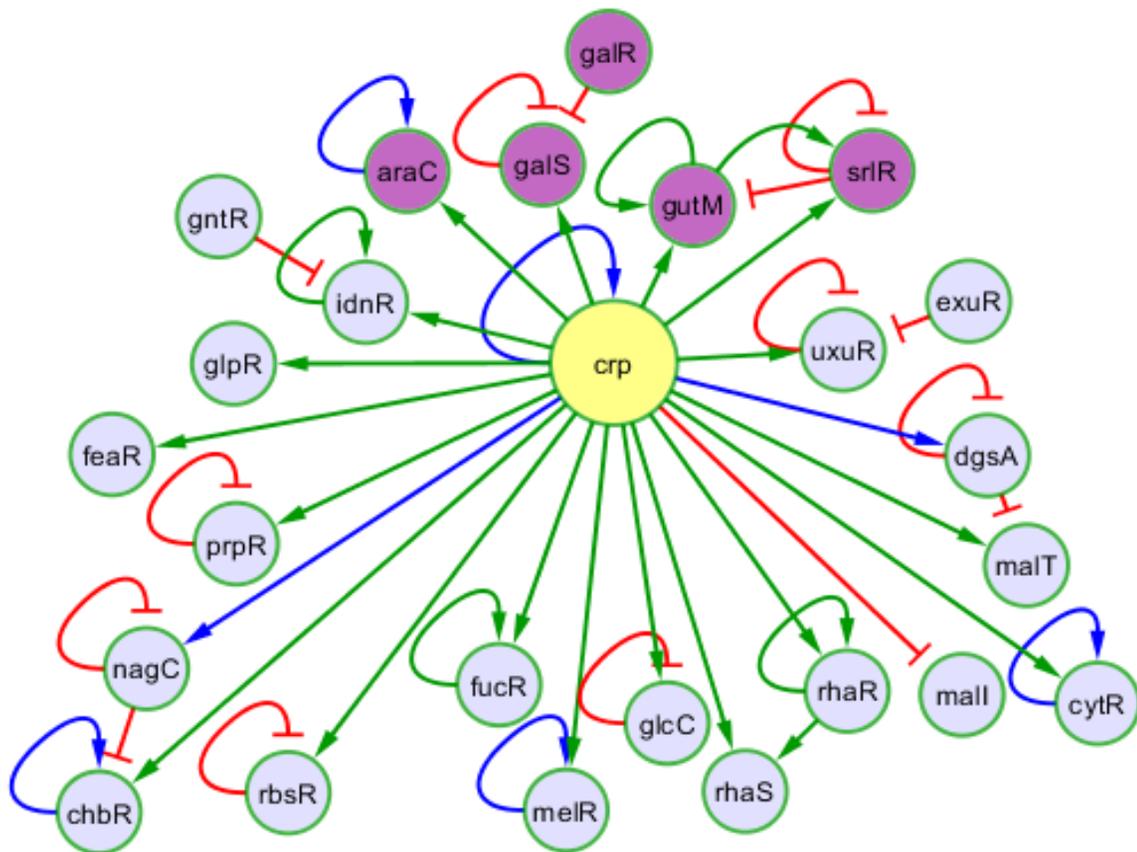


Figura 3. Parte de la red de regulación transcripcional en *E. coli*. Se muestra solamente el módulo que controla la utilización de fuentes de carbono alternas a glucosa, los nodos representan a los distintos reguladores involucrados (en color morado se resaltan los reguladores estudiados en este trabajo), las líneas verdes indican activación, las rojas represión y las azules indican actividad dual (activación y represión).

En este proceso de toma de decisiones, la actividad de CRP es central ya que dependiendo de la actividad del sistema de fosfotransferasa (PTS, que internaliza y fosforila glucosa) influye directamente en los niveles de AMP cíclico. En ausencia de glucosa en el medio, los niveles de AMPc aumentan, en consecuencia AMPc se une a CRP y activa a todos los reguladores de fuentes de carbono alternos (Gutierrez-Ríos y col, 2007), como se observa en la Figura 3. A su vez, la mayoría de estos reguladores regulan a unos cuantos genes requeridos para el transporte y primeros pasos catabólicos del azúcar respectivo hasta que estos se degradan en

unidades metabólicas que entran a la vía común de la glicólisis. De esta manera, estos reguladores alternos, se reprimen asimismo y solo se des-reprimen en presencia de su azúcar específico. De tal forma que la lógica para la utilización de alguna fuente alterna de carbono requiere dos condiciones: la ausencia persistente de glucosa y la presencia continua de una fuente alterna de carbono.

En teoría solo un regulador alterno debiera funcionar, pero se ha observado que entre más pobre sea la fuente de carbono más reguladores alternos están activos (Liu y col, 2005). Lo que ha permanecido como un gran enigma es saber si hay una jerarquía (y en caso que lo hubiera cual sería) para la utilización de fuentes de carbono alternas.

Dentro de este trabajo se está considerando el estudio de cinco factores de transcripción relacionados con el consumo de tres fuentes de carbono alternas a glucosa (entre paréntesis sus reguladores); D-sorbitol (SrlR/GutM), L-arabinosa (AraC) y D-galactosa (GalR/GalS), estos factores de transcripción son regulados positivamente por una proteína en común, CRP. La elección de estos azúcares se hizo porque la utilización de dos de ellos (D-sorbitol y D-galactosa) requiere cada uno de dos reguladores alternos a CRP en arreglos regulatorios únicos como se observa en la Figura 3. Por otro lado el uso de L-arabinosa requiere el uso del regulador de AraC que es un autorregulador dual, completando así los tres tipos de regulación: positiva, negativa y dual. A continuación se describe brevemente cada uno de estos sistemas de regulación.

II.4.1.1.1 Regulación del consumo de L-arabinosa

AraC es un FT encargado de la regulación de genes involucrados en el transporte y catabolismo de L-arabinosa (Figura 4). En ausencia de glucosa es activado por el complejo CRP-AMPc, se autoregula de manera dual y regula a genes involucrados en el transporte y metabolismo inicial de L-arabinosa (Martínez-Antonio y col, 2008), aunque para la activación de estos genes por el FT AraC, se requiere

además de la ausencia de glucosa, de la presencia de L-arabinosa (Keseler y col, 2009).

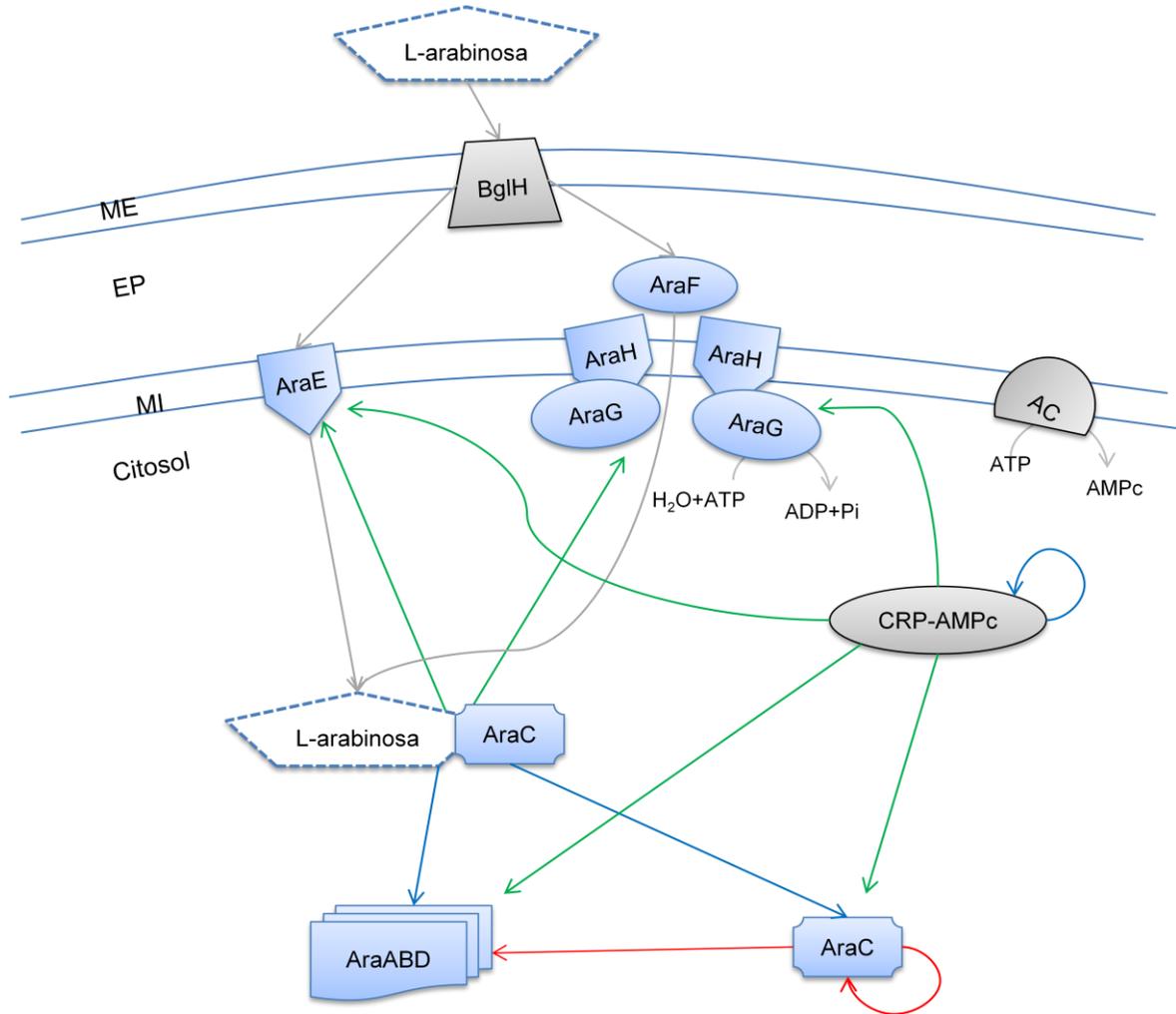


Figura 4. Mecanismo de regulación para el consumo de L-arabinosa. BglH es una porina de la membrana externa, AraE es una bomba de protones y AraFGH es un transportador ABC, AC es la enzima adenilato ciclasa, AraABD son proteínas catabólicas de L-arabinosa, AraC y CRP son FT involucrados en el consumo de este azúcar. Las flechas verdes indican activación, las rojas represión y las azules una regulación dual. Membrana externa (ME), membrana interna (MI) y espacio periplásmico (EP), (Keseler y col, 2009).

El gen *araE* y los operones *araFGH* y *araABD* codifican para proteínas encargadas del transporte y metabolismo de L-arabinosa. El operon *araFGH* codifica para un

sistema de transporte ABC de alta afinidad (4 a 6 μM) para L-arabinosa, *araE* codifica para un transportador MFS (por sus siglas en inglés, Major Facilitator Superfamily), un transportador simporter H⁺/L-arabinosa de baja afinidad (146 a 168 μM). El operon *araABD* codifica para las siguientes enzimas: una isomerasa (AraA), una ribulocinasa (AraB) y una epimerasa (AraD). Estas enzimas son las encargadas de convertir L-arabinosa hasta D-xilulosa-5 fosfato, que es degradada mediante la vía de las pentosas fosfato (Daruwalla y col, 1981; Schleif, 2010).

II.4.1.1.2 Regulación del consumo de D-galactosa

El transporte de D-galactosa está mediado por un transportador MFS de baja afinidad y un transportador ABC de alta afinidad, codificados por *galP* (Macpherson y col, 1983; Zheng y col, 2010) y el operon *mglABC* (Haramaya y col, 1983) respectivamente. El catabolismo de este azúcar se encuentra a cargo del operon *gal* el cual genera como producto a tres enzimas: una epimerasa (GalM), una galactocinasa (GalK) y uridiltransferasa (GalT). Estas enzimas convierten la D-galactosa hasta D-glucosa-1-fosfato la cual es convertida posteriormente a D-glucosa-6-fosfato para ser metabolizada por la vía de la glicólisis. La transcripción de estas proteínas de transporte y metabolismo se encuentra regulada por un represor GalR y un isorepresor GalS (Figura 5). GalR se expresa constitutivamente y reprime de manera no inducible a GalS, mientras que GalS se autoregula negativamente y es regulado de manera positiva por CRP, cuando la galactosa está presente aun en bajas concentraciones, se une a GalS, impidiendo que este reprima la transcripción de los genes codificadores para proteínas de transporte y catabolismo (Genacopulous y Adhya, 1997; Weickert y Adhya, 1993).

II.4.1.1.3 Regulación del consumo de D-sorbitol (D-glucitol)

Por otra parte, el operon *srlABE* codifica para un sistema de transporte PTS de alta afinidad a D-glucitol, el cual se encuentra bajo la regulación de SrlR y GutM al igual que el gen *srlD* que codifica para una deshidrogenasa de sorbitol-6-fosfato que

convierte a este azúcar a D-fructosa-6-fosfato que entra a la vía de la glicólisis. La información que se ha podido conjuntar de la literatura indica que *SrlR* se autoregula de manera negativa, que es regulado positivamente por CRP y a su vez regula de manera negativa a *gutM*. De forma contraria *GutM* se autoregula de manera positiva, regula también positivamente a *srlR* y es regulado de manera positiva por CRP (Figura 6) (Yamada y Saier, 1987; Martínez-Antonio y col, 2008).

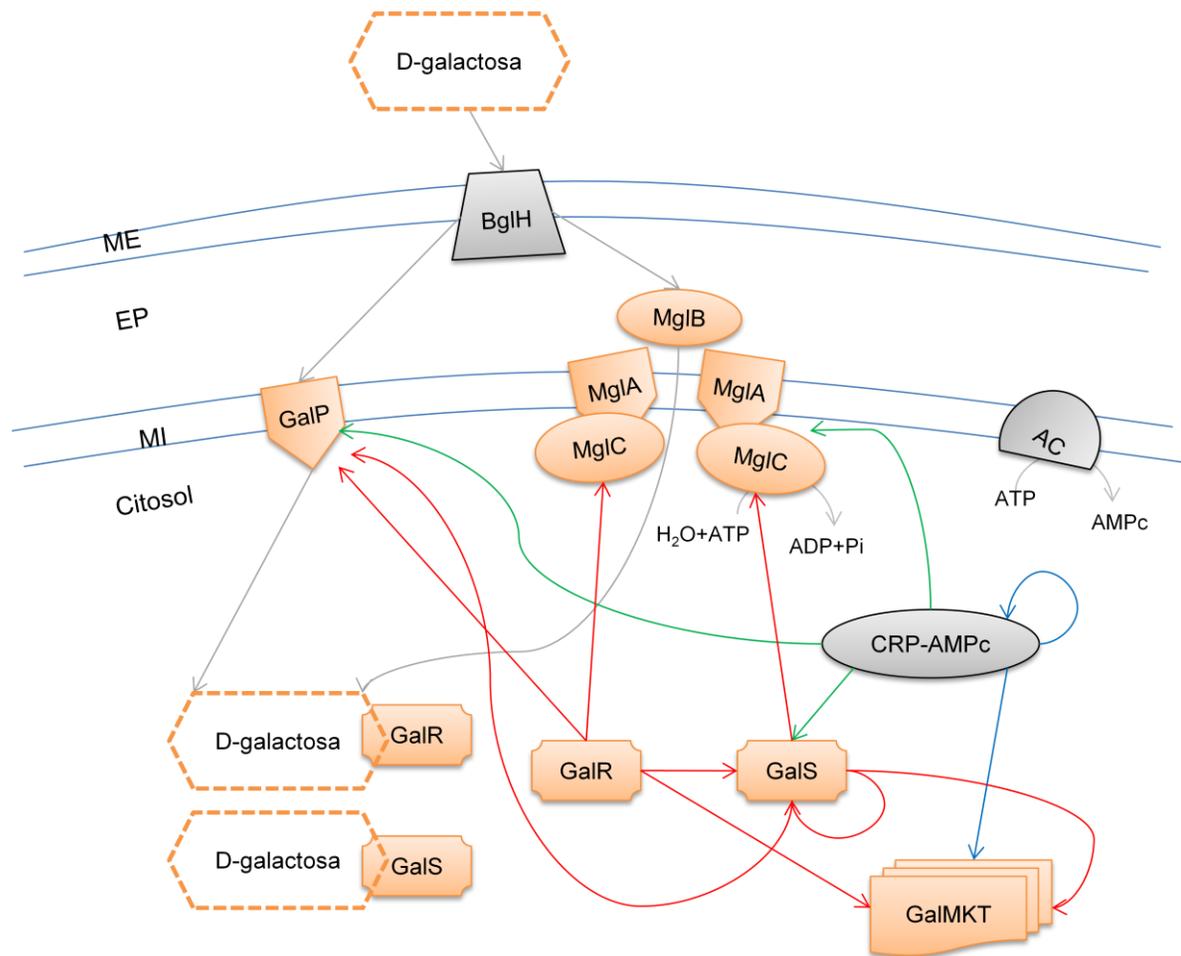


Figura 5. Mecanismo de regulación para el consumo de D-galactosa. BglH es una porina de la membrana externa, GalP es una bomba de protones, MglABC es un transportador de tipo ABC, AC es la enzima adenilato ciclasa, GalMKT son enzimas catabólicas de D-galactosa, CRP, GalS y GalR son FT involucrados en el consumo de este azúcar. Las flechas verdes indican activación, las rojas represión y las azules una regulación dual. Membrana externa (ME), membrana interna (MI) y espacio periplásmico (EP), (Keseler y col, 2009; Semsey y col, 2007).

