



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA
BIENIO 2003-2005

Organización génica y regulación del sistema *hpx* implicado en
la utilización de hipoxantina como fuente de nitrógeno en
Klebsiella pneumoniae

LUCÍA DE LA RIVA PÉREZ

2008

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA
BIENIO 2003-2005

Memoria presentada por LUCÍA DE LA RIVA PÉREZ, licenciada en Biología por la Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Laura Baldomà Llavínés y la Dra. Josefa Badía Palacín, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-Farmacia de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.

Barcelona, Abril de 2008

Dra. Laura Baldomà Llavínés

Dra. Josefa Badía Palacín

Lucía de la Riva Pérez

A mi padre

"Tú eres el motivo de casi todo lo que te sucede."

Niki Lauda

Para empezar, quería agradecer al Dr. Juan Aguilar varias cosas. En primer lugar, tu aprecio. En segundo lugar tu apoyo, especialmente en mis escapadas. Y en tercer lugar, tu habilidad para reconocer los puntos más importantes del trabajo.

A la Dra. Laura Baldomà quería agradecerle muy especialmente su simpatía y cercanía. Eso ha hecho que la relación contigo haya sido muy fácil. También te agradezco el interés que te has tomado en mantenerme informada de todo aquello que pudiera repercutir positivamente sobre mi futuro profesional.

A la Dra. Josefa Badía, “la Pepita”, le agradezco su optimismo y que siempre, siempre que le he pedido algo me ha dado una respuesta lo antes posible sin mostrar la más mínima duda en colaborar.

A las dos, “las jefas”, les agradezco que durante la escritura de la tesis, periodo en el que yo había perdido la noción de lo que eran días laborables y días de descanso, hayan revisado los documentos que les iba mandando ya fuera en vacaciones o en fines de semana. Eso ha agilizado el trabajo.

Professor R.A. Bender, I have sooooo many things to thank you. Thank you for opening your lab to me, for your tools and your knowledgments that have been essential in this work. Thank you for your support. Thank you because you have shown me how to enjoy making science. Thank you for so many interesting talkings. Thank you for sharing your house and your little free time with me. Thank you for the coffee! Finally, something that I really want to thank you is your smile, always present.

A la Dra. Rosa Giménez quiero agradecerle su calidad como profesional y como persona. Gracias por mostrarme tu capacidad para separar lo laboral de lo personal. No olvidaré nuestra complicidad y lo que me he reído contigo. Para mí has sido de gran apoyo.

A Fernando Garcés, le agradezco que haya tenido más paciencia conmigo de la que he tenido yo con él. Sobre todo, gracias por ese corazón tan inmenso que tienes.

A Eva, gracias por tu ayuda y por la logística...¡en el laboratorio y en casa! A Laura, gracias por tu carácter que no permite que las dificultades te superen. ¡Ah!, y gracias por el tampón TE. A Rafa, gracias por tu ayuda en todas las cuestiones informáticas y por tu capacidad de escucha. Y a las doctoras que pasaron por el laboratorio Cris y Laia, gracias por haberme precedido y mostrarme distintos aspectos del mundo que me espera.

Ryan, “Ryanito”, thank you for having been my colleague. During my short stay in Bender’s lab you were a very important support: your material, your time, your english lessons and...your patient to answer so many questions every day! I really appreciate our professional relation. I had the constant feeling of successful work-team with you.

A Noelia y a Nùria, gracias por haberme enseñado a enseñar. Nùria, agraeixo el teu interès i respecte, la teva discreció i sensatesa. Tambè agraeixo que t’hagesis adaptat al fort ritme de treball de la recta final. Ha sigut molt fàcil treballar amb tú.

Chapman’s people, thank you for sharing the same space as Bender’s people. I learnt a lot from all of you, specially during the seminars. I admire your capacity to have fun while working on the bench. Thank you also for the bagles! Xwan, thank you for so many interesting talkings and for your proximity. Dean, thank you for introducing to me so many new musicians.

Gracias al Dr. Pablo Marina, por haber guiado mis primeros pasos en el laboratorio inculcándome la disciplina del orden en el trabajo.

Gracias a la Dra. Isabel López-Calderón, por su ayuda incondicional. Thanks to Dr. Barbara Schulz and Professor Jan Dumanski for allowing me to belong to their groups. Gracias al Dr. Josep Casadesús, por haberme ayudado a encontrar un grupo de investigación en Barcelona.

Gràcies a la Rosina, per la seva confiança i per haver-me obert les portes del apassionant món de la divulgació de la ciència.

Al Dr. Carlos Ciudad le agradezco el esfuerzo por contribuir a mejorar la calidad del departamento.

Al Dr. Albert Tauler le quería agradecer su cercanía e interés.

A los Dres. Diego Haro y Pedro Marrero les quería agradecer su autenticidad y la calidad de la formación que están dando a las niñas.

A la Dra. Guillermina Asins le agradezco los sugus, fundamentales en los momentos de falta de glucosa.

Gracias a Mari Tere, Ana, Tina, M^a Carmen, Montse y Antonia C. por vuestro cariño. A las chicas de secretaría, gracias además por vuestra ayuda y por los bizcochos. A Antonia C., gracias por los cafés, tu sonrisa, tu profesionalidad y tu complicidad. Y como no, a Silvia Soriano, por solucionar todas las cuestiones técnicas que te planteaba y por el soporte en los talleres experimentales.

Durante estos años para mí han sido fundamentales los compañeros de los otros laboratorios. Los Faustos, los Taulers, los Ciudad, los Marrero-Haros, los Ferrers y los Peces. Agradezco que se hayan establecido esas relaciones inter-grupales que han contribuido a que me sintiera arropada y ayudada, y a que en muchos momentos me lo haya pasado genial con vosotros. Vosotros también habeis contribuido a que este trabajo haya salido adelante. Gisela, Vero e Irene, gracias por haber sido las primeras personas en haberme abierto vuestros corazones. Yolanda, gracias por tu alegría. Assia, gracias por pedir las cosas sonriendo siempre. Pep, gracias por compartir los momentos "tuper" del verano de 2007. Entonces te conocí y me dí cuenta de lo grande que eres. Estoy segura de que vas a llegar muy lejos. Basu, thank you for your smile and for your soul. A las niñas, gracias por ser las vecinas de al lado y por vuestro interés. ¡Al final ya me sentía una Marrero-Haro más!. Marta, gracias por tu ayuda en los Southernns y en los ensayos de transporte. Vero, gracias por haberme presentado a "Race". Jaume, gracias por haberme hecho reir constantemente. Toni, gracias por ser un claro ejemplo de ingenio. Mari, gracias por tu apoyo. ¡Sois muchos para dedicar una frase a todos vosotros! Así que muchas gracias a todos.

Gracias Lilia C., Xisca, Mariona, Miriam, Benjamín, Albert y David por todos los buenos momentos que hemos vivido, y estamos viviendo, dentro y fuera del laboratorio. Gracias por compartir ambiciones y las ganas de disfrutar de la vida. Pero sobre todo, gracias por vuestra amistad. Lilia, gracias por tu asesoramiento estadístico. Benjamín, "er Benja", gracias por ser tan auténtico. Albert y David, "mis quillos", gracias por haber pasado por el departamento, porque eso ha hecho que haya ganado dos buenos amigos.

Gracias a todos mis amigos que conocí en Ann Arbor. Conseguisteis que ignorara los kilómetros que me separaban de casa. Luis y Olga, mucha suerte en vuestro retorno a Europa. Luciana y Abraham, gracias por toda vuestra ayuda, por estar tan pendiente de mí, por ser mis amigos y "mis papis". Thank you Alain, to make me feel that I was living in a "real" home instead of in a shared house. Thank you also, and Katrina, for your hospitality in Montreal.

Maripaz, Lourdes, Tomás, Elena, Marisabel, Rafa y Ale, mis buenos amigos de Sevilla, gracias por vuestro apoyo, vuestro tiempo, vuestras visitas y por hacerme disfrutar tanto cada vez que os vuelvo a ver. Davina und Sandy, danke für eure Freundschaft und euren Besuch. Y a los amigos de Barcelona, sobre todo a Gorka, Iratxe y Nuria, gracias por hacerme olvidar la parte agotadora de la ciencia cada vez que me junto con vosotros.

Gracias Fernando, Julia, Cecilia y Todd por vuestro cariño. Cecilia, gracias por darme la oportunidad de trabajar en Suecia. Fue una experiencia muy enriquecedora, tanto en el ámbito profesional como en el personal.

Gracias, como no, a mi familia por su apoyo incondicional. Especialmente a mi madre, por su sencillez, por su buen carácter, por estar tan pendiente de su cascabelillo, por esos paquetes tan apetitosos que han llegado durante estos años a Barcelona y por preocuparse de que me encuentre todo lo que me gusta cada vez que vuelvo a casa. Mamá, en definitiva, gracias por tu amor. Montse, gracias por tu ayuda y por participar en la preparación de esos paquetes. Pablo, gracias por haber vivido con nosotros en Barcelona. Disfruté mucho del tiempo que pasaste en casa. Mercedes, "la Merce", gracias por cuidar tanto nuestra relación y por ser como eres. Virtudes y Pruden, gracias por nuestras conversaciones telefónicas. Manuel, gracias por darme toda la información que crees puede ser de interés para mí y por enriquecer mis conocimientos sobre la biología de bota. Jose, gracias por tu asesoramiento y tus consejos. A Cristina, Carmen, Eduardo, Alberto y Carlos, gracias por hacerme volver a la niñez y juventud cada vez que os veo. Gracias a Emilio, Gabriel, Antonia, Macu, Carmen e Inés por estar ahí.

Por último, gracias a ti, Ander.

PRESENTACIÓN

La estructura molecular de diversos componentes celulares contiene, entre otros elementos, nitrógeno. Este elemento se encuentra principalmente en proteínas y ácidos nucleicos por lo que su disponibilidad resulta vital para los organismos. La fuente de nitrógeno preferida por las bacterias y la mayoría de microorganismos es el amonio, el cual no siempre se encuentra disponible en el medio. Por ello, las bacterias han desarrollado mecanismos moleculares que les permiten obtener nitrógeno de fuentes alternativas como pueden ser las purinas. Este trabajo se centra en el metabolismo de las purinas como fuentes de nitrógeno en la enterobacteria *Klebsiella pneumoniae*. Nuestro interés por este metabolismo surgió al observar que *K. pneumoniae*, a diferencia de la enterobacteria *E. coli*, puede asimilar todos los nitrógenos de las purinas en condiciones aeróbicas.

En este trabajo hemos identificado y caracterizado el sistema génico de *K. pneumoniae* implicado en la asimilación de hipoxantina como fuente de nitrógeno, al cual hemos denominado *hpx*. El sistema *hpx* está formado por cuatro unidades transcripcionales. Las unidades transcripcionales *hpxDE* y *hpxR* se transcriben de manera divergente, al igual que lo hacen las unidades *hpxO* y *hpxPQT*. Se ha determinado el inicio de transcripción de cada una de estas unidades, lo que ha permitido establecer que *hpxDE*, *hpxR* y *hpxO* se transcriben a partir de promotores dependientes de la subunidad σ^{70} de la RNA polimerasa, mientras que *hpxPQT* presenta un promotor σ^{54} .

El operón *hpxDE* está implicado en la oxidación de hipoxantina a ácido úrico. Sin embargo, los productos de los genes *hpxD* y *hpxE* no se asemejan a las xantina deshidrogenasas descritas hasta el presente. En base a la similitud de HpxD y HpxE con distintos miembros de la familia de las dioxigenasas, proponemos que el operón *hpxDE* codifica una dioxigenasa de dos componentes formada por una oxidorreductasa (HpxE) y una oxigenasa (HpxD). El producto génico del gen *hpxO* está implicado en la oxidación de ácido úrico a alantoína. Sin embargo, dicha proteína no presenta similitud a uricasas sino a monooxigenasas de compuestos aromáticos dependientes de FAD. Proponemos que HpxO es una FAD-monooxigenasa que catalizaría la oxidación de ácido úrico al intermediario 5-hidroxiisourato, el cual sería transformado a alantoína por la acción secuencial de las proteínas HpxT y HpxQ. El gen *hpxP* codifica una proteína con elevada similitud a permeasas de xantina y uracilo, aunque una mutación en dicho gen no impide la utilización de purinas como únicas fuentes de nitrógeno. En este mutante, otras permeasas de purinas pueden suplir la función del transportador HpxP y permitir, por tanto, el crecimiento con estas fuentes de nitrógeno. El gen *hpxR* codifica una proteína de la familia de reguladores LysR que actúa como represor de su propia transcripción y como activador del operón *hpxDE*. Se ha identificado el posible centro de unión de HpxR a la región intergénica P_{hpxD-R} . Sin embargo, esta proteína no se une a la región P_{hpxO-P} ni participa en el control transcripcional de *hpxO* o *hpxPQT*.

La caracterización de la regulación del sistema *hpx* se ha llevado a cabo mediante diversas metodologías, analizando diferentes cepas mutantes y distintas condiciones de disponibilidad de nitrógeno. El conjunto de los resultados obtenidos muestra que el sistema *hpx* está sometido a una doble regulación, la llevada a cabo por el sistema global del nitrógeno y la llevada a cabo por la regulación específica de la vía. Mientras que el gen *hpxR* se expresa de manera constitutiva y el gen *hpxO* no está fuertemente regulado, los operones *hpxDE* y *hpxPQT* son inducidos tanto por limitación de nitrógeno como por la presencia de los inductores hipoxantina (*hpxDE*) o ácido úrico (*hpxPQT*). La regulación por nitrógeno del operón *hpxPQT* tiene lugar a través del sistema NTR de *K. pneumoniae*, el cual se activa en condiciones de nitrógeno limitantes. El promotor P_{hpxP} depende de la subunidad σ^{54} de la RNA polimerasa y es reconocido por los factores NtrC (*NiTrogen*

Regulatory protein C) e IHF (*Integration Host Factor*). El regulador que reconoce el ácido úrico como molécula inductora todavía no ha sido identificado. Es de destacar que la regulación por nitrógeno del operón *hpxDE* no tiene lugar a través del sistema NTR. Resultados preliminares sugieren la existencia de un regulador no caracterizado hasta el presente al que proponemos denominar NR (*Nitrogen Repressor*). Este regulador reprimiría la expresión del operón *hpxDE* en condiciones de exceso de nitrógeno. Esta es la primera vez que se describe en *K. pneumoniae* un sistema de regulación por nitrógeno distinto de NTR, hecho que evidencia la importancia del estudio del sistema génico *hpx* en esta enterobacteria. La regulación específica está llevada a cabo por el regulador HpxR, el cual reconoce a la hipoxantina como molécula inductora del operón *hpxDE*.

Así pues, el sistema *hpx* presenta varias características particulares e interesantes: i) codifica proteínas implicadas en la oxidación de hipoxantina y ácido úrico que no presentan las características típicas de las enzimas que suelen catalizar tales reacciones y ii) está regulado, entre otros factores, por un sistema de regulación por nitrógeno distinto del sistema NTR.

En condiciones normales, *K. pneumoniae* forma parte de nuestra flora intestinal aunque en menor proporción que *E. coli*. Sin embargo, existen cepas patógenas que pueden causar distintas patologías como la neumonía. La colonización de los tejidos por patógenos depende, entre otros factores, del éxito que tengan en su competencia por el hábitat con el resto de especies microbianas que constituyen la flora humana. En este sentido, la versatilidad metabólica supone una ventaja en esta competencia. Por ejemplo, aislados patógenos procedentes de abscesos hepáticos contienen el regulón *all*, un sistema génico implicado en la utilización de alantoína como fuente de nitrógeno. Los niveles de alantoína se encuentran elevados en pacientes con diabetes mellitus, enfermedad que supone un factor de riesgo para el desarrollo de abscesos hepáticos. En este sentido, el sistema génico *hpx*, implicado en la utilización aeróbica de hipoxantina como fuente de nitrógeno, podría contribuir a la colonización del nicho ecológico de *K. pneumoniae*. A pesar de que las condiciones del tracto intestinal son anaeróbicas, la capacidad de utilizar aeróbicamente las purinas como fuentes de nitrógeno puede ser útil para las cepas patógenas a la hora de colonizar ambientes aeróbicos como las vías respiratorias. De hecho, la mucosa de las vías respiratorias superiores contiene ácido úrico, el cual desempeña una función antioxidante para combatir las especies reactivas del oxígeno generadas durante periodos de estrés oxidativo.