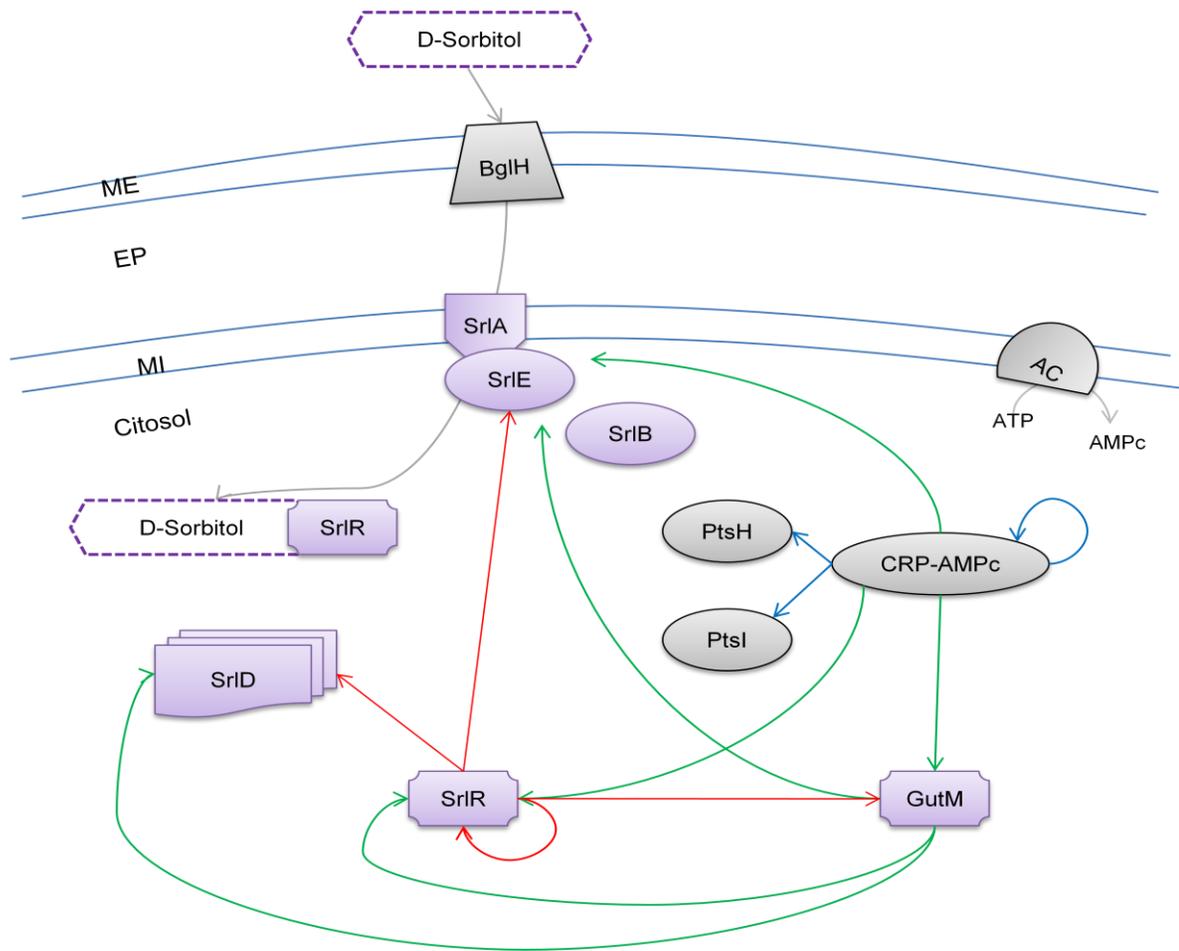


Figura 6. Mecanismo de regulación para el consumo de D-sorbitol. BglH es una porina de la membrana externa, SrIABE son proteínas específicas para el transporte de D-glucitol (PTS), PtsIH son proteínas generales del transporte PTS, SrID es una enzima catabólica de este azúcar, CRP, SrIR y GutM son FT involucrados en el consumo de D-glucitol. Las flechas verdes indican activación, las rojas represión y las azules una regulación dual. Membrana externa (ME), membrana interna (MI) y espacio periplásmico (EP), (Keseler y col 2009).

Estos tres azúcares mencionados arriba son primeramente transformados por enzimas específicas de ese azúcar para finalmente obtener un producto que en algún momento es metabolizado mediante la vía de la glicólisis. En la Figura 7 se muestran las rutas metabólicas principales para el catabolismo de estos azúcares y mediante que componente son integrados a la vía de la glicólisis.

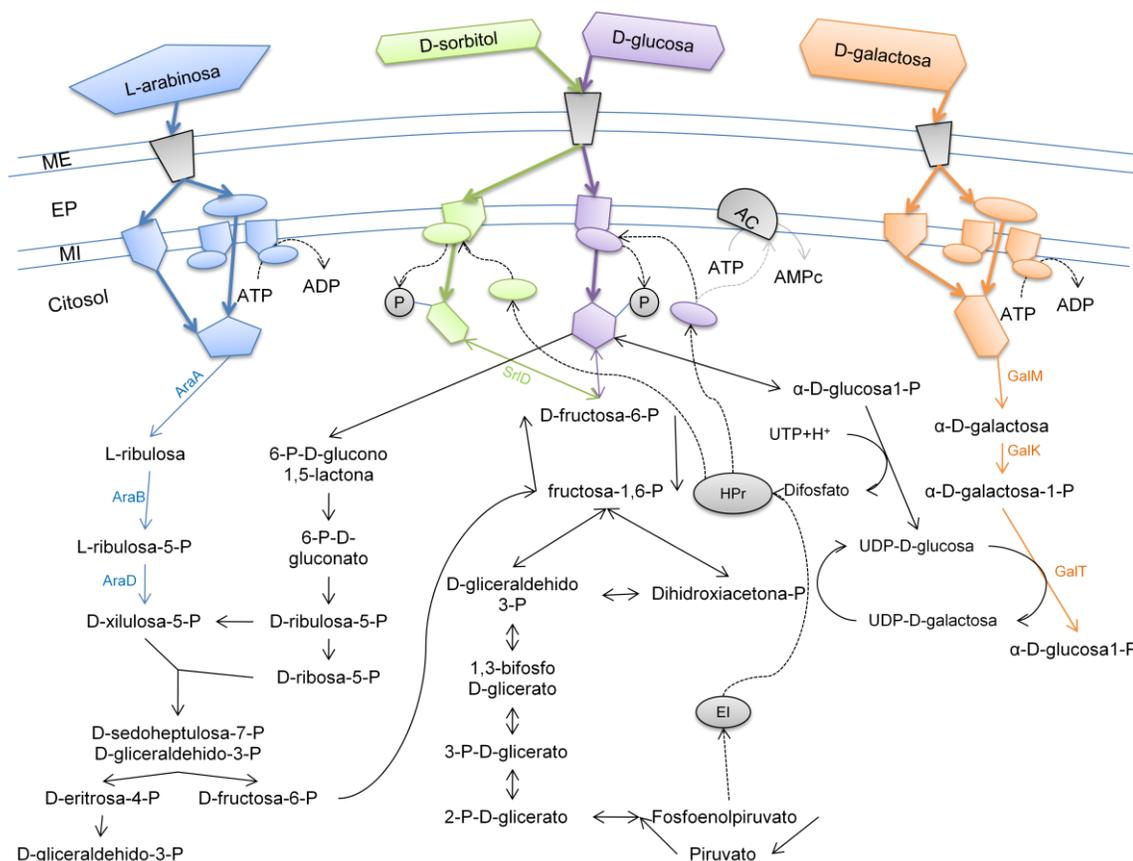


Figura 7. Integración de rutas metabólicas para el consumo de L-arabinosa, D-glucosa, D-sorbitol y D-galactosa. Los dibujos en la membrana interna y externa representan los transportadores de estos azúcares, las flechas gruesas representan el flujo para la internalización de los azúcares, mientras que las flechas más delgadas representan una enzima involucrada en la conversión de un producto a otro. En color azul se muestra el transporte y metabolismo para L-arabinosa, en color verde para D-sorbitol, en color morado para D-glucosa, en color anaranjado para D-galactosa y en color negro en la membrana externa se representa a la porina BglH. Las flechas en color negro representan el metabolismo general, a la izquierda la vía de las pentosas fosfato, en el centro la vía de la glicólisis y a la derecha la vía de Leloir para consumo de D-galactosa. Las flechas en líneas punteadas representan el flujo del fosfato para el transporte PTS (fosfoenolpiruvato:Azúcar). Las flechas en gris claro representan pasos que ocurren únicamente en ausencia de glucosa. ME, membrana externa; EP, espacio periplásmico; MI, membrana interna; AC, adenilato ciclasa.

III. HIPÓTESIS

Es posible definir el orden de utilización de tres fuentes de carbono (D-sorbitol, L-arabinosa y D-galactosa) en *E. coli*, mediante el registro de la actividad promotora de los reguladores que controlan su utilización.

IV. OBJETIVO

Determinar el uso jerárquico de tres fuentes de carbono alternas a glucosa mediante la dinámica regulatoria existente entre los genes que codifican para los factores de transcripción que regulan estos procesos en *Escherichia coli*.

V. METODOLOGÍA

V.1 Materiales

V.1.1 Cepas bacterianas

V.1.1.1 Cepa silvestre

- *Escherichia coli* K-12 MG1655

V.1.1.2 Cepas con mutaciones en genes regulatorias (de la colección Keio)

- *Escherichia coli* K-12 BW25113 *crp*
- *Escherichia coli* K-12 BW25113 *araC*
- *Escherichia coli* K-12 BW25113 *galS*
- *Escherichia coli* K-12 BW25113 *galR*
- *Escherichia coli* K-12 BW25113 *srIR*
- *Escherichia coli* K-12 BW25113 *gutM*

V.1.1.3 Banco de fusiones transcripcionales (de la colección de Alon)

- *Escherichia coli* K-12 MG1655::*araCp-gfpmut2*
- *Escherichia coli* K-12 MG1655::*galSp-gfpmut2*
- *Escherichia coli* K-12 MG1655::*galRp-gfpmut2*
- *Escherichia coli* K-12 MG1655::*srIRp-gfpmut2*
- *Escherichia coli* K-12 MG1655::*s/p (sin promotor)-gfpmut2*

V.1.1.4 Fusiones transcripcionales construidas en este trabajo (BioSistemas)

- *Escherichia coli* K-12 MG1655::*gutMp-gfpmut2*

- *Escherichia coli* K-12 MG1655::*crpp-gfpmut2*

V.1.2 Medios

- Medio LB (Luria-Bertani), (Sambrook y col, 2000)
 - Extracto de levadura (BD Bioxon)
 - Cloruro de sodio (AP High Purity)
 - Bactotripton (BD Bioxon)
- Medio mínimo M9 (Sambrook y col, 2000)
 - Dextrosa (Karal)
 - Cloruro de calcio (AP High Purity)
 - Sulfato de Magnesio (AP High Purity)
 - Sales M9; Fosfato disódico anhidro (Reasol), Cloruro de sodio (AP High Purity), Fosfato de potasio diácido y Cloruro de amonio (Karal).

V.1.3 Azúcares

- D-Glucosa (SIGMA-ALDRICH^R)
- L-Arabinosa (SIGMA-ALDRICH^R)
- D-Galactosa (SIGMA-ALDRICH^R)
- D-Glucitol (SIGMA-ALDRICH^R)

V.1.4 Otros reactivos

- Kanamicina 50 mg/ml (Usb^R)
- Agarosa (INVITROGENTM)
- Marcador de peso molecular GeneRulerTM 1Kb (FERMENTAS^R)
- Colorante para ácidos nucleicos GelRedTM (FERMENTAS^R)
- Amortiguador TE 10 mM tris-base (Usb^R), 1mM EDTA (AP High Purity)
- Amortiguador TAE 1X (AP High Purity),

- Agua desionizada

V.1.5 Kits para extracción de plásmido

- QIAGEN^R Plasmid Midi Kit

V.1.6 Equipos

- Micropipetas (RAININ^R)
- Centrifuga (BIO RAD)
- Turbo Mixer (UNICO^R)
- Balanza (Citizen)
- Campana de flujo laminar
- Termoblock (LAB-LINE^R)
- Agitador orbital (GIO GYROTORY^R)
- Agitadora de placas (Heidolph titramax 1000)
- Cámara de electroforesis (Accesolab)
- Foto documentador (Wise Uv^R BIO RAD)
- Termociclador (Select Bio Products)
- Fluorimetro (Perkin Elmer)

V.2 Métodos

V.2.1 Preparación de células quimiocompetentes

Las cepas (*E. coli* K-12 MG1655 y cepas mutadas en los genes relevantes para este estudio de la colección de mutantes Keio) se activaron en 5 ml de medio LB y se incubó a 37°C/12-16 h a 200 rpm. De los cultivos activados se transfirieron 200 µl a 50 ml de medio LB y se incubaron a 37°C con agitación de 200 rpm durante aproximadamente 2hrs. Cuando la densidad óptica a 600nm de estos cultivos estuvo entre 0.5 y 0.6 aproximadamente, se transfirió a tubos falcón y se dejó

reposar durante 20 min en hielo. Posteriormente los cultivos se centrifugaron durante 5 minutos a 4000 rpm y se desecho el sobrenadante. La pastilla se disolvió con aproximadamente 3 ml de solución fría de $MgCl_2$ 80 mM y $CaCl_2$ 20 mM y se llenó el tubo con la misma solución al volumen original. Se centrifugó nuevamente durante 5 minutos a 4000 rpm y se desecho el sobrenadante. Se disolvió la pastilla nuevamente con aproximadamente 1 ml de solución fría de $CaCl_2$ 100 mM. Finalmente se hicieron cinco alícuotas de 200 μ l en tubos eppendorf en hielo seco y se almacenaron a $-20^\circ C$ hasta su uso.

V.2.2 Extracción de plásmidos

Para la extracción de plásmidos, se utilizó el protocolo descrito por la casa comercial QIAGEN^R, para el kit Plasmid Midi.

V.2.3 Transformación de células competentes

Para la transformación se utilizaron 50 μ l de células competentes de interés (preparadas como se describe arriba), se agregaron entre 2-5 μ l (aproximadamente 500 ng de ADN) de los plásmidos con la fusión transcripcional de interés (extraídos como se indica arriba). Se incubaron durante 20 minutos en hielo, agitando suavemente el tubo aproximadamente cada 5min. Se dio un choque térmico a $42^\circ C$ durante 2 minutos. Se dejó reposar 10 minutos en hielo, se agregaron 800 μ l de medio LB y se incubó a $37^\circ C$, durante 1 hora. Se inocularon y extendieron 200 μ l en una caja petri con agar medio LB conteniendo 50 μ g/ml de kanamicina (LB+Km) y se incubó a $37^\circ C$ durante ~16 hrs.

V.2.4 Verificación de células transformadas

Las colonias que crecieron en agar medio LB+Km paso anterior fueron verificadas que contuvieran el plásmido por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en ingles) de la siguiente manera: En un microtubo para PCR

se agregaron 2.5 µl de buffer para PCR 10X (para una concentración de final de 1X), 1µl de dNTP's 5 mM, 0.4 µM del oligo directo, 0.4 µM del oligo reverso, 1.2 unidades/ul de *Taq* ADN polimerasa, 17.5 µl de agua para un volumen final de 24 µl y se disolvió lo que toma la punta de un palillo de la colonia a verificar. Los siguientes oligos se utilizaron para la prueba confirmatoria: Oligo directo 5'CCAGCTGGCAATTCCGACGT^{3'}, oligo reverso 5'CCATTAACATCACCATCTAA^{3'}.