ABREVIATURAS

β-ME	β-Mercaptoetanol
aa	Aminoácido
ABS	<i>Activator Binding Site</i>
Ap	Ampicilina
ATP	Adenosíntrifosfato
Bisacrilamida	N,N'-Metilén-bisacrilamida
BSA	Albúmina de suero bovino
Ci	Curie
CIAP	Fosfatasa alcalina de ternera
csp	Cantidad suficiente para
CTAB	<i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DIG	Digoxigenina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EBP	<i>Enhancer Binding Protein</i>
EDTA	Etilendiaminotetracetato
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Schiff Assay</i>
FAD	Dinucleótido de flavina y adenina
FeCN	Ferricianuro
FMO	<i>Flavin containing MonoOxygenase</i>
xg	Gravedades
GDH	Glutamato deshidrogenasa
Gln	Glutamina
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
HIU	5-hidroxiisourato
Hx	Hipoxantina
IHF	<i>Integration Host Factor</i>
IPTG	Isopropil β-D-tiogalactopiranósido
Km	Kanamicina
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
mA	Miliamperio
MBP	<i>Maltose-Binding Protein</i>
MoCo	<i>Molybdenum containing Cofactor</i>
MOPS	Ácido 3-(n-morfolín) propanosulfónico
NAD	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NAT	<i>Nucleobase Ascorbate Transporter</i>
OHCU	2-oxo-4-hidroxi-4-carboxi-5-ureidoimidazolina
o/n	<i>overnight</i>
ONPG	o-Nitro-fenil-β-D-galactopiranósido
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
p	nivel de significación
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pfu	Unidad formadora de calva
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PNK	Polinucleótido quinasa
poli-dA	Cola de desoxinucleótidos de adenina
poli-dT	Cola de desoxinucleótidos de timina
RACE	<i>Rapid Amplification of CDNA Ends</i>
RBS	<i>Repressor/Regulator Binding Site</i>
RNAsa	Ribonucleasa
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SDS	Docecilsulfato sódico
Sm	Estreptomina
TBE	Tampón de Tris-HCl, Borato y EDTA
Tc	Tetraciclina
TE	Tampón de Tris-HCl y EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
TFB	<i>TransFormation Buffer</i>
Tm	Temperatura de hibridación
Tn	Transposón
Tris	Tris (hidoximetil) aminometano
U	Unidad de actividad enzimática
Ur	Acido Úrico
V	Voltio
W	Watio
XDH	Xantina DesHidrogenasa
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. DEGRADACIÓN DE PURINAS	1
1.1.1. DEGRADACIÓN DE PURINAS EN BACTERIAS	4
1.1.1.1. Metabolismo de purinas en <i>Bacillus subtilis</i>	4
1.1.1.2. Metabolismo de purinas en enterobacterias	5
1.1.1.2.1. <i>Escherichia coli</i>	6
1.1.1.2.2. <i>Salmonella enterica</i>	6
1.1.1.2.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
1.2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	8
1.2.1. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN PROCARIOTAS	8
1.2.1.1. Elementos reguladores en <i>cis</i>	8
1.2.1.2. Elementos reguladores en trans.....	9
1.2.1.2.1. Regulación por la estructura del DNA	9
1.2.1.2.2. Reguladores LysR	10
1.2.2. REGULACIÓN POR NIVELES DE NITRÓGENO. EL SISTEMA NTR DE ENTEROBACTERIAS.....	11
1.2.2.1. Regulación por nitrógeno en <i>K. pneumoniae</i>	13
1.2.3. REGULACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE PURINAS EN MICROORGANISMOS	14
1.2.3.1. <i>Bacillus subtilis</i>	15
1.2.3.2. <i>Aspergillus nidulans</i>	16
2. MATERIALES	17
2.1. CEPAS BACTERIANAS	17
2.2. VECTORES.....	18
2.2.1. PLÁSMIDOS	19
2.2.1.1. Vectores de clonación	19
2.2.1.2. Plásmidos utilizados para la obtención de mutantes	19
2.2.1.3. Plásmidos utilizados para la construcción de fusiones transcripcionales.....	20

2.2.1.4. Vectores utilizados para la expresión y/o purificación de proteínas ..	20
2.2.2. FAGOS	20
2.3. OLIGONUCLEÓTIDOS.....	21
2.4. REACTIVOS Y KITS COMERCIALES.....	21
2.5. SOPORTE INFORMÁTICO: PROGRAMAS INFORMÁTICOS Y BASES DE DATOS.....	21
3. MÉTODOS.....	23
3.1. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.....	23
3.1.1. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO	23
3.1.2. TRANSDUCCIÓN GENERALIZADA CON EL BACTERIÓFAGO P1	25
3.1.2.1. Preparación de un lisado P1	25
3.1.2.2. Transducción a genoma.....	26
3.1.3. OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	26
3.1.3.1. Métodos químicos	27
3.1.3.1.1. Mediante TFB.....	27
3.1.3.1.2. Mediante CaCl ₂	27
3.1.3.2. Métodos físicos: electroporación	28
3.1.4. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	29
3.1.4.1. Choque térmico	29
3.1.4.2. Electroporación	29
3.1.5. CONJUGACIÓN	30
3.1.6. OBTENCIÓN DE MUTANTES.....	31
3.1.6.1. Mutagénesis al azar por inserción del transposón mini-Tn5 Km	31
3.1.6.2. Mutagénesis dirigida en <i>K. pneumoniae</i> por inserción de un casete KAN.....	32
3.2. ANÁLISIS Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	34
3.2.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES	34
3.2.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE LOWRY	34

3.2.3. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A MBP	35
3.2.4. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE-SDS)	37
3.2.5. ENSAYOS DE TRANSPORTE	38
3.2.6. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	39
3.2.6.1. Determinación de la actividad xantina deshidrogenasa.....	39
3.2.6.1.1. Mediante determinación espectofotométrica de NADH.....	39
3.2.6.1.2. Mediante determinación espectofotométrica de FeCN.....	39
3.2.6.2. Determinación de la actividad uricasa	40
3.2.6.3. Determinación de la actividad ureasa.....	40
3.2.6.4. Determinación de la actividad β -galactosidasa	41
3.3. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA	42
3.3.1. OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO	42
3.3.2. OBTENCIÓN DE DNA PLASMÍDICO	43
3.3.2.1. Obtención de DNA plasmídico a pequeña escala: Método de la lisis alcalina	43
3.3.2.2. Obtención de DNA plasmídico a media escala.....	43
3.3.3. MANIPULACIÓN ENZIMÁTICA DEL DNA	43
3.3.3.1. Digestión del DNA: Endonucleasas de restricción.....	43
3.3.3.2. Desfosforilación del DNA.....	44
3.3.3.3. Obtención de extremos romos.....	44
3.3.3.4. Ligación de fragmentos de DNA.....	44
3.3.3.5. Marcaje de fragmentos de DNA	45
3.3.3.5.1. Marcaje homogéneo con DIG-11-dUTP.....	45
3.3.3.5.2. Marcaje radioactivo 5' terminal	45
3.3.4. TÉCNICA DE PCR.....	46
3.3.4.1. Obtención de fragmentos de DNA.....	47
3.3.4.2. Selección de clones recombinantes	47
3.3.4.3. PCR inversa	47
3.3.5. RESOLUCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA.....	48
3.3.5.1. Separación de fragmentos de DNA en geles de agarosa.....	48
3.3.5.2. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	49

3.3.5.3. Separación de fragmentos de DNA en geles de poliacrilamida.....	50
3.3.5.4. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de poliacrilamida	51
3.3.5.5. Purificación de fragmentos de DNA obtenidos por PCR	51
3.3.5.5.1. Método de extracción fenol-cloroformo.....	51
3.3.5.5.2. Kit Qiagen	51
3.3.6. CONSTRUCCIÓN DE MOLÉCULAS HÍBRIDAS DE DNA	51
3.3.7. SECUENCIACIÓN DE DNA (MÉTODO DE SANGER) CON SISTRATOS FLUORESCENTES	52
3.3.8. ANÁLISIS DE DNA POR SOUTHERN BLOT	53
3.4. CARACTERIZACIÓN DE PROMOTORES.....	55
3.4.1. FUSIÓN DE PROMOTORES AL GEN <i>lacZ</i>	55
3.4.1.1. Obtención de fusiones en vector multicopia	55
3.4.1.2. Transferencia de fusiones de promotor de plásmido a genoma.....	55
3.4.2. ENSAYOS DE RETARDACIÓN DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA EN GEL DE POLIACRILAMIDA.....	56
3.4.2.1. Preparación de la fracción proteica	56
3.4.2.2. Preparación del fragmento de DNA utilizado como sonda	57
3.4.2.3. Reacción de unión DNA-proteína.....	57
3.4.2.4. Preparación del gel de poliacrilamida.....	58
3.4.2.5. Separación electroforética de las sondas y los complejos de retardación	58
3.5. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA	58
3.5.1. OBTENCIÓN DE RNA TOTAL	58
3.5.2. ANÁLISIS DE RNA POR RT-PCR.....	60
3.5.3. DETERMINACIÓN DEL INICIO DE TRANSCRIPCIÓN	60
4. RESULTADOS.....	63
4.1. UTILIZACIÓN DE PURINAS Y DERIVADOS POR <i>K. pneumoniae</i>.....	63
4.1.1. UTILIZACIÓN DE PURINAS Y SU DERIVADO ALANTOÍNA POR <i>K.</i> <i>pneumoniae</i>	63

4.2. IDENTIFICACIÓN DEL SISTEMA GÉNICO <i>hpx</i> DE <i>K.pneumoniae</i> IMPLICADO EN LA UTILIZACIÓN DE HIPOXANTINA COMO FUENTE DE NITRÓGENO	64
4.2.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE <i>K. pneumoniae</i> INCAPACES DE UTILIZAR HIPOXANTINA COMO FUENTE DE NITRÓGENO	64
4.2.1.1. Mutagénesis al azar mediante inserción del transposón mini-Tn5 ..	64
4.2.1.2. Localización de la inserción mediante PCR inversa	65
4.2.2. ORGANIZACIÓN GÉNICA DEL SISTEMA <i>hpx</i>	66
4.2.2.1. Secuenciación del sistema génico <i>hpx</i>	67
4.2.2.2. Análisis computacional del sistema génico <i>hpx</i>	67
4.2.3. ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL SISTEMA GÉNICO <i>hpx</i> ...	68
4.3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL SISTEMA GÉNICO <i>hpx</i>	69
4.3.1. FUNCIÓN DEL OPERÓN <i>hpxDE</i> EN LA OXIDACIÓN DE HIPOXANTINA A ÁCIDO ÚRICO.....	69
4.3.1.1. Caracterización fenotípica de mutantes <i>hpxD::mini-Tn5 Km</i> o <i>hpxE::mini-Tn5 Km</i>	70
4.3.1.2. Análisis computacional de la secuencia de aminoácidos de HpxD y HpxE.....	70
4.3.1.3. Análisis de la actividad XDH de HpxD y HpxE	72
4.3.2. FUNCIÓN DE LOS GENES <i>hpxO</i> , <i>hpxQ</i> Y <i>hpxT</i>	73
4.3.2.1. Función de <i>hpxO</i> en la oxidación de ácido úrico a alantoína.....	73
4.3.2.1.1. Análisis computacional de la secuencia de aminoácidos de HpxO	73
4.3.2.1.2. Mutagénesis dirigida de <i>hpxO</i> por inserción del gen <i>kan</i>	74
4.3.2.1.3. Caracterización fenotípica del mutante <i>hpxO::kan</i>	76
4.3.2.1.4. Análisis de la actividad uricasa de HpxO	76
4.3.2.2. Función de <i>hpxQ</i> y <i>hpxT</i> en la oxidación de 5-hidroxiisourato (HIU) a alantoína.....	76
4.3.2.2.1. Análisis computacional de la secuencia de aminoácidos de HpxQ y HpxT.....	76
4.3.3. FUNCIÓN DE <i>hpxP</i> EN EL TRANSPORTE DE PURINAS	77
4.3.3.1. Análisis computacional de la secuencia de aminoácidos de HpxP....	77
4.3.3.2. Mutagénesis dirigida de <i>hpxP</i> por inserción del gen <i>kan</i>	78
4.3.3.2.1. Caracterización fenotípica del mutante <i>hpxP::kan</i>	79

4.3.3.3. Función de HpxP en el transporte de hipoxantina.....	80
4.3.4. FUNCIÓN DE <i>hpxR</i> EN LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE HIPOXANTINA COMO FUENTE DE NITRÓGENO	81
4.3.4.1. Análisis computacional de la secuencia de aminoácidos de HpxR ...	81
4.3.4.2. Mutagénesis dirigida de <i>hpxR</i> por inserción del gen <i>kan</i>	81
4.3.4.2.1. Caracterización fenotípica del mutante <i>hpxR::kan</i>	83
4.4. REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE HIPOXANTINA COMO FUENTE DE NITRÓGENO EN <i>K. pneumoniae</i>	84
4.4.1. EL SISTEMA GÉNICO <i>hpx</i> ESTÁ SUJETO A UNA DOBLE REGULACIÓN	84
4.4.1.1. Análisis computacional de los promotores P_{hpxD} , P_{hpxR} , P_{hpxO} y P_{hpxP}	84
4.4.1.2. Análisis de la expresión del operón <i>hpxPQT</i> mediante RT-PCR.....	86
4.4.2. REGULACIÓN GLOBAL POR NIVELES DE NITRÓGENO	87
4.4.2.1. Utilización de purinas y derivados como fuentes de nitrógeno por mutantes del sistema NTR	87
4.4.2.2. Actividad de los promotores del sistema génico <i>hpx</i> en distintas condiciones de nitrógeno.....	88
4.4.2.3. Efecto de mutaciones en los genes <i>nac</i> , <i>ntrC</i> o <i>rpoN</i> en la actividad de los promotores del sistema génico <i>hpx</i>	89
4.4.3. REGULACIÓN ESPECÍFICA MEDIADA POR HIPOXANTINA O ÁCIDO ÚRICO	91
4.4.3.1. Identificación de los inductores de la expresión de los operones <i>hpxDE</i> y <i>hpxPQT</i>	91
4.4.3.2. Función de HpxR en la regulación de la expresión del sistema <i>hpx</i> .97	
4.4.3.2.1. Estudio de la unión de HpxR a las regiones promotoras P_{hpxD-R} y P_{hpxO-P}	97
4.4.3.2.2. Efecto de la mutación <i>hpxR::kan</i> en la actividad de los promotores del sistema génico <i>hpx</i>	99
4.4.4. ESTUDIOS DE RETARDACIÓN DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA) LLEVADOS A CABO CON EXTRACTOS CELULARES DE CULTIVOS CRECIDOS CON DISTINTAS FUENTES DE NITRÓGENO.....	103
4.4.4.1. Estudios de retardación de la movilidad electroforética de sondas correspondientes a P_{hpxD}	103
4.4.4.2. Estudios de retardación de la movilidad electroforética de sondas correspondientes a P_{hpxO-P}	104

5. DISCUSIÓN	111
5.1. IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DE LA ASIMILACIÓN DE HIPOXANTINA EN EL HÁBITAT DE <i>K. pneumoniae</i>	111
5.2. EL SISTEMA <i>HPX</i> CODIFICA PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA OXIDACIÓN DE HIPOXANTINA A ALANTOÍNA	112
5.3. REGULACIÓN DUAL DEL SISTEMA <i>hpx</i> : POR NIVELES DE NITRÓGENO Y POR PRESENCIA DE PURINAS	116
5.3.1. LA DOBLE REGULACIÓN DEL OPERÓN <i>hpxPQT</i> TIENE LUGAR MEDIANTE EL SISTEMA NTR, EN CONDICIONES LIMITANTES DE NITRÓGENO, Y POR PRESENCIA DE ÁCIDO ÚRICO.....	116
5.3.2. LA DOBLE REGULACIÓN DEL OPERÓN <i>hpxDE</i> TIENE LUGAR MEDIANTE UN REPRESOR, EN ALTOS NIVELES DE NITRÓGENO, Y POR HIPOXANTINA, A TRAVÉS DEL REGULADOR HpxR.....	118
6. CONCLUSIONES	121
7. BIBLIOGRAFÍA.....	123
8. ANEXOS	133

INTRODUCCIÓN

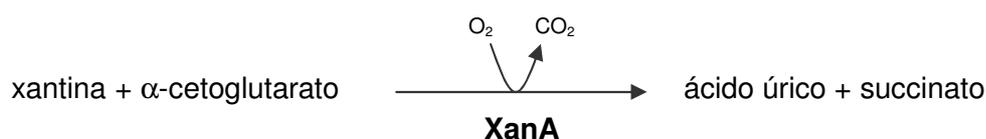
1. INTRODUCCIÓN

1.1. DEGRADACIÓN DE PURINAS

Purinas y pirimidinas, piezas fundamentales de los ácidos nucleicos, abundan en los ecosistemas (Vogels y Vander Drift, 1976). Proceden de la descomposición de la materia viva y de los productos de deshecho de los organismos (Schultz *et al.*, 2001). Estos compuestos pueden ser utilizados por las plantas, en cuya fisiología desempeñan importantes funciones, y como fuentes de nitrógeno por distintos microorganismos.