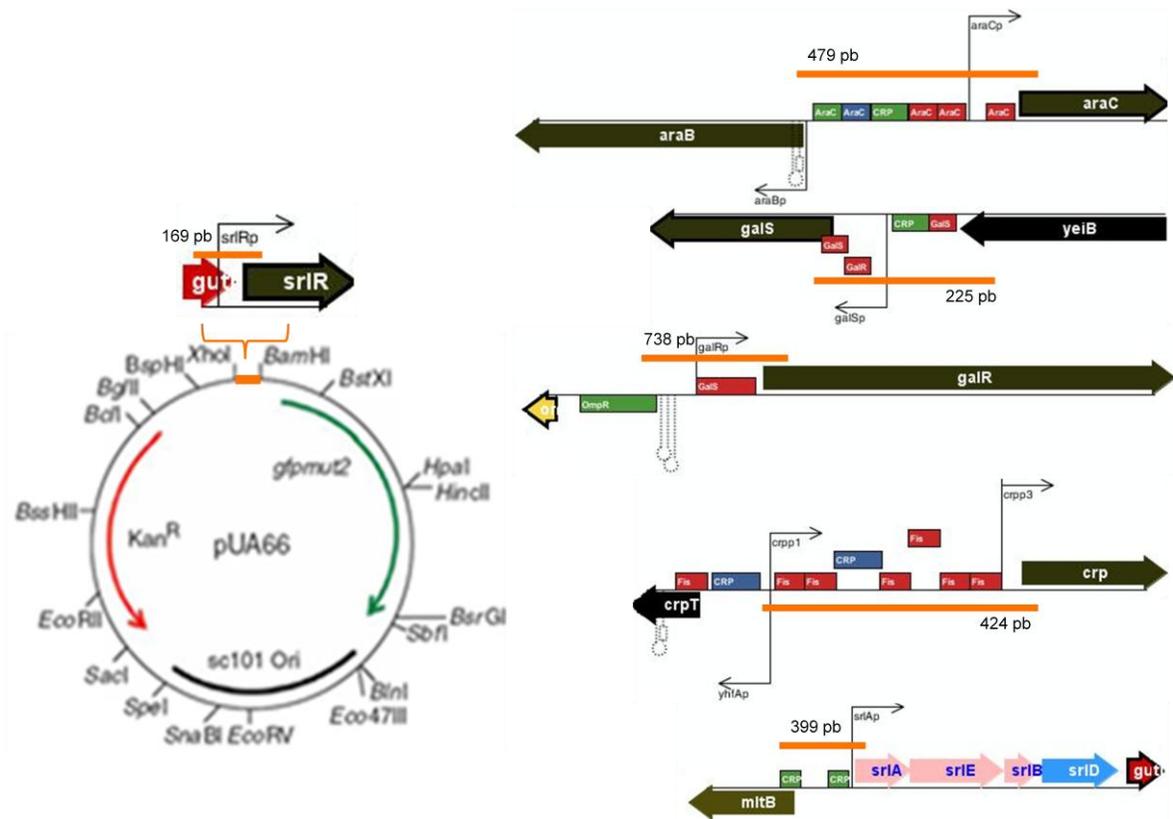


Figura 8. Mapa del plásmido pUA66 y zonas promotoras utilizadas en este trabajo. A la izquierda se muestra el plásmido pUA66 que fue usado para la creación de las fusiones transcripcionales, insertando las regiones promotoras (mostradas a la derecha) para que dirijan la expresión de GFP. Este plásmido contiene además de un gen reportero que codifica para GFP; un gen que le confiere resistencia a Km, como elemento de selección. Se utilizó también otro plásmido (pUA139), el cual solo difiere en los sitios de restricción para multiclonación que se encuentran invertidos y sirve para estudiar las regiones promotoras presentes en la cadena reversa del DNA (Zaslaver y col, 2006).

Cuadro 1. Zonas promotoras clonadas. Se muestran las coordenadas de las zonas promotoras clonadas en este trabajo (*), el resto fue obtenido del banco de fusiones transcripcionales (Alon). La secuencia genética corresponde a la cepa de *E. coli* K-12 MG1655 (NC_000913).

Fusión	Coordenadas de la zona promotora	Tamaño de la zona promotora	Vector de clonación
<i>crp</i> *	3483776-3484200	424pb	pUA66
<i>araC</i>	69973-70452	479pb	pUA66
<i>galS</i>	2239619-2239844	225pb	pUA139
<i>galR</i>	2973960-2974698	738pb	pUA66
<i>srlR</i>	2826905-2827074	169pb	pUA66
<i>gutM</i> *	2823533-2823932	399pb	pUA66

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de fusiones transcripcionales en este trabajo. Se muestran las características de los oligonucleótidos diseñados para la construcción de fusiones transcripcionales en este trabajo.

Fusión	Oligos (5´-3´)	Tamaño (bases)	Tm (°C)	Sitios de restricción
<i>crp</i>	Directo: tgatgactc <u>gaggcggattc</u>	20	67.6	XhoI
	Reverso: tggcaatgagaca <u>ggatcca</u>	20	66.7	BamHI
<i>gutM</i>	Directo: cttgctgctc <u>gaggcggcaa</u>	20	75.5	XhoI
	Reverso: ccatcc <u>ggatcc</u> acacctctccgc	24	78.6	BamHI

Los oligos anteriores están diseñados para unirse al plásmido pUA66 (Figura 8) 100 pb antes y después del inserto respectivamente amplificando nuestra zona promotora clonada más 200 pb del plásmido. Las condiciones para amplificación por PCR son las siguientes: 94°C por 5 min seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 seg,

48°C por 30 seg, 72°C por 1 min, después de concluir los 35 ciclos se dan 5 min mas a 72°C y finalmente 1 min a 4°C. El plásmido utilizado, las características y un mapa de las zonas promotoras así como los oligonucleótidos empleados para su amplificación son mostrados a continuación (Figura 8, Cuadro 1 y 2).

V.2.5 Crecimiento diauxico y evaluación de la actividad promotora

Primero se usaron fondos de la cepa silvestre de *E. coli* para estudiar la actividad de los promotores de reguladores involucrados en la utilización de fuentes de carbono alternas. Para ello se localizaran las fusiones transcripcionales ya existentes en el banco de Alon o se realizaron estas construcciones que nos reportan la actividad (transcripción) de los reguladores para la utilización de estas fuentes de carbono alternas y mediremos su actividad en una combinación de glucosa (0.03%) y la presencia de azúcares alternos por pares en el medio de cultivo (0.2% de cada azúcar): AraC (L-arabinosa), GutM/SrlR (D-sorbitol), GalS/GalR (D-galactosa).

Luego, se localizaran en la colección Keio (Baba y col, 2006) las cepas que tienen una mutación en los genes regulatorios que controlen la expresión de nuestros reguladores del consumo de azúcares alternos, incluyendo mutaciones en estos mismos reguladores en el caso que estos se auto-regulen (Cuadro 3). En la Figura 9 se muestra de forma general la estrategia experimental para llevar a cabo este trabajo.

El experimento se realizó en placas de 96 pozos utilizando medio mínimo M9 con Km (50 µg/ml). El medio contenía una concentración de glucosa al 0.03% y suplementado con una o dos fuentes de carbono alternas cada una de 0.2% de concentración. Se utilizó la siguiente denominación para referirse a las diferentes combinaciones de fuentes de carbono durante este trabajo: glucosa 0.4% (Glc 0.4%), glucosa 0.03% (Glc 0.03%), glucosa 0.03% + L-arabinosa 0.2% (Ara), glucosa 0.03% + D-galactosa 0.2% (Gal), glucosa 0.03% + D-sorbitol 0.2% (Sorb),

glucosa 0.03% + L-arabinosa 0.2% + D-galactosa 0.2% (Ara + Gal), glucosa 0.03% + L-arabinosa 0.2% + D-Sorbitol 0.2% (Ara + Sorb), glucosa 0.03% + D-galactosa 0.2% + D-Sorbitol 0.2% (Gal + Sorb).

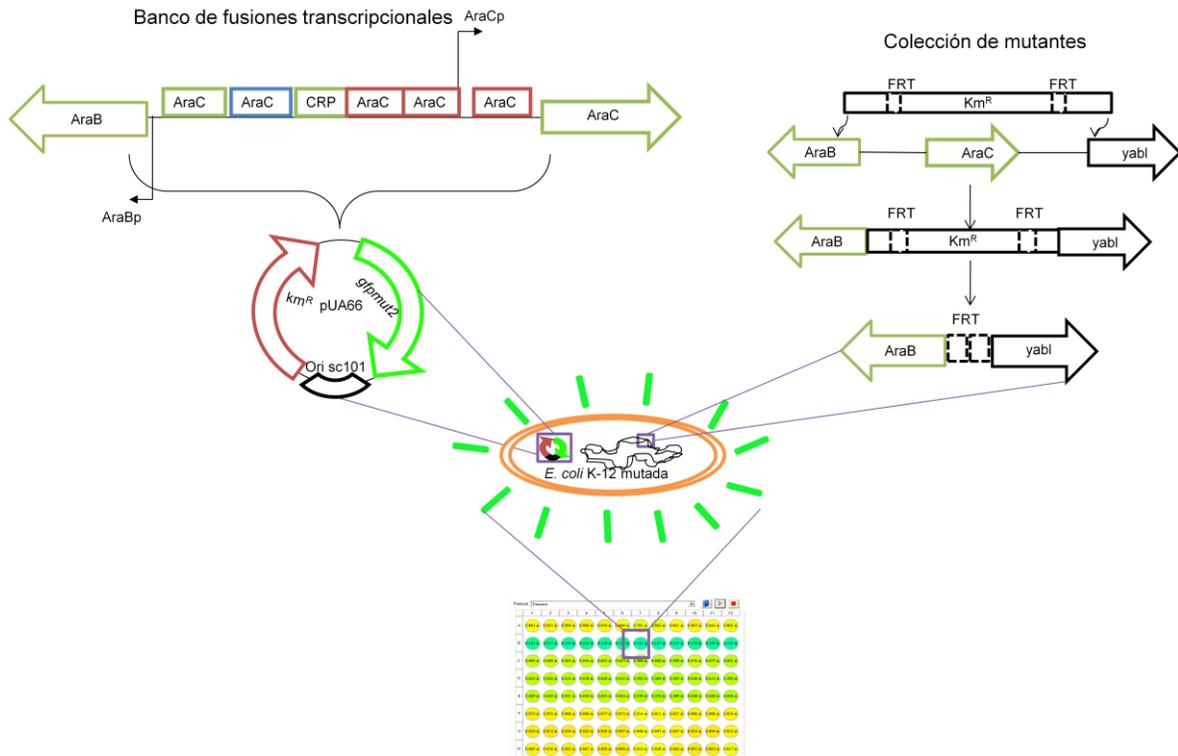


Figura 9. Metodología general. En esta figura se muestra el resumen de la metodología para el análisis de los promotores de genes reguladores del uso de fuentes de carbono alternas, en fondos silvestres y con mutaciones en sus genes reguladores. FRT, sitio de reconocimiento para FLP (una recombinasa de levadura); Km^R gen que confiere resistencia a kanamicina.

Se partió de un inóculo (de toda la noche) en medio mínimo M9 con Km, con una concentración de 0.4% de glucosa. El inóculo de la cepa se diluyó 1:100 en un volumen final de 150 µl por pozo. La densidad óptica y fluorescencia fueron medidas cada 60 min, con ayuda del fluorímetro; VICTOR™ X3, 2030 Multilabel Reader (Perkin Elmer). La Densidad Óptica (DO) se midió a 595 nm, mientras que la fluorescencia fue medida a 485 nm de excitación y 535 nm de emisión. Entre cada lectura la placa se mantuvo en incubación a 37°C y agitación de 750 rpm.

Cuadro 3. Combinaciones entre cepas de la colección Keio y fusiones transcripcionales. En la primera columna se indica la cepa a utilizar como hospedera de cada una de las fusiones transcripcionales indicadas en la segunda columna. Km^S, Sensible a kanamicina.

Cepa de fondo	Fusión transcripcional
<i>E. coli</i> K-12 MG1655 (silvestre)	<i>araCp-gfpmut2</i>
	<i>galRp-gfpmut2</i>
	<i>galSp-gfpmut2</i>
	<i>srlRp-gfpmut2</i>
	<i>gutMp-gfpmut2</i>
	<i>crpp-gfpmut2</i>
<i>E. coli</i> Δ <i>crp</i> (Km ^S de la colección Keio)	<i>crpp-gfpmut2</i>
	<i>araCp-gfpmut2</i>
	<i>galSp-gfpmut2</i>
	<i>srlRp-gfpmut2</i>
	<i>gutMp-gfpmut2</i>
<i>E. coli</i> Δ <i>galR</i> (Km ^S de la colección Keio)	<i>galRp-gfpmut2</i>
	<i>galSp-gfpmut2</i>
<i>E. coli</i> Δ <i>galS</i> (Km ^S de la colección Keio)	<i>galSp-gfpmut2</i>
	<i>galRp-gfpmut2</i>
<i>E. coli</i> Δ <i>srlR</i> (Km ^S de la colección Keio)	<i>srlRp-gfpmut2</i>
	<i>gutMp-gfpmut2</i>
<i>E. coli</i> Δ <i>gutM</i> (Km ^S de la colección Keio)	<i>gutMp-gfpmut2</i>
	<i>srlRp-gfpmut2</i>
<i>E. coli</i> Δ <i>araC</i> (Km ^S de la colección Keio)	<i>araCp-gfpmut2</i>

V.2.6 Procesamiento de los datos

La medida de DO dada por el medio M9, fue corregida restando la DO del medio sin inóculo a cada dato de DO en todos los tiempos. Opcionalmente la densidad óptica se normalizó (DOn) dividiendo la DO de cada tiempo de la cepa entre su valor máximo en el experimento, de manera que el valor máximo después de normalizar sea uno.

Puesto que la versión de la proteína GFP que estamos usando como reportero tiene una vida media larga (estimado hasta en 7 días) y con la finalidad de poder ver la actividad promotora, los valores se ajustaron mediante la derivada de la fluorescencia y el tiempo entre la DO (dGFP/dt/DO). Para posteriormente obtener la actividad promotora normalizada mediante la siguiente fórmula:

$$(dGFP/dt/DO)_n = ((dGFP/dt/DO) - V. \text{ Mín}) / (V. \text{ Máx.} - V. \text{ Mín.})$$

Donde:

(dGFP/dt/DO)_n= Actividad promotora normalizada.

(dGFP/dt/DO)= Actividad promotora sin normalizar.

V. Max.= Valor máximo de actividad promotora obtenida en el experimento.

V. Min.= Valor mínimo de actividad promotora obtenida en el experimento.

VI. RESULTADOS

VI.1 Emisión de fluorescencia por el plásmido pUA66 sin promotor

La lectura de fluorescencia emitida por la cepa que lleva el plásmido pUA66-sin promotor fue tratada de la misma forma que las otras construcciones donde si hay clonado un promotor, esto se hizo con el fin de verificar que las variaciones en la fluorescencia reportada por nuestras fusiones transcripcionales efectivamente nos reportan la actividad del promotor a estudiarse y no es debido a la expresión de GFP aún sin promotor.

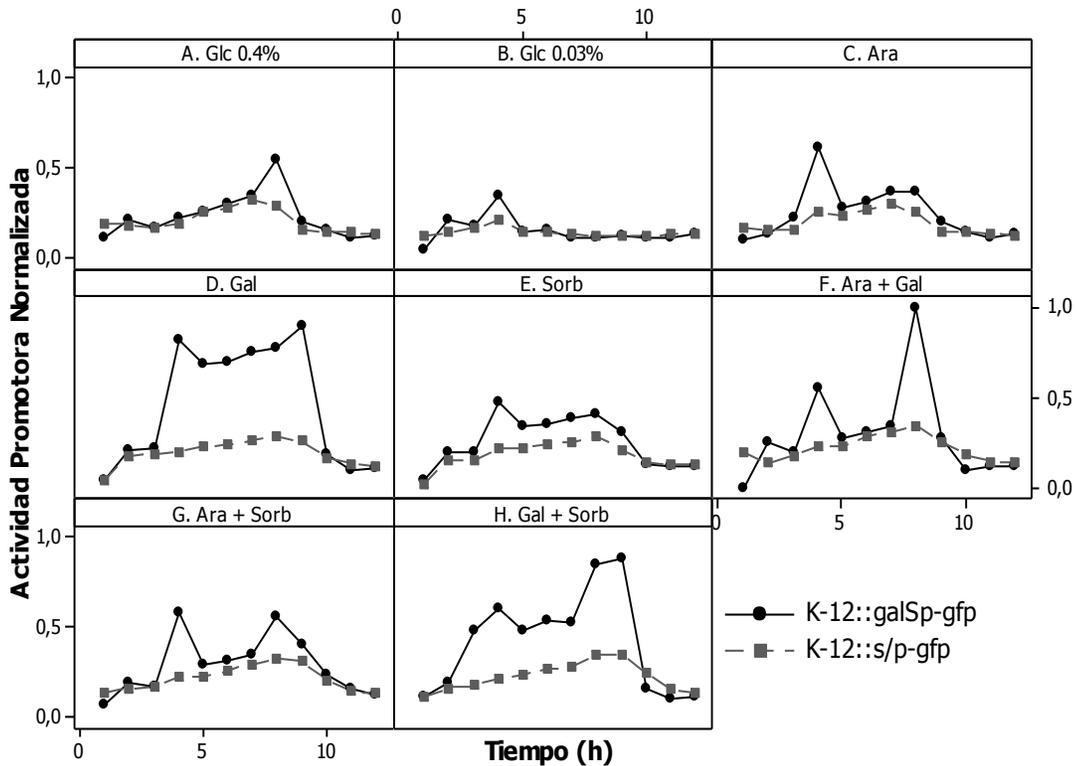


Figura 10. Comparación de la actividad promotora del plásmido pUA66 con o sin promotor. Como un ejemplo de lo que encontramos en nuestras lecturas en la gráfica se muestra la actividad promotora del plásmido pUA66 con la zona promotora de *galS* (círculos) en comparación con la expresión basal del plásmido sin promotor (cuadros). La actividad promotora fue medida en medio mínimo M9 con cantidades limitantes de glucosa en combinación con fuentes de carbono alternas.