Los estudios sobre la degradación de las bases nitrogenadas se han centrado en las purinas debido al interés que suscita su compleja estructura molecular. Son compuestos orgánicos heterocíclicos que contienen 4 o 5 átomos de nitrógeno. Dependiendo del organismo, las purinas pueden ser degradadas parcialmente o completamente a CO₂ y NH₃.

La ruta de degradación de las purinas se podría dividir en dos partes, en primer lugar la degradación a alantoína (FIGURA 1.1.) y en segundo lugar el catabolismo de este compuesto. El metabolismo de alantoína puede seguir distintas vías según el organismo (Vogels y Vander Drift, 1976), algunas de las cuales se representan en la FIGURA 1.2. En cambio, las reacciones de la vía de degradación de purinas hasta alantoína son universales. En concreto, las reacciones de oxidación de hipoxantina y ácido úrico están catalizadas por enzimas muy conservadas en la naturaleza: xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa, respectivamente. La enzima XDH pertenece a la familia de molibdo-enzimas, ya que requiere el cofactor de molibdeno MoCo, concretamente a la familia de xantina oxidasas en la que también se encuentra la aldehído oxidoreductasa de *Desulfovibrio gigas* (Kisher *et al.*, 1999). Las XDH, además de poseer un dominio que contiene el MoCo (*Molybdenum containing Cofactor*), se caracterizan por la presencia de otros dominios de unión a FAD y centros ferrosulfurados [2Fe-2S], los cuales son esenciales en la cadena de transporte de electrones durante la reacción de oxidación (Hille, 2005). Sin embargo, recientemente se ha descrito que *Aspergillus nidulans* contiene, además de la XDH, otra enzima diferente capaz de oxidar xantina a ácido úrico (Cultrone *et al.*, 2005). Esta enzima, codificada por el gen *xanA*, es una xantina dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato que cataliza la reacción indicada a continuación.



Por lo que respecta al metabolismo de purinas en otros hongos, cabe resaltar que ni *Schizosaccharomyces pombe* ni *Candida albicans* contienen en su genoma genes que codifiquen XDH, a pesar de que estos organismos pueden catabolizar purinas. La hipótesis más plausible es que ambos organismos son capaces de oxidar xantina a ácido úrico mediante una reacción en la que no está implicada ninguna molibdoenzima (Goudela *et al.*, 2005).

En cuanto a la enzima uricasa, se conocen varios motivos comunes en las proteínas de mamíferos, plantas, hongos, levaduras y bacterias. En un principio se pensó que esta enzima requería cobre pero se ha descrito que las uricasas de soja (Kahn y Typton, 1997), del hongo *Aspergillus flavus* (Conley y Priest, 1980) y de la bacteria *Bacillus subtilis* (Imhoff *et al.*, 2003) no requieren cobre ni ningún otro metal para la catálisis.

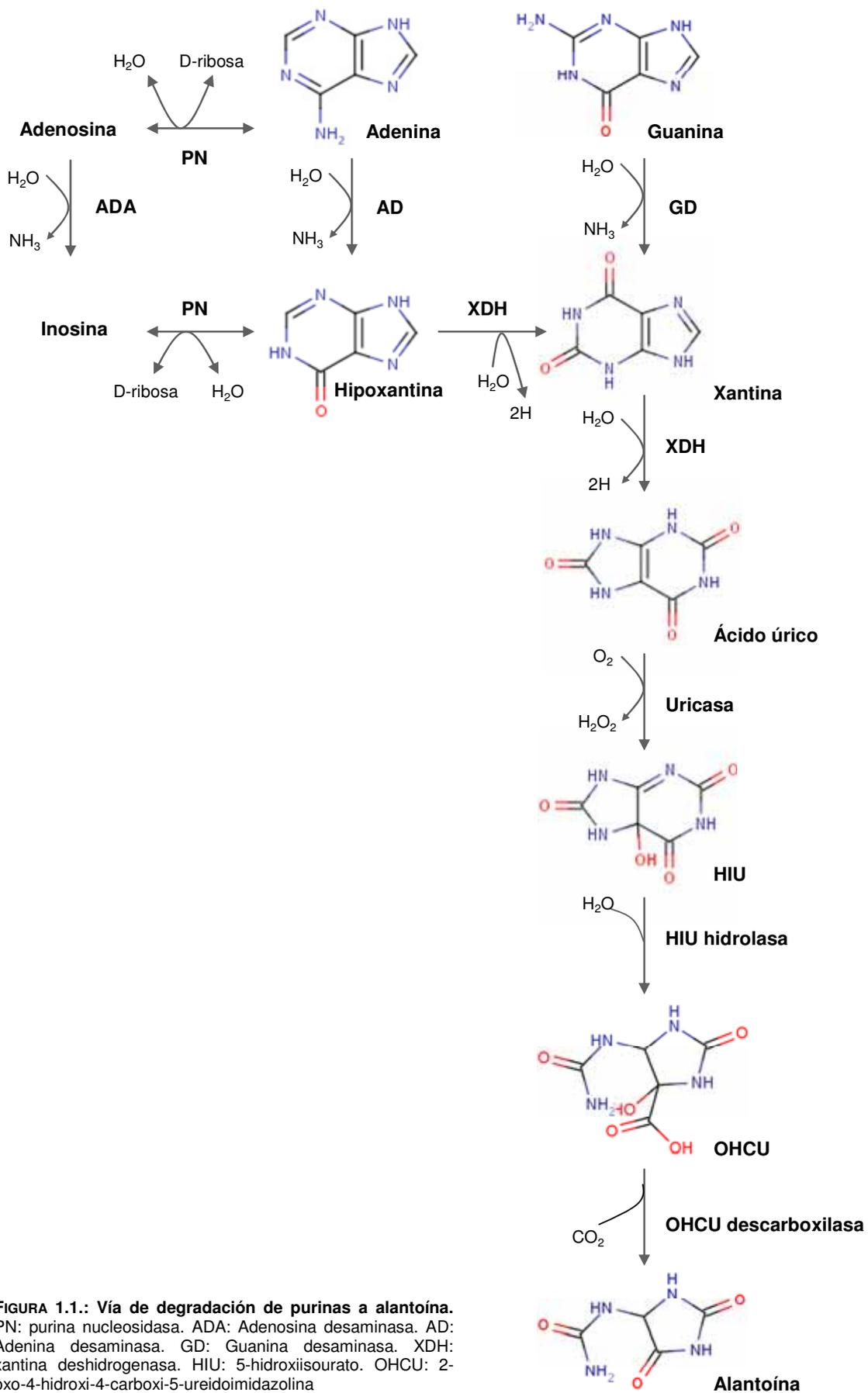


FIGURA 1.1.: Vía de degradación de purinas a alantoína.
 PN: purina nucleosidasa. ADA: Adenosina desaminasa. AD: Adenina desaminasa. GD: Guanina desaminasa. XDH: xantina deshidrogenasa. HIU: 5-hidroxiisourato. OHCU: 2-oxo-4-hidroxi-4-carboxi-5-ureidoimidazolina