En la Figura 10 se muestra un perfil típico de las lecturas que nos dan las cepas con el plásmido que contiene al gen *gfpmut2* sin promotor, en este caso contrastándolo con el perfil de respuesta de este mismo plásmido cuando tiene clonado el promotor de de *galS* el cual responde a la presencia del azúcar galactosa en el medio de cultivo.

La curva de crecimiento de la cepa cargando el plásmido pUA66 sin promotor también fue monitoreada y comparada con el crecimiento de la cepa cargando el plásmido con promotor (Figura 11). Esto demuestra que la presencia o ausencia de un promotor activo no tiene efecto en el crecimiento de las bacterias en distintas fuentes de carbono.

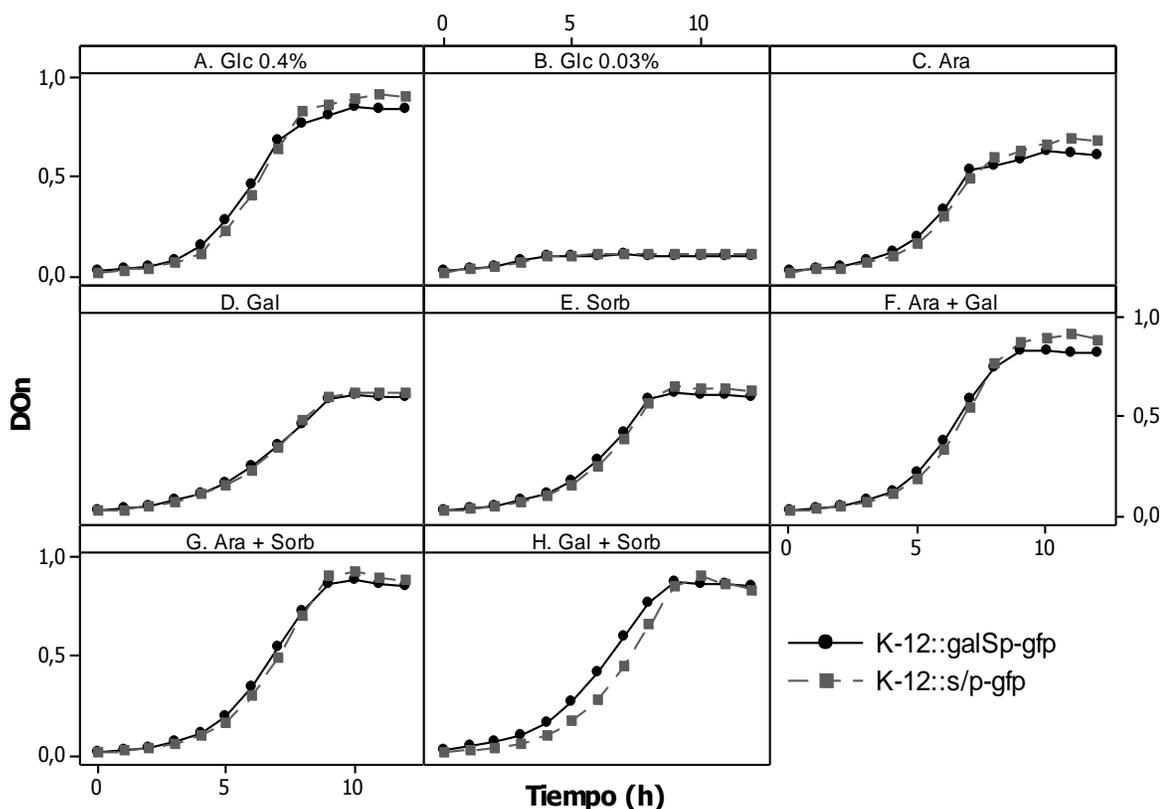


Figura 11. Curva de crecimiento de *E. coli* K-12 cargando el plásmido pUA66 con el promotor de *galS* (círculos) y sin promotor (cuadros). El crecimiento fue monitoreado en medio mínimo M9 con cantidades limitantes de glucosa en combinación con fuentes de carbono alternas.

VI.2 Estudio del crecimiento de *E. coli* K-12 en distintas fuentes de carbono.

Quisimos determinar si la preferencia entre una u otra fuente de carbono se ve reflejada en el perfil de crecimiento de *E. coli* ya sea en presencia de una de las fuentes alternas de carbono o en sus combinaciones. Esto lo hicimos sabiendo previamente que la GFP no muestra efectos tóxicos en la célula y no interfiere en el crecimiento de la bacteria (Zaslaver y col, 2006).

Analizamos los datos de densidad óptica (DO) obtenidos de las cepas de *E. coli* silvestre, transformada con las diferentes fusiones transcripcionales utilizadas en este estudio. Los datos mostrados en la Figura 12 son el promedio del crecimiento de las seis cepas de *E. coli* K-12, cargando las diferentes fusiones transcripcionales (AraC:GFP, GalS:GFP, SrlA:GFP, GalR:GFP, GutM:GFP, CRP:GFP y SrlR:GFP) en ocho diferentes condiciones que corresponden a las distintas combinaciones de azúcares: D-glucosa 0.4% (A. Glc 0.4%), D-glucosa 0.03% (B. Glc 0.03%), D-glucosa 0.03%+L-arabinosa 0.2% (C. Ara), D-glucosa 0.03%+D-galactosa 0.2% (D. Gal), D-glucosa 0.03%+D-sorbitol (E. Sorb), D-glucosa 0.03%+L-arabinosa 0.2%+D-galactosa 0.2% (F. Ara + Gal), D-glucosa 0.03%+L-arabinosa 0.2%+D-sorbitol 0.2% (G. Ara + Sorb) y D-glucosa 0.03%+D-galactosa 0.2%+D-sorbitol 0.2% (H. Gal + Sorb). Las bacterias fueron crecidas en medio mínimo M9 con Km (50ug/ml) en cada uno de las combinaciones de azúcares anteriores.

El experimento se realizó en placas de 96 pozos. Las lecturas de DO se realizaron en el fluorímetro; VICTOR™ X3, 2030 Multilabel Reader (Perkin Elmer) a 595 nm, cada sesenta minutos durante doce horas, la placa se mantuvo en incubación a 37°C con agitación de 750 rpm entre cada lectura. La DO se normalizó (DON) dividiendo cada valor en la curva entre el valor mayor de DO (Figura 12).

En las diferentes condiciones evaluadas pudimos observar las tres fases principales de la curva de crecimiento bacteriana, la fase lag o de adaptación de ~2 horas, seguida de la fase exponencial que termina aproximadamente en la décima hora y

posteriormente la entrada a la fase estacionaria. Una excepción es el crecimiento de la bacteria cuando se encuentra en condiciones limitantes de nutrientes (glucosa 0.03%), en donde la fase exponencial se encuentra ausente debido a la limitación de la fuente de carbono. De esta manera y por medio de esta curva (Figura 12, en rojo) podemos identificar el punto en que la bacteria consume la poca glucosa del medio (~3-4 horas) y comienza a hacer uso de alguna de las fuentes de carbono alternas disponibles.

El hecho de que la máxima densidad celular alcanzada por las células creciendo en una sola fuente de carbono alterna (Figura, colores verde azul y amarillo) sea de casi la mitad con respecto a cuándo hay dos azúcares alternos (Figura 12, colores rosa morado y negro punteado) coincide con la cantidad de fuente de carbono presente, por lo que las células pueden estar usando ambas fuentes de carbono si uno analiza los perfiles de crecimiento.

Observando la fase de crecimiento exponencial podemos deducir que la bacteria se divide de manera más rápida (la población crece más rápido) cuando tiene como única fuente de carbono a D-glucosa al 0.4% (Figura 12, en negro), lo que coincide con que esta bacteria tiene un mecanismo optimizado para crecer empleando a glucosa como la mejor fuente de carbono. Sin embargo, la densidad óptica final alcanzada en esta condición es menor que cuando se encuentra en cantidades limitantes de D-glucosa pero en presencia de una combinación de dos azúcares alternos, siendo la combinación de L-arabinosa y D-sorbitol donde la bacteria alcanzó la mayor densidad celular (Figura 12, en morado). Las dos combinaciones de azúcares restantes (Figura 12, en rosa y negro punteado) permitieron a la bacteria alcanzar un valor de densidad óptica ligeramente mayor que cuando se encuentra en D-glucosa como única fuente de carbono.

La fase exponencial del crecimiento bacteriano fue muy similar entre las tres combinaciones de azúcares, mostrando un adelanto de la curva de crecimiento en D-glucosa como única fuente de carbono, el cual puede ser explicado por la fase de

adaptación entre el consumo total de glucosa y el encendido de la maquinaria para la utilización de algunas de las fuentes alternas, se ha observado previamente que el crecimiento bacteriano se retrasa por ~30 min al utilizar la fuente de carbono alterna (Zaslaver y col, 2006).

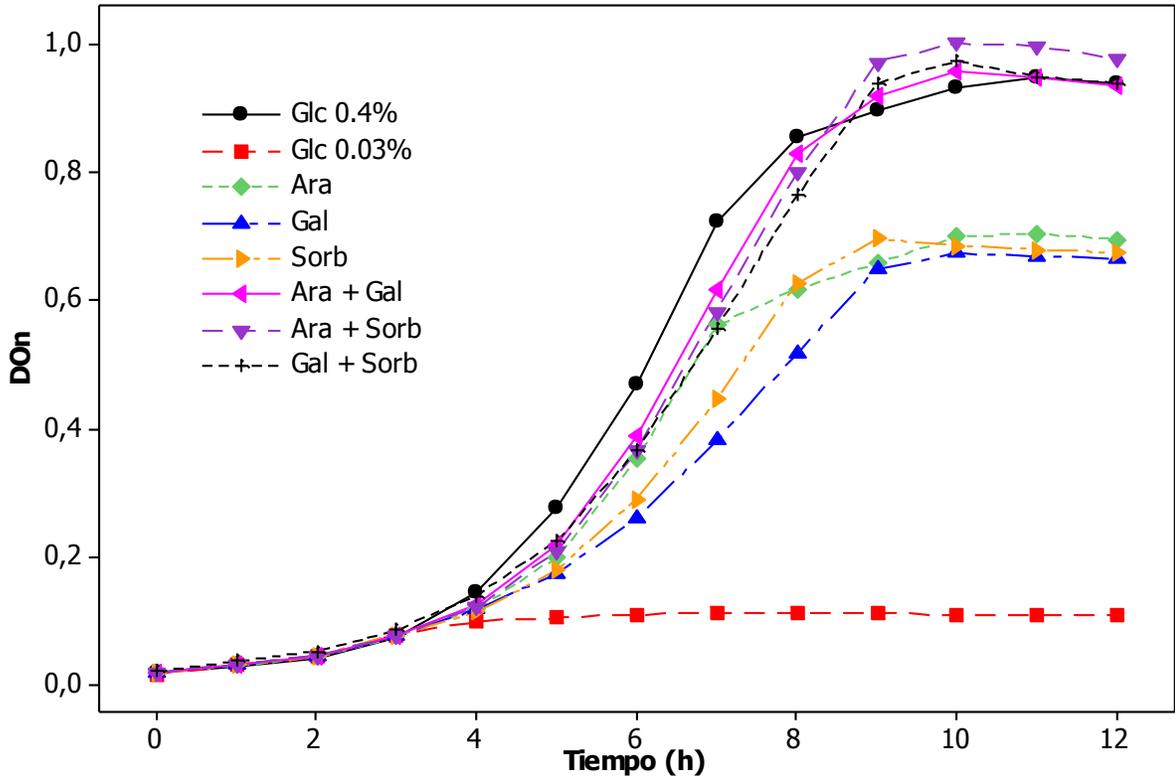


Figura 12. Crecimiento poblacional de *E. coli* K-12 en distintas fuentes de carbono y sus combinaciones por pares. El crecimiento bacteriano fue monitoreado mediante la densidad óptica de las cepas silvestres de *E. coli* transformadas con las fusiones transcripcionales, esto se midió en medio mínimo M9 con cantidades limitantes de glucosa en combinación con fuentes de carbono alternas.

El retraso en el crecimiento bacteriano fue más evidente cuando solo una fuente de carbono alterna estuvo presente en el medio de cultivo. El crecimiento más lento fue mostrado en el medio donde se utilizó D-galactosa como única fuente de carbono alterna (Figura 12, en azul), seguido de aquel donde D-sorbitol fue utilizado como fuente de carbono (Figura 12, en amarillo). La fase exponencial del crecimiento en estos azúcares, por separado, abarca de la hora cuatro a la hora

diez aproximadamente. La duración y los márgenes en que se da la fase exponencial son homogéneos en los medios evaluados.

Al llegar a la fase estacionaria (~10 horas) donde el crecimiento bacteriano se detiene, la densidad celular en presencia de D-galactosa y D-sorbitol fue muy similar. Pero un comportamiento distinto fue observado cuando el crecimiento fue medido en L-arabinosa como única fuente de carbono alterna (Figura 12, en verde). Aquí la fase exponencial (4-10 horas) parece estar dividida en dos partes; una que va de la hora cuatro a la hora siete en donde la velocidad de crecimiento es igual a cuando hay dos azúcares de forma simultánea y otra que va de la hora siete a la hora diez, donde la velocidad de crecimiento se ve disminuida considerablemente. Sin embargo, el valor de densidad óptica final alcanzado cuando la bacteria entra en fase estacionaria, es similar al observado en el crecimiento en D-sorbitol o D-galactosa por separado.

Es bien sabido que la velocidad de crecimiento de *E. coli* es mayor cuando la única fuente de carbono es D-glucosa, y se ha observado que el crecimiento en este azúcar es de manera selectiva, previniendo el uso de azúcares secundarios cuando está se encuentra disponible en el medio de cultivo (Görke y Stülke, 2008). Lo anterior coloca al azúcar D-glucosa como la fuente de carbono por excelencia para esta bacteria. L-arabinosa es después de glucosa, el azúcar que permite a *E. coli* crecer a una velocidad alta aunque esta velocidad solo se mantiene en la mitad de la fase exponencial (Figura 12 en verde). No existe una diferencia clara entre el crecimiento en las diferentes combinaciones de fuentes alternas, pero se puede observar una mayor densidad óptica en el medio con L-arabinosa combinada con D-sorbitol (Figura 12, en morado) y un crecimiento más rápido en el medio de L-arabinosa en combinación con D-galactosa (Figura 12, en rosa). Esto nos sugiere a L-arabinosa como la segunda fuente de carbono preferida de *E. coli*, entre los azúcares aquí evaluados.

El medio donde D-sorbitol fue utilizado como fuente de carbono alterna (Figura 12, en amarillo), permitió a la bacteria crecer a una velocidad intermedia entre el medio con L-arabinosa (Figura 12, en verde) y el que contenía D-galactosa (Figura 12, en azul). La presencia en el medio de una combinación de D-sorbitol con D-galactosa es la que lleva a un crecimiento bacteriano más lento (Figura 12, en negro punteado), mientras que la combinación de la primera con L-arabinosa permitió alcanzar la mayor densidad celular (Figura 12, en morado). Por lo que basándonos en los perfiles de crecimiento podemos deducir que D-sorbitol sigue en preferencia a L-arabinosa en el consumo de fuentes de carbono por *E. coli*.

Por último D-galactosa se postula como la fuente de carbono con menos calidad como recurso para sustentar el crecimiento poblacional de *E. coli*, ya que el medio que contenía D-galactosa como fuente alterna mostró el crecimiento bacteriano más lento (Figura 12, en azul). El medio con D-galactosa en combinación con L-arabinosa permitió a la bacteria crecer más rápidamente (Figura 12 en rosa) que la combinación de D-galactosa con D-sorbitol (Figura 12, en negro punteado).