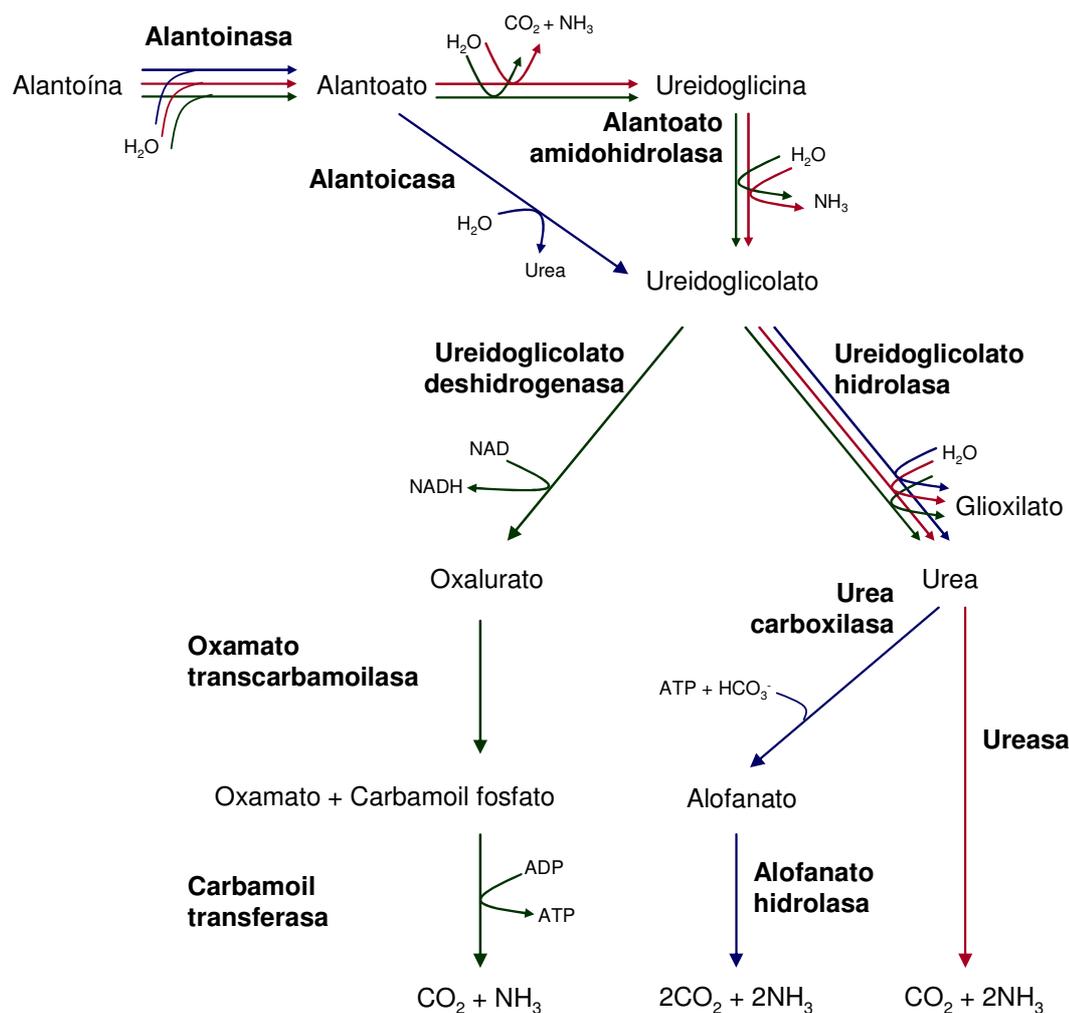


FIGURA 1.2.: Vía de degradación de alantoína en diferentes microorganismos.

— *Saccharomyces cerevisiae*. — *Bacillus subtilis*. — *Escherichia coli*.

En los últimos años se ha estudiado en detalle la reacción de oxidación de ácido úrico a alantoína y se ha descrito la formación de los intermediarios 5-hidroxiisourato (HIU) y 2-oxo-4-hidroxi-4-carboxi-5-ureidoimidazolina (OHCU) (Lee *et al.*, 2005; Ramazzina *et al.*, 2006; Cendrone *et al.*, 2007). De esta manera la transformación de ácido úrico al intermediario OCHU está catalizada secuencialmente por las enzimas uricasa y HIU hidrolasa, mientras que el OHCU puede ser transformado a alantoína de manera espontánea, aunque muy lentamente, o mediante la catálisis llevada a cabo por la enzima OCHU descarboxilasa (FIGURA 1.1.).

En cuanto a las reacciones que generan hipoxantina o xantina a partir de adenina o guanina, respectivamente, las enzimas implicadas dependen del organismo. En bacterias, la enzima guanina desaminasa está muy conservada mientras que la presencia de adenina desaminasa o adenosina desaminasa depende de la especie. La carencia de adenina desaminasa hace necesaria la síntesis de los nucleósidos intermediarios adenosina e inosina para la formación de hipoxantina.

Las purinas, así como las pirimidinas, son internalizadas al interior celular mediante transportadores específicos para estos compuestos. Los transportadores de nucleobases se dividen en tres familias: NAT (*Nucleobase-Ascorbate Transporter*), PRT (*microbial Purine-Related Transporter*) y PUP (*Plant PUrine-related transporter*) (Koning y Diallinas, 2000). La mayoría de transportadores de purinas presentes en bacterias pertenecen a la familia NAT. Representantes de este grupo son los transportadores de xantina PbuX de *B. subtilis* (Christiansen *et al.*, 1997) y los recientemente identificados YgfO y YicE de *E. coli* (Karatza y Frillingos, 2005). El hecho de que una misma especie contenga varios sistemas que transportan el mismo sustrato dificulta la caracterización funcional a nivel cromosómico de los genes que los codifican. Por ejemplo, *E. coli* no puede utilizar hipoxantina o xantina como fuentes de nitrógeno, pero estos compuestos estimulan el crecimiento en un medio con aspartato (Xi *et al.*, 2000). Un mutante de *E. coli* en el gen *ygfO* muestra la misma velocidad de crecimiento que la cepa parental en un medio que contiene aspartato y xantina (Karatza y Frillingos, 2005).

Los transportadores de purinas mejor caracterizados son los de *A. nidulans*. Hasta el momento han sido descritos tres sistemas. Las proteínas UapA y AzgA son transportadores de alta afinidad y alta capacidad específicos para ácido úrico y xantina, y adenina, guanina e hipoxantina, respectivamente (Gorfinkiel *et al.*, 1993; Cechetto *et al.*, 2004). Por último, la proteína UapC es un transportador de alta afinidad y moderada capacidad para xantina y ácido úrico, y de baja capacidad para adenina, guanina e hipoxantina (Diallinas *et al.*, 1995). Los transportadores UapA y UapC pertenecen a la familia NAT. La caracterización funcional a nivel cromosómico de los genes que codifican estos transportadores se ha llevado a cabo mediante el uso de mutantes dobles, e incluso triples, en tales genes (Cechetto *et al.*, 2004; Diallinas *et al.*, 1995).

A partir de las referencias sobre la degradación de purinas, los microorganismos se podrían dividir en dos grupos, los que degradan purinas en condiciones aeróbicas, como protozoos, algas, hongos, levaduras y algunas bacterias, y los que las degradan en condiciones anaeróbicas como algunas especies de *Clostridium* (Barker y Beck, 1942). La enzima uricasa solamente utiliza como aceptor de electrones el O₂ (Pitts *et al.*, 1974), por lo que la degradación anaeróbica de purinas se realiza a través de vías que evitan la implicación de esta enzima (Vogels y Vander Drift, 1976).

1.1.1. DEGRADACIÓN DE PURINAS EN BACTERIAS

Existen pocas referencias acerca de la genética de la degradación de purinas en bacterias, centradas en las especies *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Klebsiella pneumoniae*. Curiosamente, las tres últimas especies son enterobacterias, grupo de especial interés para nuestro laboratorio.

El único trabajo acerca de *Pseudomonas aeruginosa* data del año 1978 (Matsumoto *et al.*, 1978). Por el contrario, el metabolismo de purinas está ampliamente estudiado en *B. subtilis*. En el caso de las enterobacterias mencionadas anteriormente, los estudios principales se centran en los sistemas génicos implicados en la utilización del intermediario alantoína como fuente de nitrógeno. A continuación se explica brevemente lo que se conoce acerca de la genética del metabolismo de purinas en *B. subtilis* y de las enterobacterias mencionadas.

1.1.1.1. Metabolismo de purinas en *Bacillus subtilis*

B. subtilis es una bacteria Gram positiva perteneciente a la familia *Bacillaceae*, cuyo hábitat natural es el suelo. Se caracteriza por la formación de endosporas que le permite resistir condiciones ambientales extremas.

B. subtilis utiliza adenina, guanina, hipoxantina y xantina como fuentes de nitrógeno (Nygaard *et al.*, 2000). En este metabolismo están implicados el gen *ade* (Nygaard *et al.*, 1996), que codifica la enzima adenina desaminasa, y el regulón *puc* (Beier *et al.*, 2002). El regulón *puc* se compone del gen *gde* (Nygaard *et al.*, 2000), que codifica la enzima guanina desaminasa, y de los genes *puc*, la mayoría de ellos localizados en el mismo locus e implicados en la degradación de hipoxantina a ácido ureidoglicólico (Schultz *et al.*, 2001) (FIGURA 1.3.).