Por lo tanto y siguiendo el razonamiento de que la selección de la fuente de carbono preferida es el factor determinante en la velocidad de crecimiento y que la exitosa competitividad con otros microorganismos está dada por la velocidad de crecimiento en un ambiente determinado (Görke y Stülke, 2008), sugerimos que para *E. coli* K-12 MG1655 la jerarquía en el consumo de las fuentes de carbono aquí probadas es D-glucosa, seguida de L-arabinosa, D-sorbitol y D-galactosa.

VI.3 Actividad promotora de los FT involucrados en el consumo de fuentes alternas de carbono.

Con el objetivo de determinar si el resultado del crecimiento poblacional está dado por el nivel de actividad promotora de los FT involucrados en el consumo de fuentes alternas de carbono evaluamos la actividad de las zonas promotoras clonadas en los vectores pUA66 o pUA139 con el gen reportero *gfpmut2* dentro de

un fondo silvestre de *E. coli* K-12, de los mismos experimentos de crecimiento en cantidades limitantes de glucosa y en ausencia o presencia de su azúcar inductor, a partir de las mismas placas de 96 pozos.

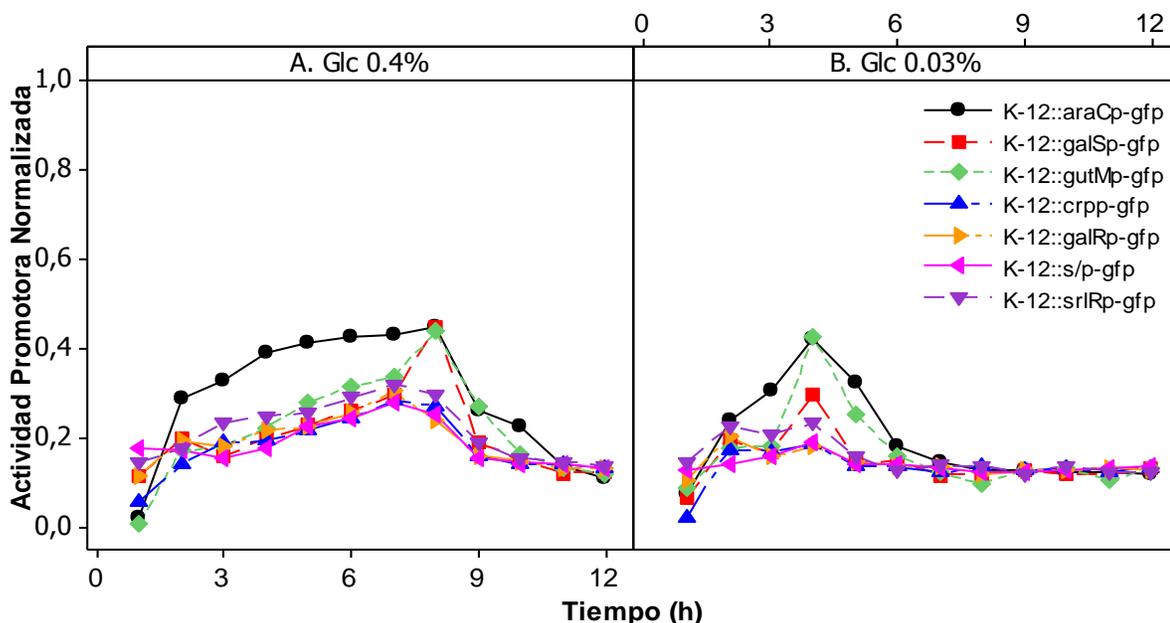


Figura 13. Actividad promotora de los FT involucrados en el consumo de L-arabinosa, D-glucosa y D-sorbitol en *E. coli* K-12. La fluorescencia emitida por las diferentes fusiones transcripcionales en alta y baja concentración de glucosa y en ausencia de su inductor, se midió cada sesenta minutos por doce horas en medio mínimo M9. La actividad promotora fue dada por $(dGFP/dt/DO)$ y fue normalizada de tal manera que el número uno en la gráfica, corresponde a la cepa que mostró el valor mayor de actividad promotora en presencia de su inductor, que fue la cepa con el promotor de *gutM* (no mostrado). La actividad promotora de la cepa silvestre de *E. coli* portando el plásmido pUA66 sin promotor fue graficada para su comparación.

En términos generales el perfil de la actividad promotora mostró un comportamiento similar para las fusiones transcripcionales; *K-12::araC-gfpmut2*, *K-12::galS-gfpmut2* y *K-12::gutM-gfpmut2*. En donde la actividad promotora se puede observar a partir de la cuarta hora coincidiendo con el punto en que la bacteria comienza a hacer uso de las fuentes alternas (Figura 12 y 13). La mayor actividad promotora mostrada para cada fusión (promotor) fue en presencia de su respectivo azúcar

inductor; L-arabinosa para la proteína AraC (Figura 14 A), D-galactosa para GalS (Figura 14 B) y D-sorbitol para GutM (Figura 14 C).

En la Figura 13 que corresponde a medios solo con glucosa en alta (A) y baja concentración (B), se muestra como la actividad promotora de los FT mencionados arriba, se elevan cuando la glucosa del medio es consumida en su totalidad aun cuando sus inductores no están presentes. El prendido de los promotores alternos coincide con el momento en que se termina la glucosa, a las 10 hrs en el medio con alta glucosa y a las 4 hrs cuando esta es escasa (Figura 13 A y B respectivamente).

El aumento en la expresión de la maquinaria para el consumo de fuentes de carbono aún en ausencia de su inductor, estaría ocurriendo de la siguiente manera. En ausencia de glucosa en el medio, los niveles de AMPc aumentan, esto tiene como consecuencia la activación de CRP mediante la formación del complejo CRP-AMPc. Este complejo permite la activación de los FT involucrados en el consumo de fuentes de carbono alternas, sin embargo, en ausencia de sus inductores los FT que son represores de sus mismos genes, después de un tiempo vuelven a reprimir la expresión de sus propios genes (Dale y Park, 2004). De esta manera, la actividad de los promotores para reguladores de azúcares alternos en estas condiciones, de ausencia de su inductor, es mucho menor que en la presencia del inductor en el medio.

En estudios anteriores se ha observado que conforme la calidad de la fuente de carbono disminuye, la cantidad de genes transcritos aumenta. Es decir, una población bacteriana creciendo en una fuente de carbono de baja calidad, mantendrá activa la maquinaria para el uso de otras fuentes de carbono que permitan una velocidad de crecimiento mayor. Esto permite que en caso de que la fuente de carbono preferida se encuentre disponible, el cambio entre el encendido y apagado de una maquinaria u otra se lleve a cabo de manera eficiente (Liu y col, 2005).

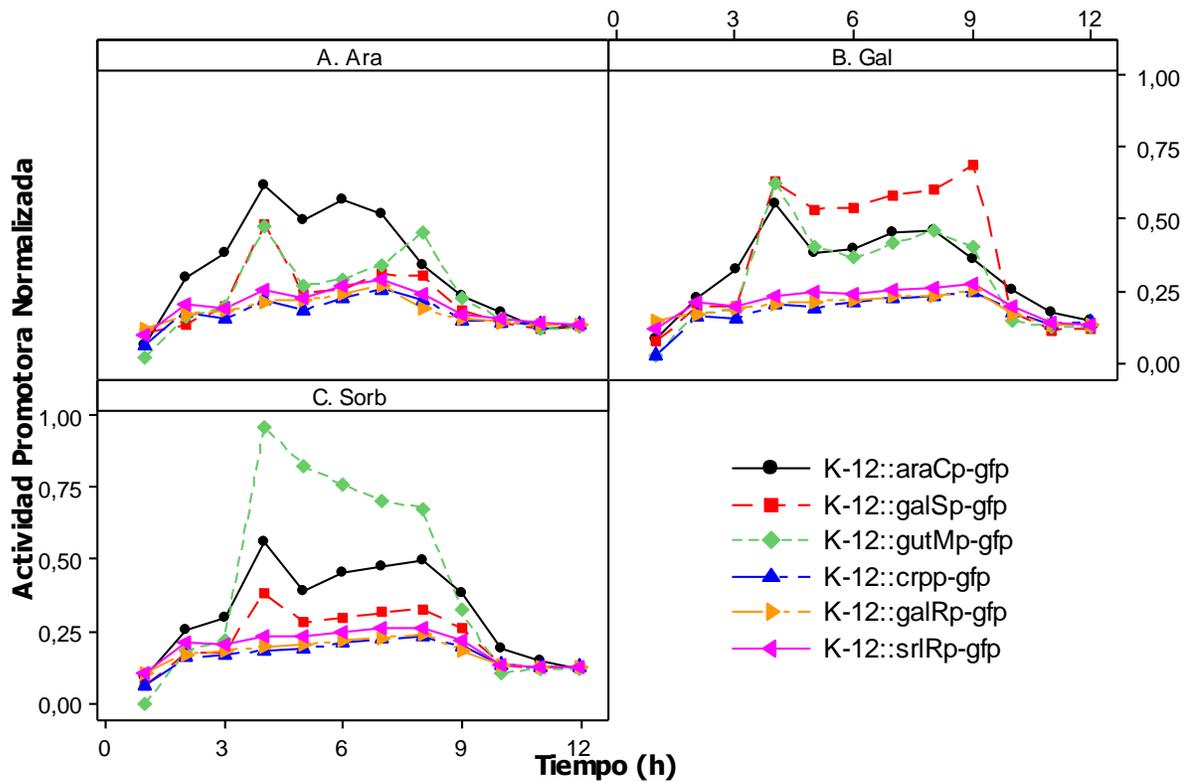


Figura 14. Actividad promotora de los FT involucrados en el consumo de L-arabinosa, D-glucosa y D-sorbitol en *E. coli* K-12. La fluorescencia emitida por las diferentes fusiones transcripcionales en presencia de su inductor se midió cada sesenta minutos por doce horas en medio mínimo M9. La actividad promotora fue dada por $(dGFP/dt/DO)$ y fue normalizada a valores entre cero y uno, siendo uno la máxima actividad alcanzada por el promotor de *gutM* (C).

Sin embargo, como observamos en este trabajo (mediante la actividad de los promotores de las proteínas reguladoras del consumo carbohidratos), la total activación de la maquinaria de consumo de una fuente de carbono requiere además de la ausencia de glucosa, de la presencia de un inductor (azúcar). De tal manera que el control directo de los reguladores o de la formación de los inductores permite a las bacterias establecer una jerarquía en la utilización de fuentes de carbono (Bruckner y Titgemeyer, 2002).

El único promotor que mostró un poco más de actividad en cantidades abundantes de glucosa y ausencia de su inductor (Figura 13 A) es el promotor del gen *araC*, a

pesar de esto la mayor actividad del promotor de *araC* se observó cuando su inductor L-arabinosa estuvo presente (Figura 14 C). La autorregulación dual (activación y represión) por parte de la proteína AraC hacia el promotor de su propio gen, puede ser la causa principal de que el promotor de este regulador se mantenga activo en niveles basales que resultan altos con respecto a los otros reguladores que son reprimidos en ausencia de sus inductores.

Las fusiones transcripcionales que nos reportan el perfil de la actividad de los promotores de *crp*, *galR* y *srIR*, mostraron una actividad que se podría definir como constitutiva en las condiciones aquí probadas (Figura 13 y 14), la cual era esperada para el promotor de CRP, ya que es un FT global, involucrado en diferentes procesos en el metabolismo de *E. coli*, por lo que esta proteína se encuentra de manera constitutiva y a altas concentraciones en la célula (Dale y Park, 2004). En el caso del promotor de *galR*, nuestros resultados coinciden con lo reportado en 1993 por Weickert y Adhya, donde muestran que el gen de *galR* es expresado de manera constitutiva y no inducible.

Por otro lado encontramos una actividad constitutiva en el promotor evaluado de *srIR*. Sin embargo en la literatura (Yamada y Saier, 1988) se encuentra reportado que la transcripción del represor S_rIR también es dirigida por el promotor del operon *gut* en una relación 3:1. Siendo menos eficiente el promotor constitutivo (el aquí evaluado). De tal manera que si consideramos esto, puede ser que la actividad promotora de *srIR* estaría siendo de la misma magnitud que la mostrada para *gutM*. Sin embargo, con las herramientas empleadas en este trabajo no podemos asegurar que así sea, por lo que queda pendiente esta verificación.

VI.4 Estudio de las actividades de los promotores de los genes reguladores para el uso preferencial de fuentes de carbono alternas a glucosa.

Con los resultados obtenidos en el apartado anterior, en donde se muestra que los promotores de *srIR* y *galR* tienen actividad constitutiva, trabajamos únicamente las

fusiones transcripcionales de *araC*, *galS* y *gutM*, ya que son claramente responsivas a la presencia de sus azúcares inductores (L-arabinosa, D-galactosa y D-sorbitol respectivamente). Entonces analizamos si usando estas fusiones podríamos definir el orden preferencial en el uso de fuentes de carbono alternas a glucosa en *E. coli* y compararlo con los resultados arrojados mediante el crecimiento bacteriano en L-arabinosa, D-galactosa y D-sorbitol. En la Figura 15 se muestra la actividad promotora de los genes regulatorios antes mencionados, en ausencia o presencia de solo su inductor y en su combinación con uno de los otros azúcares restantes. La actividad promotora fue calculada como se describe arriba.

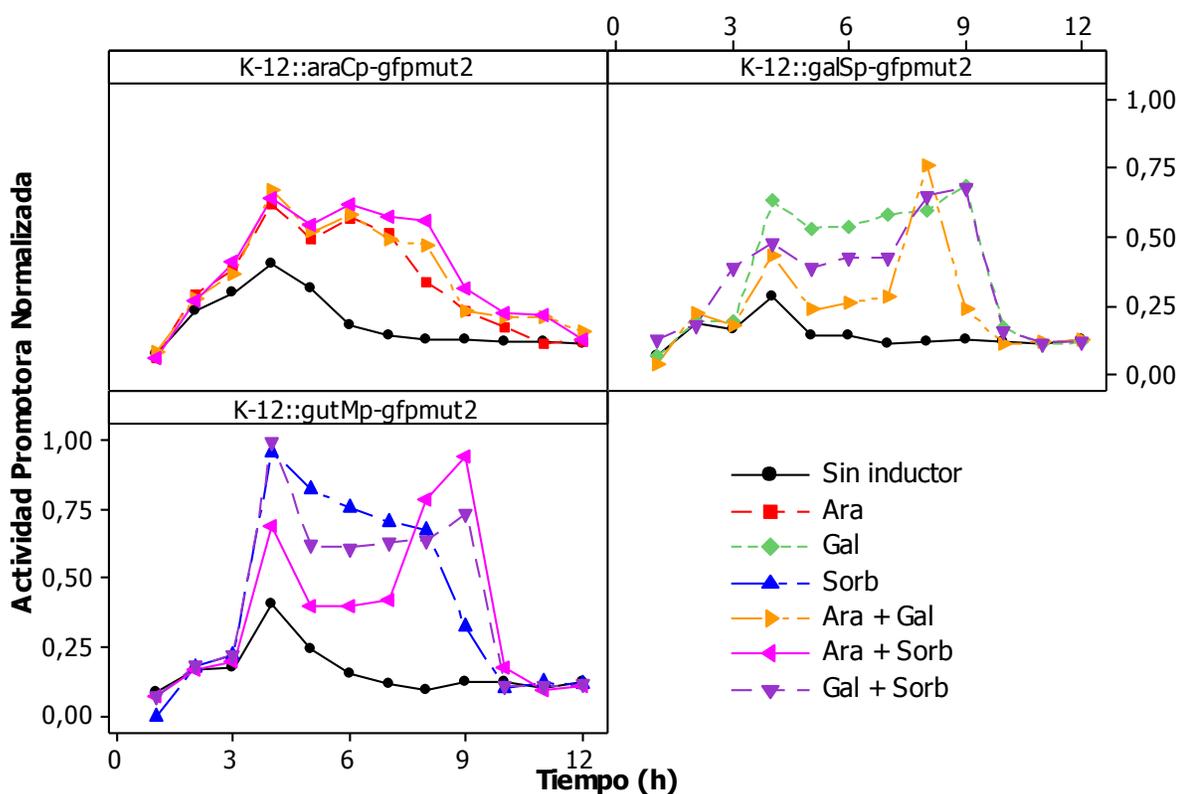


Figura 15. Actividad promotora de *araC*, *galS* y *gutM* con respecto al uso preferencial de fuentes de carbono. La fluorescencia emitida por las diferentes fusiones transcripcionales se midió cada sesenta minutos por doce horas en medio mínimo M9 suplementado con glucosa 0.03% mas el azúcar o azúcares indicados al 0.2% cada uno. La actividad promotora fue dada por el cálculo de $(dGFP/dt/DO)$ y fue normalizada a valores entre cero y uno respecto a la fusión con el valor máximo.