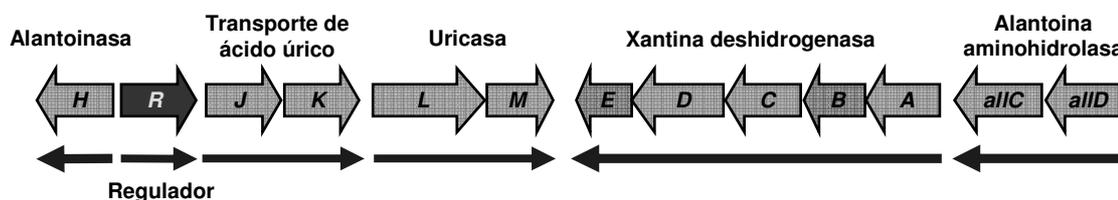


FIGURA 1.3.: Organización génica del locus donde se localiza la mayoría de genes del regulón *puc* de *B. subtilis*. El regulón *puc* está formado, además, por los genes *gde* (guanina desaminasa) y *pucl* (permeasa de alantoina). Se indica la función codificada por cada unidad transcripcional.

La expresión de los genes del regulón *puc* se encuentra bajo el control de los reguladores TnrA (Lewis *et al.*, 1996) y PucR (Schultz *et al.*, 2001). En condiciones en las que *B. subtilis* no dispone de su fuente preferida de nitrógeno, amonio, el regulador TnrA activa la expresión de genes que permiten obtener nitrógeno de fuentes alternativas. Por tanto, y como se describirá en INTRODUCCIÓN 1.2.3.1., el metabolismo de purinas en esta bacteria está regulado a dos niveles, por los niveles de nitrógeno y por el regulador específico PucR.

1.1.1.2. Metabolismo de purinas en enterobacterias

Al intestino llegan purinas provenientes de la digestión de los alimentos de origen celular. Los ácidos nucleicos son resistentes al medio ácido del estómago. Se degradan a sus nucleótidos principalmente en el duodeno, mediante la acción de nucleasas pancreáticas y fosfodiesterasas intestinales. Estos compuestos no pueden atravesar las membranas celulares y son hidrolizados posteriormente a nucleósidos por acción de nucleotidasas y fosfatasas. Los nucleósidos pueden ser absorbidos directamente por la mucosa o volver a ser degradados a bases libres y azúcares gracias a la acción de nucleosidasas y nucleósido fosforilasas. Sólo una pequeña fracción de las bases de los ácidos nucleicos ingeridos es incorporada a los ácidos nucleicos de los tejidos debido a que las vías de síntesis *de novo* de nucleótidos satisfacen, en su mayor parte, las necesidades de un organismo. Por tanto, el destino de la mayor parte de las bases nitrogenadas suele ser la degradación y excreción (Voet, 1992).

Los humanos carecemos de uricasa, por lo que el producto del catabolismo de purinas generado es el ácido úrico (Christen *et al.*, 1970). Parte de ese ácido úrico puede ser degradado por acción de la flora intestinal (Sorensen, 1965). De hecho, si se administra ácido úrico oralmente, la mayoría es degradado por bacterias del intestino (Geren *et al.*, 1950). Por ello resulta importante conocer cómo puede contribuir el metabolismo de nuestra flora intestinal a su degradación. Sin embargo, hasta el momento sólo se sabe que pueden degradarlo las bacterias aeróbicas *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *Proteus vulgaris* (Sorensen, 1960; Rouf y Lomprey 1968).

Una parte de las especies que habitan en el tracto intestinal pertenece a la familia de bacterias Gram negativas *Enterobacteraceae* (*enteron*: intestino). Estas bacterias son de

especial interés por el papel que desempeñan en la fisiología intestinal, por su implicación en diversas patologías y porque se aplican en varios procesos industriales.

1.1.1.2.1. *Escherichia coli*

En condiciones aeróbicas, *E. coli* solamente puede utilizar adenina como fuente de nitrógeno (Nygaard, 1983). Concretamente en estas condiciones sólo puede asimilar uno de los nitrógenos de esta molécula (Xi *et al.*, 2000). Debido a que *E. coli* no contiene un gen que codifique una adenina desaminasa funcional, esta capacidad se basa en la transformación de adenina a su nucleósido adenosina, el cual es desaminado a inosina, por acción de la adenosina desaminasa (Nygaard, 1978) (FIGURA 1.1.). Recientemente se ha descrito en *E. coli* un gen críptico de la adenina desaminasa cuya expresión se encuentra silenciada por el factor H-NS (Peterson *et al.*, 2002). Dicho gen ha sido clonado y sobreexpresado y se ha podido determinar la actividad enzimática de su producto génico (Matsui *et al.*, 2001).

La descripción de la genética de la degradación aeróbica de adenina en *E. coli* está incompleta. En esta especie se han localizado en el minuto 65 del cromosoma genes que codificarían una XDH heterotrimérica (*xdhABC*) y una XDH monomérica (*xdhD*; Xi *et al.*, 2000). Mediante determinación del $^{14}\text{CO}_2$ liberado a partir de [^{14}C]-adenina, estos autores propusieron que en condiciones aeróbicas la adenina es metabolizada hasta alantoína. Mutaciones en el gen *xdhA* reducen la producción de $^{14}\text{CO}_2$, lo que demuestra la implicación del producto génico de este gen en la oxidación de hipoxantina. Sin embargo, Xi *et al.* no pudieron detectar actividad XDH en extractos celulares de la cepa tipo salvaje.

En condiciones anaeróbicas *E. coli* puede utilizar el intermediario alantoína como fuente de nitrógeno gracias al regulón *all* (FIGURA 1.4.), un sistema génico identificado y caracterizado en nuestro laboratorio (Cusa *et al.*, 1999; Rintoul *et al.*, 2002). El regulón *all* se compone de los genes implicados en la degradación de alantoína y en la vía del D-glicerato, cuya expresión está regulada por el represor AllR y el activador AllS, cuyo gen solamente se expresa en condiciones anaeróbicas.

De esta manera, la utilización de solamente uno de los nitrógenos de la adenina y la incapacidad de utilizar hipoxantina o xantina como únicas fuentes de nitrógeno en condiciones aeróbicas se basa en que una vez generado el NH_3 por acción de la adenosina desaminasa, no se volvería a liberar NH_3 hasta la transformación de alantoato en ureidoglicolato. Esta reacción está catalizada por la enzima alantoato amidohidrolasa, codificada por el gen *allC* que solamente se expresa en condiciones anaeróbicas (Rintoul *et al.*, 2002).

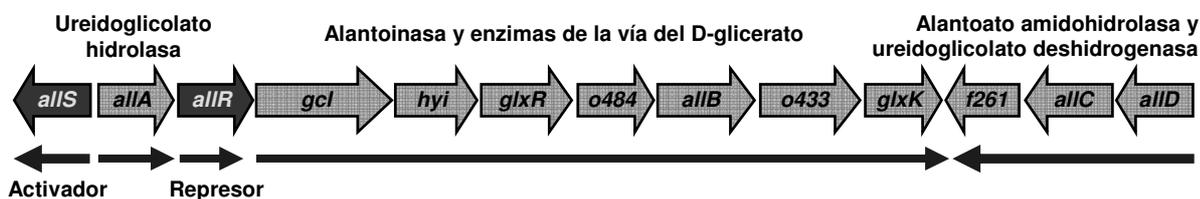


FIGURA 1.4.: Regulón *all* de *E. coli*. Se indica la función codificada por cada unidad transcripcional.

1.1.1.2.2. *Salmonella enterica*

Al inicio de este trabajo no existían publicaciones acerca de la capacidad de *Salmonella enterica* de utilizar purinas para otro objetivo distinto de la síntesis de nucleótidos (Zimmerman y Magasanik, 1964; Hoffmeyer y Neuhard, 1971). Estos estudios permitieron la

identificación de la adenosina desaminasa que permite la transformación de adenina en hipoxantina vía inosina.

Numerosas cepas de *S. enterica* están implicadas en distintos procesos infecciosos. Estas cepas se encuentran clasificadas en serotipos y dicha clasificación se basa en el tipo de antígeno. La secuenciación del genoma de *S. enterica* serotipo *Typhimurium* LT2 (McClelland *et al.*, 2001) ha permitido llevar a cabo estudios comparativos entre cepas de *S. enterica* mediante *microarrays*. De esta manera se ha descrito que cepas de los serotipos Agona, Dublin y *Typhimurium* LT2 contienen el regulón *all* (Reen *et al.*, 2005). En cambio, las variantes [4, 5, 12:i:-] y DT104 del serotipo *Typhimurium* tienen una deleción en ese locus (Garaizar *et al.*, 2002; Reen *et al.*, 2005; Matiasovicova *et al.*, 2007). Curiosamente, las cepas que carecen del regulón *all* son muy virulentas gracias a su capacidad de formar biofilms y de resistir a multitud de antibióticos (Garaizar *et al.*, 2002; Matiasovicova *et al.*, 2007).