Debido a que la mayor actividad promotora para estos reguladores fue en presencia de su azúcar inductor, en principio deberíamos poder identificar este mismo perfil de actividad cuando están en presencia de su inductor en combinación con otros azúcares. Esto nos permitiría saber, que regulador muestra la misma actividad en presencia de una combinación de dos azúcares en comparación a cuando es evaluado únicamente con su inductor.

El promotor de *araC* fue indiferente a las combinaciones de azúcares probadas, mostrando la misma actividad promotora cuando se agregó solo L-arabinosa o cuando esta se combino con otro azúcar. Mientras que la fusión transcripcional de *gutM* mostró una actividad promotora similar cuando agregamos solo D-sorbitol que cuando este se combino con D-galactosa, en cambio, cuando D-sorbitol fue combinado con L-arabinosa, la actividad promotora de *gutM* fue más baja al principio y solo se elevó mas tarde en el cultivo, probablemente una vez que L-arabinosa fue consumida en su totalidad y entonces la bacteria usa el D-sorbitol presente.

Por otro lado, el promotor del gen *galS* mostró una actividad menor cuando su inductor D-galactosa fue combinado ya sea con D-sorbitol o con L-arabinosa a diferencia de cuando D-galactosa fue agregado como única fuente de carbono alterna (Figura 15). En estos últimos casos la actividad del promotor también vuelve a aumentar al final del cultivo posiblemente reflejando que también vuelve a activarse una vez que los otros azúcares se terminan, este efecto es más claro otra vez en presencia de L-arabinosa.

En resumen, los resultados aquí obtenidos nos sugieren que para *E. coli* K-12 MG1655 la actividad jerárquica de los promotores de los reguladores para el consumo de las fuentes de carbono aquí probadas es *araC* > *gutM* > *galS*. Este orden de actividad de los promotores es el mismo que muestran los perfiles de crecimiento poblacional respecto a la presencia de fuentes de carbono alternas a glucosa.

VI.5 Crecimiento de *E. coli* en ausencia de FT involucrados en el consumo de fuentes alternas a glucosa.

Con el fin de determinar la importancia de las proteínas regulatorias del consumo de fuentes de carbono alternas a glucosa, en presencia o ausencia de su inductor, analizamos las curvas de crecimiento de las cepas mutadas en los genes regulatorios de interés conteniendo las diferentes fusiones de los genes regulados.

En general, no se encontraron efectos en el crecimiento entre una misma mutante cargando una fusión diferente. El fondo genético de la bacteria que contiene las mutaciones en distintos genes (la colección Keio) tiene como marcador una auxotrofia a L-arabinosa provocada por una mutación en los primeros genes catabólicos para este azúcar, como consecuencia, las bacterias de esta colección no crecen en un medio conteniendo solo a esta fuente de carbono (Figura 16 C). Por lo tanto, no se pudieron hacer ensayos con bacterias de esta colección con arabinosa como la única fuente de carbono. Una observación inesperada fue el hecho de que la cepa mutada en el gen *galR* no creció cuando se transformó con la fusión transcripcional del promotor *galS*, en un medio con D-galactosa. Esta misma incapacidad de crecer se presentó aun cuando se agregó otra fuente de carbono además de D-galactosa (Figura 16 D, F y H). Curiosamente en estas mismas condiciones el comportamiento fue diferente para el caso de la misma mutante en *galR* con la fusión de *galR* que creció sin problemas en los medios que contenían D-galactosa (Figura 16).

Este comportamiento es difícil de explicar pero puede ser atribuido a que la proteína GalS tiene mayor afinidad por el sitio de unión al ADN localizado en la región regulatoria de su propio promotor que por cualquier otro sitio presente en las zonas operadoras del resto del regulon *gal* (Semsey y col, 2009). Es sabido que los reguladores que regulan a pocos genes (reguladores locales, como el caso de GalS) solo llegan a expresarse en unas cuantas decenas de moléculas en la célula cuando son requeridos (Janga y col, 2009) y en este escenario, entonces, es

posible que el plásmido con la zona promotora de *galS* este secuestrando a los productos del gen *galS* y que de este modo las enzimas catabólicas de D-galactosa se encuentren totalmente des-reprimidas (ya que el principal gen represor del operon *gal*, GalR se encuentra deletado en estos casos). Lo anterior podría llevar a un desbalance metabólico mediante el aumento en el catabolismo de D-galactosa lo que recaería en una deficiencia de UTP, impidiendo el crecimiento celular como se reporta en (Lee y col, 2009). Aquí los autores observaron que en presencia de D-galactosa, una cepa mutada en el gen de *galE* presenta una detención en el crecimiento celular por la disminución en los niveles de UTP. La disminución de UTP es ocasionada por la acumulación de UDP-galactosa, la cual podría también estar ocurriendo al aumentar el flujo de D- galactosa por la vía de Leloir.

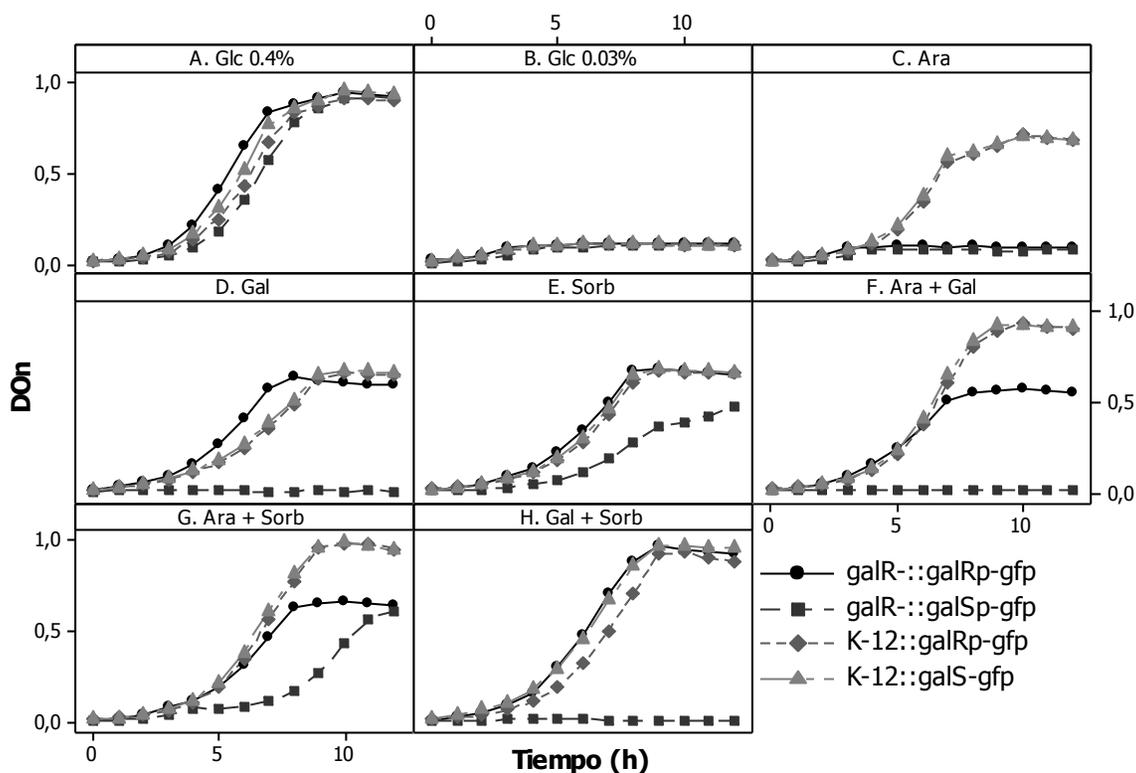


Figura 16. Curva de crecimiento de la cepa de *E. coli* K-12 silvestre y la cepa mutada en *galR* conteniendo la fusión transcripcional de *galS* o *galR*. El crecimiento fue monitoreado en medio mínimo M9 con cantidades limitantes de glucosa en combinación con fuentes de carbono alternas.

Al analizar el crecimiento de *E. coli* en los diferentes azúcares en ausencia de alguno de los reguladores involucrados en el consumo de D-galactosa. Notamos que no existen diferencias marcadas en el crecimiento de las mutantes con respecto a la cepa silvestre en las diferentes fuentes de carbono, con la excepción ya explicada de la incapacidad para utilizar L-arabinosa como recurso (Figura 17). Lo que es consistente con la función de los dos reguladores (GalR y GalS), ya que ambos actúan como represores de las enzimas catabólicas de D-galactosa (Genacopoulos y Adhya, 1997) y en ausencia de uno el otro podría estar cubriendo su función regulatoria haciendo posible el crecimiento de las bacterias en este azúcar.

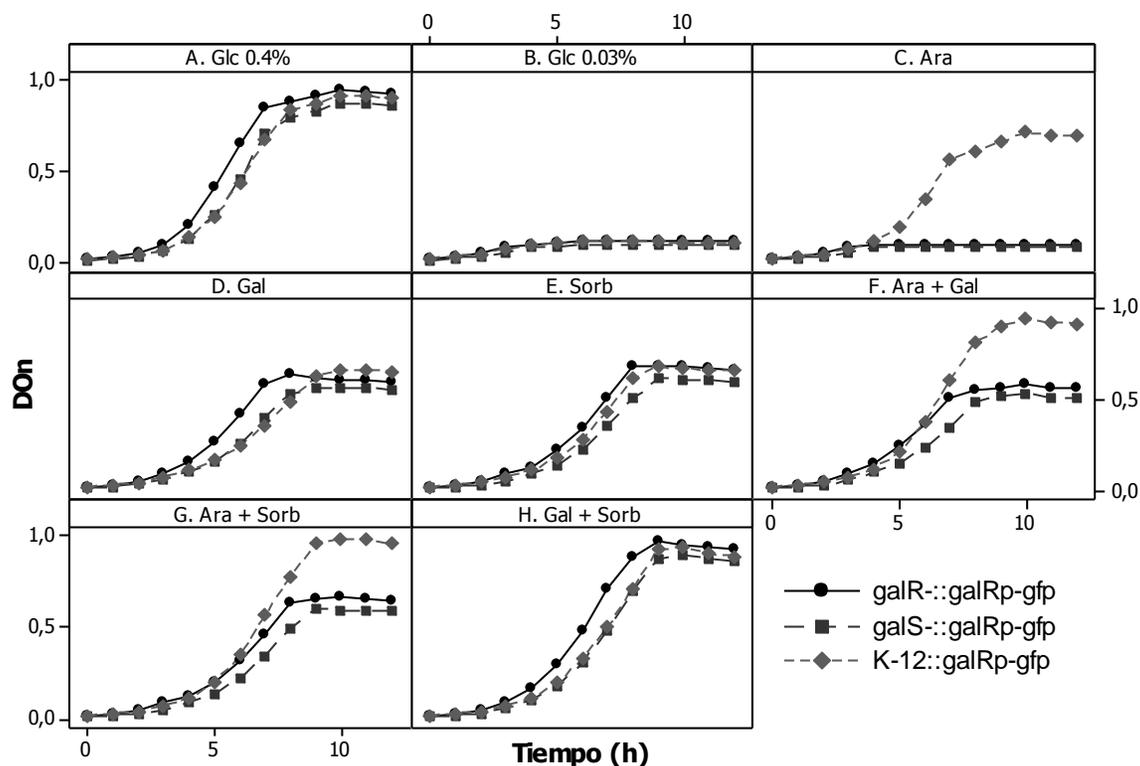


Figura 17. Curva de crecimiento de *E. coli* K-12 y las cepas mutadas en los genes codificantes de los reguladores GalR y GalS. El crecimiento fue monitoreado en medio mínimo M9 con cantidades limitantes de glucosa en combinación con fuentes de carbono alternas.

A diferencia de GalS y GalR que solo son represores de las enzimas involucradas en el transporte y catabolismo de su azúcar inductor D-galactosa (Genacopoulos y

Adhya, 1997); GutM y SrlR son proteínas que por separado están encargadas tanto de la activación como de la represión de las proteínas necesarias para el transporte y catabolismo de D-sorbitol respectivamente (Yamada y Saier Jr, 1988). Cuando analizamos las curvas de crecimiento en los diferentes azúcares en ausencia de alguno de los reguladores del consumo de D-sorbitol, observamos que en ausencia de SrlR o GutM el crecimiento fue similar cuando utilizamos como fuente de carbono un azúcar diferente a D-sorbitol (Figura 18 A, B, C, D y F).

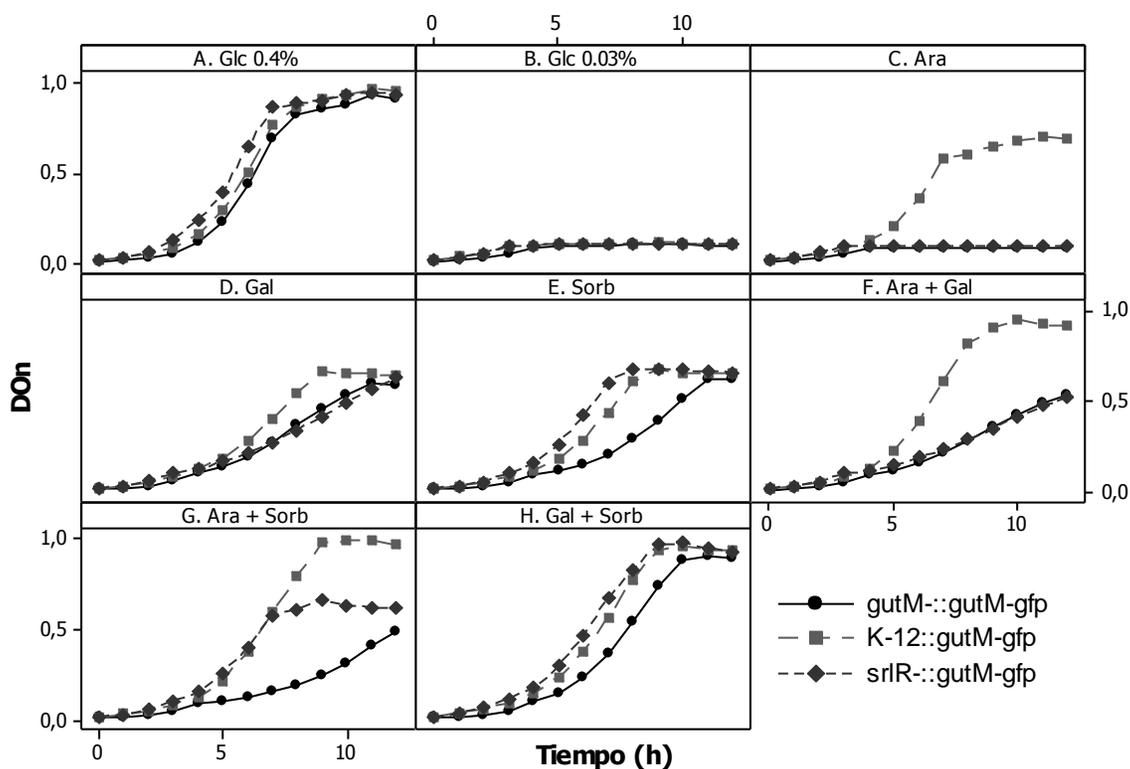


Figura 18. Curva de crecimiento de *E. coli* K-12 y las cepas mutadas en los genes codificantes de los reguladores SrlR y GutM. El crecimiento fue monitoreado en medio mínimo M9 con cantidades limitantes de glucosa en combinación con fuentes de carbono alternas.

En cambio cuando utilizamos D-sorbitol como única fuente de carbono el crecimiento de la cepa mutada en el gen del represor (SrlR) tuvo un mejor crecimiento comparado con la cepa mutada en el activador (GutM), incluso mejor que la cepa silvestre (Figura 18 E). La ausencia del activador (GutM) se vio

reflejada en una disminución del crecimiento bacteriano (*gutM::gutM-gfp*), esto comparado con la cepa silvestre. Lo anterior concuerda con la existencia de dos activadores (GutM y CRP) de los genes necesarios para el transporte y metabolismo de D-glucitol. El cambio en la velocidad del crecimiento bacteriano en ausencia de alguno de los dos reguladores (GutM y SrlR) fue observado cuando además de D-sorbitol se agregó otra fuente de carbono como L-arabinosa o D-galactosa (Figura 18 G y H). Este comportamiento nos reitera la especificidad de estas proteínas (GutM y SrlR) para actuar en la regulación del consumo de D-sorbitol.

VI.6 Dinámica de los FT involucrados en los *switches* regulatorios del consumo de fuentes alternas de glucosa.

En esta parte del trabajo se buscó determinar cómo son las dependencias regulatorias entre los factores de transcripción que están involucrados en el control del consumo de las tres fuentes de carbono aquí estudiadas. Esto lo hicimos utilizando cepas mutadas (por delección) en cada uno de los genes reguladores del consumo de estos azúcares y la evaluación de la actividad de las fusiones transcripcionales dentro de estas cepas en medios con diferentes combinaciones de azúcares. Los ensayos de medición de fluorescencia se llevaron a cabo como los descritos anteriormente.

La fusión transcripcional de *gutM* fue evaluada en un fondo con el gen *crp* deletado, en cantidades limitantes de glucosa y presencia o ausencia de D-sorbitol. Se ha reportado que CRP funciona como un activador de la transcripción de *gutM* (Lengeler y Steinberg, 1978) en ausencia de glucosa, mediante la formación del complejo CRP-AMPc (Figura 19 A). Es por esto que la ausencia de CRP podría reflejarse en una disminución en la actividad promotora de *gutM*, ya que en estas condiciones solo un activador estaría actuando para la transcripción de *gutM* (Figura 19 B). Sin embargo, se observó que la actividad promotora de *gutM* fue incluso mayor en estas condiciones (Figura 20 E), permaneciendo en los mismos

niveles que la cepa silvestre cuando el inductor no fue agregado al medio o cuando se agregó otro azúcar (Figura 20 A, B, D y F). Esto nos indica que en presencia de D-sorbitol la actividad del represor SrlR puede estar limitada (por unión con el inductor), y que la activación de GutM depende en mayor medida de su misma activación ya que esta proteína activa la transcripción de su gen codificante (Figura 19 B).

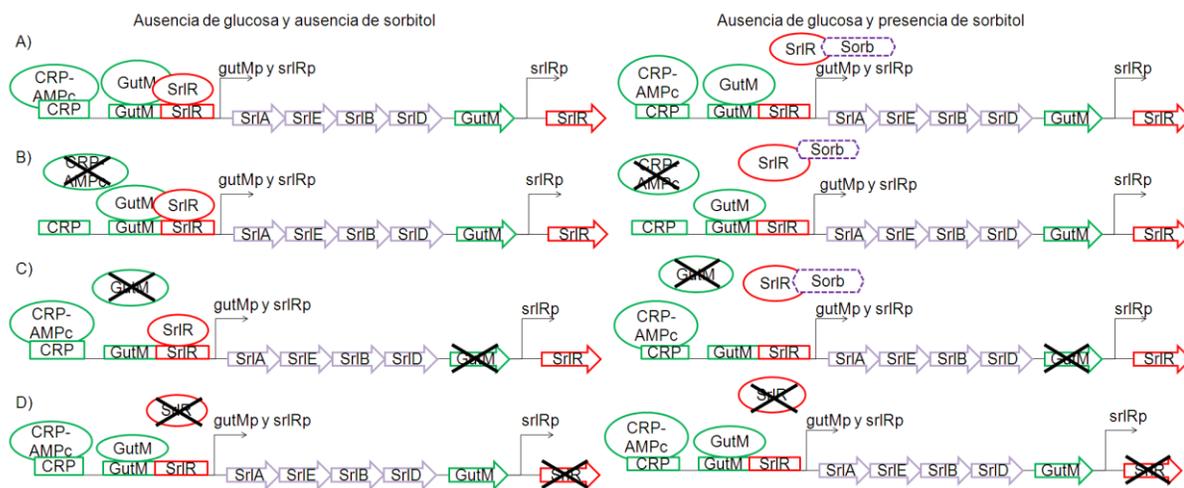


Figura 19. Regulación del operon *gut* en cantidades limitantes de glucosa y en presencia o ausencia de D-sorbitol. En la figura se muestra como podría ser la regulación de *gutM* a partir del promotor del operon *gut*. A) En presencia de los tres reguladores (CRP, GutM y SrlR), B) en ausencia de *crp*, C) en ausencia de *gutM* y D) en ausencia de *srlR*. En cantidades limitantes de glucosa y sin (a la izquierda) o con D-sorbitol (a la derecha).

Estos resultados son congruentes con la actividad promotora obtenida para la fusión transcripcional de *gutM* en una mutante con su propio gen deletado en donde se observa que en presencia de D-sorbitol la actividad promotora de *gutM* es mayor que cuando otro azúcar está presente (Figura 20 comparación entre los paneles D y E). En la Figura 19 C se muestra un modelo de la regulación del operon *gut* en ausencia del activador (GutM) y el efecto de la presencia o ausencia de D-sorbitol. En presencia de D-sorbitol la actividad represora de SrlR es limitada. Por lo que comparando la actividad de la cepa mutada en *gutM* con la cepa mutada en *crp*,

ambas en presencia de D sorbitol, estaríamos evaluando el papel como activadores tanto de *crp* como de *gutM* (respectivamente) por separado (Figura 19 B y C). Dado que la actividad promotora de *gutM* fue mayor en una mutante de *crp* que en una de *gutM* (Figura 20 E) reiteramos la observación de que la activación del promotor *gut* depende en mayor medida de GutM que de CRP.

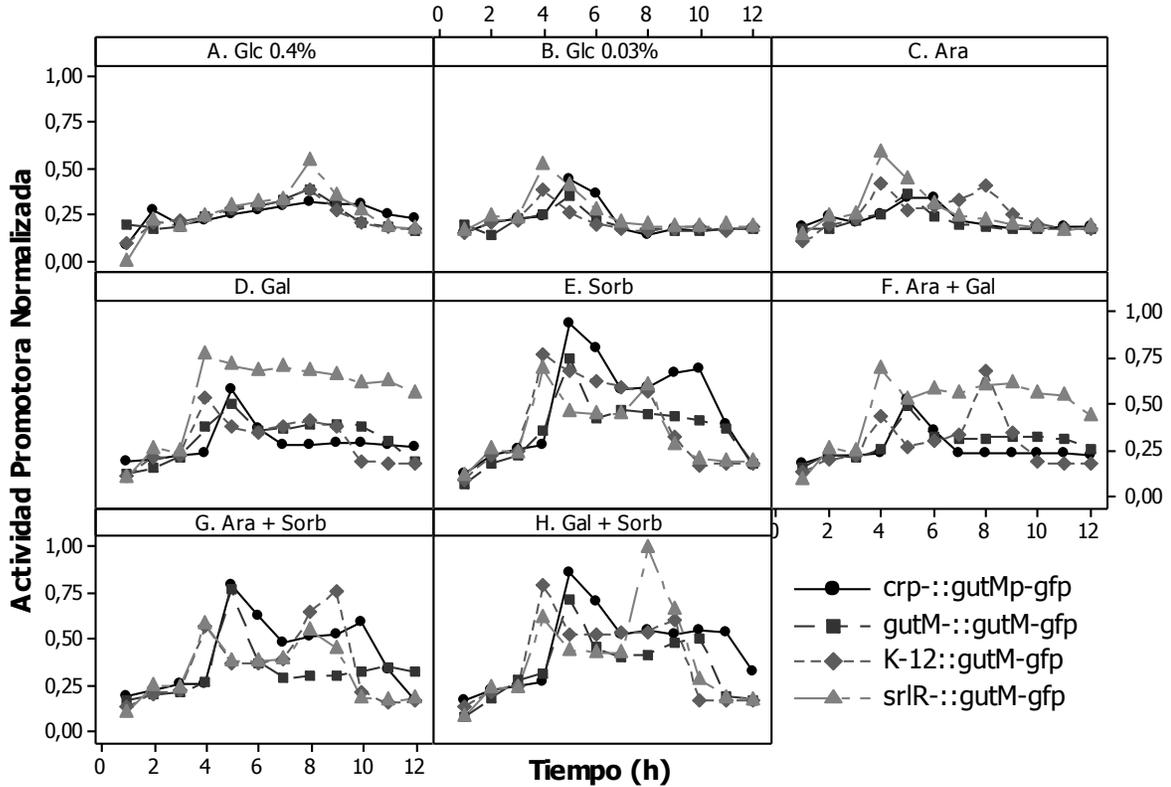


Figura 20. Actividad promotora de la fusión transcripcional de *gutM* en fondo silvestre de *E. coli* K-12 y en las cepas mutadas en *crp*, *gutM* y *srlR*. La actividad promotora fue medida en medio mínimo M9 con cantidades limitantes de glucosa en combinación con fuentes de carbono alternas.

Al evaluar la fusión transcripcional de *gutM* en un fondo con el gen de *srlR* deletado (Figura 19 D), observamos que la actividad del promotor de *gutM* fue elevada cuando el ensayo se realizó en presencia de un azúcar diferente a D-sorbitol (Figura 19, D). Pero curiosamente en presencia de D-sorbitol este aumento en la actividad del promotor de *gutM* no fue observado (Figura 20 E). A diferencia de L-

arabinosa y D-galactosa, D-sorbitol requiere del sistema PTS para ser internalizado a la célula. La enzima EIIA del sistema de transporte PTS se encuentra totalmente des-fosforilada en presencia de un azúcar PTS. En consecuencia la enzima adenilato ciclasa no se encuentra activa y el AMPc no puede ser sintetizado para formar el complejo CRP-AMPc. De esta manera podríamos explicar como una mutante en *SrlR* (el sensor de D-Sorbitol) refleja dos perfiles de actividad diferentes para el promotor de *gutM*, en ausencia o presencia del inductor (D-sorbitol).

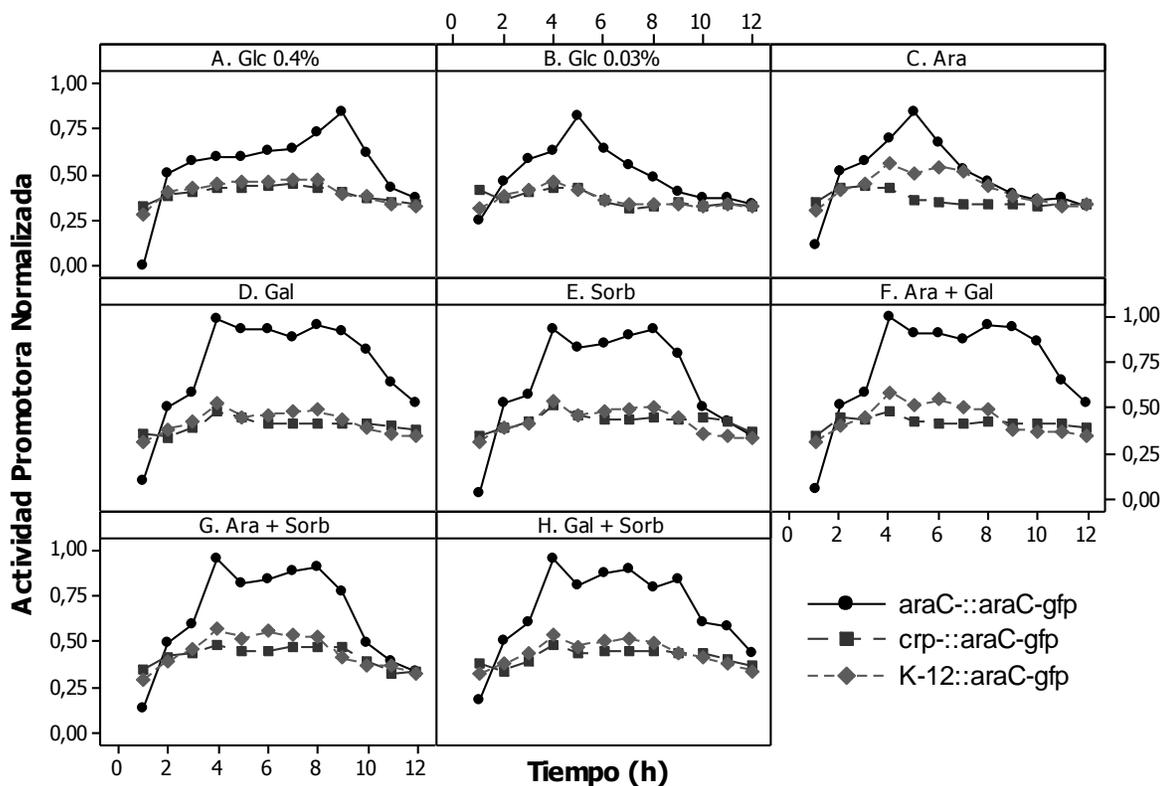


Figura 21. Actividad promotora de *araC* en la cepa silvestre de *E. coli* K-12 y en las cepas mutadas en *araC* y *crp*. La actividad promotora fue medida en medio mínimo M9 con cantidades limitantes de glucosa en combinación con fuentes de carbono alternas.

Para los elementos de regulación del consumo de L-arabinosa no fue posible obtener datos acerca del papel que desempeña el inductor L-arabinosa sobre los reguladores involucrados en su consumo dado que las cepas mutadas en los genes codificantes de los reguladores de AraC y CRP, fueron incapaces de crecer en los

medios conteniendo L-arabinosa. Sin embargo, fue posible apreciar la actividad represora de la proteína AraC hacia su propio promotor, esto mediante la actividad promotora mostrada por *araC* cuando fue evaluada en su propia mutante en presencia de glucosa, esta actividad fue mayor a la mostrada por la cepa silvestre (con el gen *araC* intacto), (Figura 21).

Aunque CRP actúa como un activador de la transcripción de *araC*, la delección de *crp* no se ve reflejada en una disminución de la actividad de *araC* en ninguna condición (Figura 21). Por lo que seguramente la activación de *araC* depende en mayor medida de su propia activación que de la activación por CRP.

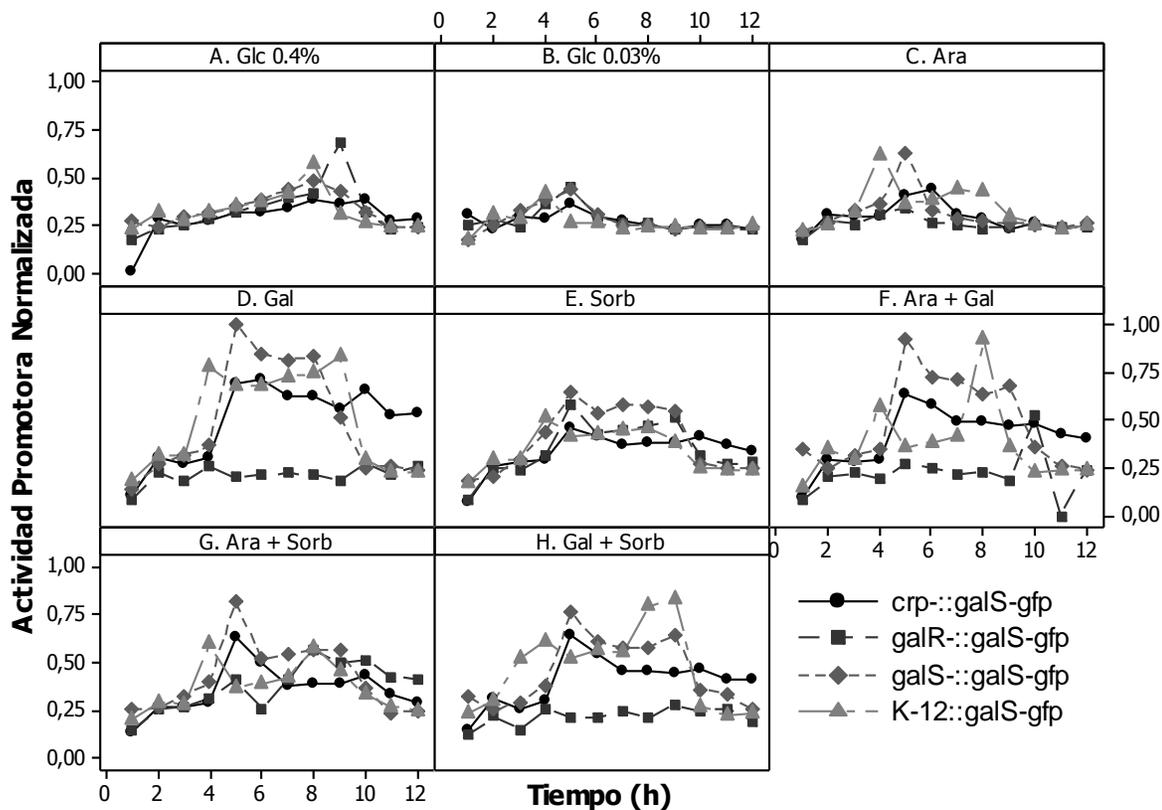


Figura 22. Actividad promotora de la fusión transcripcional de *galS* en la cepa silvestre de *E. coli* K-12 y las cepas mutadas en *crp*, *galR* y *galS*. La actividad promotora fue medida en medio mínimo M9 con cantidades limitantes de glucosa en combinación con fuentes de carbono alternas.

Por otro lado, en el circuito GalR-GalS el aumento en la actividad promotora de *galS* cuando su propio gen fue deletado, reitera la autorregulación negativa de este FT (Semsey y col, 2009), (Figura 22 D, E, F, G y H). La actividad promotora de *galS* cuando el gen de *crp* fue deletado, disminuyó con respecto a la cepa silvestre (Figura 22 D, F, G y H). Sin embargo, la actividad de *galS* sigue siendo notoria, muy seguramente porque una vez mas (al igual que para *gutM* y *araC*) la presencia de CRP no es el factor determinante para activación de la transcripción de *galS*. Aunque en este caso la actividad promotora de *galS* es debida la des-represión y no a la activación de su promotor por parte de CRP.

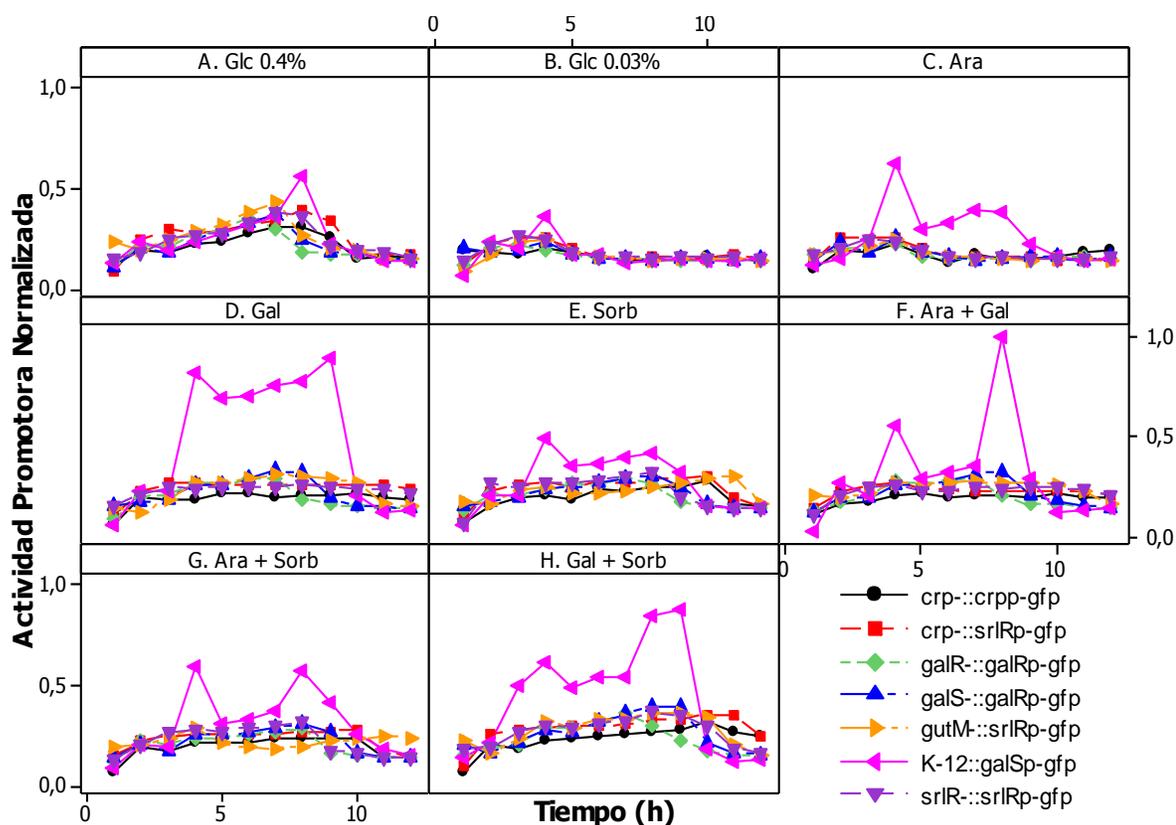


Figura 23. Actividad promotora de las fusiones transcripcionales de *galR*, *crp* y *srlR* en las cepas mutadas de sus propios genes o de los genes que los están regulando. Se muestra la actividad promotora de *galS* para comparación. La actividad promotora fue medida en medio mínimo M9 con cantidades limitantes de glucosa en combinación con fuentes de carbono alternas.

Con el gen de *galR* deletado y en ausencia de D-galactosa, la actividad promotora de *galS* no fue alterada (Figura 22 E), este mismo resultado había sido reportado anteriormente (Weickert y Adhya, 1993). Este resultado concuerda también con el hecho de que el promotor de *galS* se encuentra reprimido principalmente por GalS y no por GalR.

Las fusiones transcripcionales de *crp*, *srlR* y *galR* no mostraron cambios en su actividad promotora aun cuando fueron evaluadas en cepas mutadas en estos mismos genes o en aquellos codificantes para reguladores pertenecientes a su circuito. Tampoco mostraron respuesta a los diferentes azúcares utilizados en este estudio (Figura 23).

VI. DISCUSIÓN

En este estudio se observó que la bacteria *E. coli* discrimina de manera efectiva la utilización de fuentes de carbono y esto aparentemente tiene una estrecha relación con el tipo de regulación de los genes codificando tanto para los factores de transcripción como para las enzimas necesarias para el transporte y catabolismo de fuentes alternas. Es muy probable que la preferencia entre utilizar un azúcar y otro este denotada desde la estructuración del circuito regulatorio que controla su consumo.

Por ejemplo, en este estudio sugerimos que D-galactosa es el azúcar de menos calidad (entre los aquí probados) para el crecimiento poblacional de *E. coli*. Esto podría estar relacionado con el tipo de circuito regulatorio para el consumo de este azúcar, en donde la transcripción de los reguladores y por lo tanto de las enzimas necesarias para la internalización y consumo de la fuente de carbono, dependen principalmente de la des-represión de sus promotores y no de su activación. Este circuito está controlado por dos represores independientes aunque responden al mismo azúcar inductor.

Caso diferente sucede para el circuito de regulación para el consumo de D-sorbitol. En donde la activación de la transcripción de los reguladores, transportadores y demás enzimas necesarias, es llevada a cabo mediante la des-represión de sus promotores y además por la activación directa de GutM. Es decir, el circuito está controlado por dos reguladores pero uno activa y el otro reprime.

El caso del regulador del consumo de L-arabinosa (AraC) la fuente de carbono que permite el mejor crecimiento poblacional en *E. coli* después de glucosa, tendría una relación con el hecho de que la actividad de su regulador se mantiene en niveles basales (en ausencia del inductor) más altos que la actividad de los otros reguladores. Esto permitiría a la bacteria que en caso de que el azúcar L-arabinosa se encuentre disponible en el medio, la maquinaria para su transporte y consumo

sea rápidamente activada. En este caso, aunque el control del sistema está dado por una activación y una represión, la diferencia radical con respecto al control del consumo de D-sorbitol es que en este caso el control está dado por un solo regulador que controla sus niveles de manera dual, es decir, este sistema se asegura de que siempre este prendido el sistema para el consumo de L-arabinosa.

Se podría pensar que la lógica que sigue la bacteria para la preferencia en la utilización de fuentes de carbono alternas a glucosa, está determinada por la similitud con la estructura del azúcar preferente. Es decir, como la fuente de carbono preferida por *E. coli* es glucosa, la lógica diría que la segunda fuente preferida (entre las aquí probadas) sería D-galactosa, ya que la estructura de estos dos azúcares difiere únicamente en un centro quiral, manteniendo la misma fórmula química. Sin embargo, los resultados de este trabajo sitúan a D-galactosa como la fuente de carbono con menos calidad para el crecimiento de *E. coli*.

Contrario a lo que se pensaría de que la estructura tiene relación con la elección entre una y otra fuente de carbono, en este trabajo observamos que la fuente de carbono que demostró mayor calidad para el crecimiento de *E. coli* fue L-arabinosa, aunque este azúcar difiere en fórmula química y por lo tanto en estructura con el azúcar glucosa. Es por esto que podemos decir que la elección entre una u otra fuente de carbono se da a nivel de regulación de las enzimas necesarias para su consumo y no está determinada por la estructura del azúcar.

VII. CONCLUSIONES

Encontramos una correspondencia entre las velocidades de crecimiento en un azúcar dado y la actividad promotora del factor de transcripción regulando el proceso de consumo de este mismo azúcar. Por lo que la jerarquía de utilización sería como sigue; D-glucosa, L-arabinosa, D-sorbitol y por ultimo D-galactosa.

Los promotores de los factores de transcripción que estudiamos en este trabajo muestran sus mayores actividades en presencia de su azúcar inductor y su total activación requiere de dos condiciones; la ausencia de glucosa y la presencia del azúcar inductor. Además se observó que la activación de estos reguladores depende en mayor medida de su propia activación o de la des-represión de sus propios promotores por presencia del inductor, dejando en segundo plano el papel que juega la activación por CRP.

VII. PERSPECTIVAS

El presente trabajo nos permitió montar y validar la metodología experimental para analizar el uso jerárquico de fuentes de carbono en la bacteria *E. coli*. En este trabajo además de analizar la utilización jerárquica de azúcares transportados por distintos sistemas celulares, nos permitió conocer la dinámica regulatoria cuando dos factores de transcripción están involucrados en la utilización de una misma fuente de carbono alterna: como en el caso de sorbitol y galactosa. Pareciera ser que la preferencia de utilización de una fuente de carbono en el fondo tiene relación con el arreglo del circuito estudiado en el siguiente orden de preferencia: un solo autorregulador dual (AraC-arabinosa) > autorregulación dual dado por dos reguladores (SrlR, GutM-sorbitol) > doble autorepresión dado por dos represores independientes (GalR, GalS-galactosa). Por lo tanto, este trabajo sienta las bases para que en un futuro cercano se valide esta propuesta y se pueda analizar el uso jerárquico de más fuentes de carbono alternativas en esta bacteria.

Además, con este trabajo encontramos fenómenos interesantes de seguir analizando, por ejemplo, el realizar experimentos que nos permitan determinar el motivo por el cual la cepa $\Delta galR::galSp-gfpmut2$ no fue capaz de crecer en presencia de galactosa.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Andersen, C., Rak, B. y Benz, R. 1999. The gene *bglH* present in the *bgl* operon of *Escherichia coli*, responsible for uptake and fermentation of b-glucosides encodes for a carbohydrate-specific outer membrane porin. *Molecular Microbiology*: 31: 499-510.

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L. y Mori, H. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*: 1744: 4292-4306.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L. y Stryer L. 2002. *Biochemistry*. 5ta. Ed., W. H. Freeman and company, New York: 453-458, 515-527.

Blattner, F. R., Plunkett III, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. y Shao, Y. 1997. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*: 277: 1453-1462.

Bruckner, R. y Titgemeyer, F. 2002. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS microbiology letters*: 209: 141-148.

Dale, J. W. y Park, S. F. 2004. *Molecular genetics of bacteria*. 4ta. ed., John Wiley & Sons Ltd, Inglaterra: 67, 71-74, 84-85.

Daruwalla, K. R., Paxton, A. T. y Henderson, P. J. F. 1981. Energization of the transport systems for arabinose and comparison with galactose transport in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*: 200:611-627.

Gama-Castro, S., Jimenez, V., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A. Peñaloza-Spindola, M. I., Contreras-Moreira, B., Segura-Salazar, J., Muñoz-Rascado, L., Martinez-Flores, I., Salgado, H., Bonavides-Martinez, C. Abreu-Goodger, C., Rodriguez-Penagos, C., Miranda-Rios, J., Morett, J., Merino, E., Huerta, A. M. y Collado-Vides J. 2008. RegulonDB (version 6.0): gene regulation model of *Escherichia coli* K-12 beyond transcription, active (experimental) annotated

promoters and Textpresso navigation. *Nucleic Acids Research*: 36: Database issue:D120-4.

Genacopulous, M. y Adhya, S. **1997**. Functional Characterization of Roles of GalR and GalS as Regulators of the gal Regulon. *Journal of Bacteriology*: 179: 228-234.

Görke, B. y Stülke, J. **2008**. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews*: 6: 613-624.

Gutierrez-Ríos, R. M., Freyre-Gonzalez, J. A., Resendis, O., Collado-Vides, J., Saier, M. y Gosset, G. **2007**. Identification of regulatory network topological units coordinating the genome-wide transcriptional response to glucose in *Escherichia coli*. *BioMed Central Microbiology*: 7: 53.

Harayama, S., Bollinger, J., Lino, T. y Hazelbauer, G. I. **1983**. Characterization of the *mgl* Operon of *Escherichia coli* by Transposon Mutagenesis and Molecular Cloning. *Journal of Bacteriology*: 153: 408-415.

Jacob, F. **1970**. *La Logique du Vivant, Une Histoire de L'Hérédité*. Gallimard. Paris.

Janga, S. C., Salgado, H. y Martínez Antonio, A. **2009**. Transcriptional regulation shapes the organization of genes on bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Research*: 37: 3680-3688.

Kaplan, S., Bren, A., Zaslaver, A., Dekel, E. y Alon, U. **2008**. Diverse two-dimensional input functions control bacterial sugar genes. *Molecular Cell*: 29: 786-792.

Keseler, I. M., Bonavides-Martínez, C., Collado-Vides, J., Gama-Castro, S., Gunsalus, R. P., Johnson, D. A., Krummenacker, M., Nolan, L. M., Paley, S., Paulsen, I. T., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Shearer, A. G. y Karp, P. D. **2008**. EcoCyc: A comprehensive view of *Escherichia coli* biology. *Nucleic Acids Research*: 37: 464-470.

Lee, S. J., Trostel, A., Le, P., Harinarayananb, R., FitzGerald, P. C. y Adhyaa, S. **2009**. Cellular stress created by intermediary metabolite imbalances. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 106: 19515-19520.

Lengeler, J. y Steinberg, H. **1978**. Analysis of the regulatory mechanisms controlling the synthesis of the hexitol transport systems in *Escherichia coli* K12. *Molecular & General Genetics*: 164: 163-169.

Linton K. J., y Higgins C. F. **1998**. The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Molecular Microbiology*: 1: 5-13.

Liu, M., Durfee, T., Cabrera, J.E., Zhao, K., Jin, D.J. y Blattner, F.R. **2005**. Global transcriptional programs reveal a carbon source foraging strategy by *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*: 280: 15921-15927.

Macpherson, A. J. S., Jones-Mortimer, M. C., Horne, P., y Henderson P. J. F. **1983**. Identification of the GalP Galactose Transport Protein of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*: 258: 4390-4396.

Madigan, M., Matinko, J., Parker, J. **2003**. Brock Biología de los Microorganismos. 10. ed. Pearson, Madrid.

Martínez-Antonio, A., Janga, S. C. y Thieffry D. **2008**. Functional organisation of *Escherichia coli* transcriptional regulatory network. *Journal of Molecular Biology*: 381: 238-247.

Moussatova, A., Kandt, C., O'Mara, M. L., Tieleman, D. P. **2008**. ATP-binding cassette transporters in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*: 1778: 1757–1771.

Pao, S. S., Paulsen I. T. y Saier Jr, M. H. **1998**. Major Facilitator Superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: 62: 1092-2172.

Perez-Rueda, E., y Collado-Vides, J. **2000**. The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research*: 28: 1838-1847.

Postma, P. W., Lengeler, J. W. y Jacobson G. R. **1993**. Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase Systems of Bacteria. *Microbiological Reviews*: 57: 543-594.

Ratledge, C. y Kristiansen, B. **2001**. Basic Biotechnology. 2da. Ed. Cambridge, Reino Unido: 85-87.

Rees, D. C., Johnson, E. y Lewinson O. **2009**. ABC transporters: the power to change. *Nature Reviews*: 10: 218-227.

- Sambrook, J., Russell, D. 2000.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3ra. ed. Cold Spring Harbor University Press, New York.
- Schleif, R. 2010.** AraC protein, regulation of the L-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action. Federation of European Microbiological Societies: 34: 779-796.
- Semsey, S., Krishna, S., Erdóssy, J., Horváth, P., Orosz, L., Sneppen, K., y Adhya, S. 2009.** Dominant negative autoregulation limits steady-state repression levels in gene networks. Journal of bacteriology: 191: 4487–4491.
- Semsey, S., Krishna, S., Sneppen, K. y Adhya, S. 2007.** Signal integration in the galactose network of *Escherichia coli*. Molecular Microbiology: 65: 465–476.
- Weickert, M. J. y Adhya, S. 1993.** Control of Transcription of Gal Repressor and Isorepressor Genes in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology: 175: 251-258.
- Worcel, A. y Burgi, E. 1972.** On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*. Journal of Molecular Biology: 71:127-47.
- Yamada, M. y Saier, M. H., Jr. 1987.** Glucitol-specific Enzymes of the Phosphotransferase System in *Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemists: 262: 5455-5456.
- Zaslaver, A., Bren, A., Ronen, M., Itzovits, S., Kikoin, I., Shavit, S., Liebermeister, W., Surette, M. y Alon, U. 2006.** A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. Nature Methods: 3: 623-628.
- Zheng, H., Taraska, J., Merz, A. J. y Gonen, T. 2010.** The Prototypical H+/Galactose Symporter GalP Assembles into Functional Trimers. Journal of Molecular Biology: 396: 593–601.