1.1.1.2.3. *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae puede utilizar purinas y el intermediario alantoína como fuentes de nitrógeno y de carbono (Rouf y Lomprey 1968; Wong, 1988). Si se hacen crecer cultivos de *K. pneumoniae* con NH_4Cl o adenina, a concentraciones equimoleculares, como únicas fuentes de nitrógeno, el rendimiento celular obtenido con adenina es cuatro veces superior al alcanzado con NH_4Cl , lo que indica la utilización de todos los nitrógenos de la adenina y, por tanto, su completa degradación (Xi *et al.*, 2000).

Garzón *et al.*, 1992 describieron que la cepa de *K. pneumoniae* M5a1 podría tener una vía de utilización de hipoxantina como fuente de nitrógeno independiente de molibdeno, elemento fundamental para la actividad XDH. Como mencionamos anteriormente, la enzima XDH, que cataliza la oxidación de hipoxantina a ácido úrico, requiere el cofactor de molibdeno MoCo (Hille, 2005). Sin embargo, mutantes de *K. pneumoniae* en la síntesis de MoCo pueden usar hipoxantina como fuente de nitrógeno.

No se identificaron genes de *K. pneumoniae* implicados en la degradación de purinas hasta el año 2004 (Chou *et al.*, 2004). En este estudio se analizaron aislados patógenos de *K. pneumoniae* asociados a infecciones hepáticas, y los compararon con cepas no patógenas. Entre las cepas no patógenas se encontraba la MGH78578, cuyo genoma se ha hecho público recientemente. A diferencia de las cepas no patógenas, las patógenas contienen un locus de 22Kb asociado al metabolismo de la alantoína, que es ortólogo al regulón *all* de *E. coli* (FIGURA 1.5.). Este estudio muestra que el locus identificado está implicado en la utilización de alantoína como fuente de carbono y de nitrógeno, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas.

Los niveles de alantoína se encuentran incrementados en pacientes con artritis reumatoide (Grootveld y Hallwell, 1987), enfermedad crónica del pulmón (Moison *et al.*, 1997), meningitis bacteriana (Kastenbauer *et al.*, 2002) y diabetes insulino-independiente (Benzie *et al.*, 1999). Las infecciones hepáticas provocadas por los aislados de *K. pneumoniae* analizados son frecuentes en enfermos de diabetes. Por ello, Chou *et al.*, 2004 postulan que la capacidad de asimilación de alantoína podría suponer una ventaja para las cepas patógenas en su competencia, con el resto de microorganismos de la microbiota humana, por la obtención de nitrógeno.

Parece existir una gran variabilidad fenotípica y genotípica entre las distintas cepas de *K. pneumoniae* (Martínez *et al.*, 2004; Brisse y Verhoef, 2001). Características como la presencia de plásmidos (Hartstein *et al.*, 1993), la resistencia a determinados antibióticos (Bouza y Cercenado, 2002) o el aspecto de las colonias (Lai *et al.*, 2003), pueden ser muy diferentes entre cepas. Posiblemente la capacidad de metabolizar alantoína como fuente de nitrógeno puede reflejar también esta variabilidad.

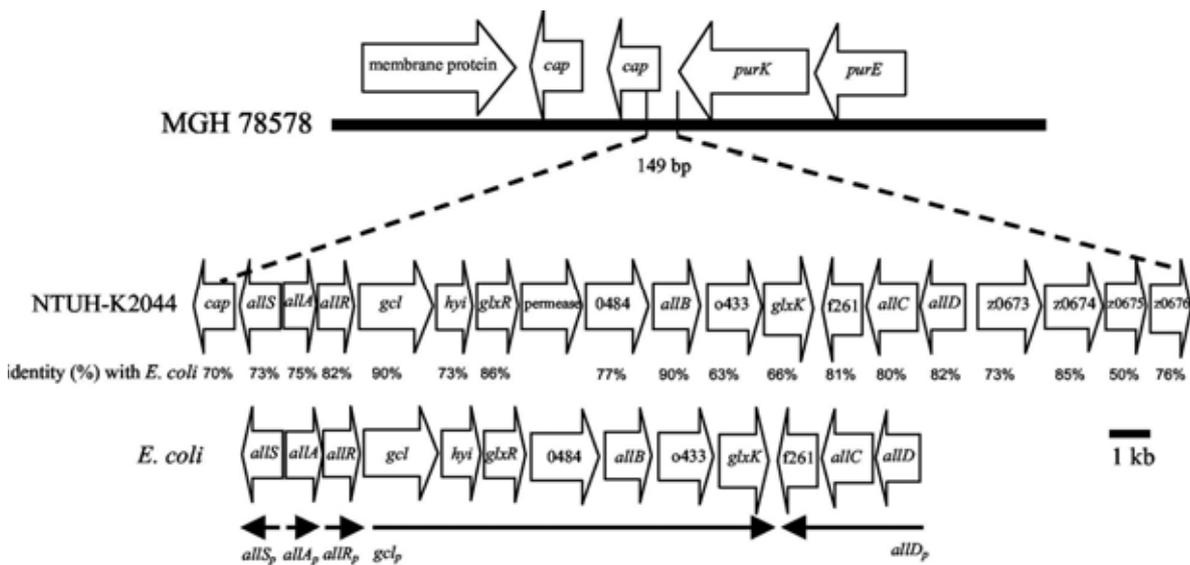


FIGURA 1.5.: Regulón *all* de la cepa patógena de *K. pneumoniae* NTUH-K2044. Chou *et al.*, 2004.

1.2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

1.2.1. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN PROCARIOTAS

Las bacterias son organismos que viven en hábitats que cambian con mucha frecuencia y para adaptarse a estos cambios medioambientales han desarrollado una serie de mecanismos de control de la expresión génica a diferentes niveles como son la modificación de la estructura del DNA (el cambio en el grado de superenrollamiento puede contribuir a la activación o a la represión de la expresión de diferentes genes), la regulación del proceso de transcripción (momento en el que la mayoría de genes son regulados), la estabilidad del mRNA, el proceso de traducción, así como procesos post-traduccionales (procesos de fosforilación/desfosforilación). A continuación se detallan distintos mecanismos de regulación relacionados con este trabajo.

1.2.1.1. Elementos reguladores en *cis*

El inicio de la transcripción viene determinado por la unión de la RNA polimerasa al promotor del gen u operón que se ha de transcribir, existiendo muchos factores que favorecen o impiden esta unión. La RNA polimerasa de las eubacterias es una enzima formada por cuatro subunidades que constituyen el núcleo o *core* ($\alpha_2\beta\beta'$) que forma la maquinaria básica para la síntesis del RNA, y una subunidad σ , de la que existen diferentes clases (σ^{70} , σ^{54} , σ^{32} , σ^{24} , σ^{28} y σ^{38}), que es la encargada de dirigir el núcleo hacia un tipo de promotor concreto. Cada uno de estos promotores posee una secuencia característica que es reconocida por el correspondiente factor σ .

La expresión de la mayoría de genes involucrados en las funciones celulares más habituales (genes *housekeeping*) está mediada por la subunidad σ^{70} , codificada por el gen *rpoD*. Los elementos en *cis* característicos de los promotores de los genes transcritos por σ^{70} son tres (de Haseth *et al.*, 1998):

- a) Un hexámero de secuencia consenso TATAAT y situado en la posición -10 respecto al inicio de la transcripción.

- b) Un segundo hexámero situado en la posición -35 y con una secuencia consenso TTGACA. La separación entre estos hexámeros es de 17 ± 1 pb, y ambos son reconocidos por la subunidad σ^{70} de la RNA polimerasa.
- c) Una secuencia rica en dA+dT denominada elemento UP (*UPstream element*). Esta secuencia suele encontrarse entre las posiciones -40 y -60.

El grado de conservación de la secuencia de estos tres elementos respecto al consenso, así como la separación entre los elementos -10 y -35, determina la capacidad de unión de la RNA polimerasa al promotor y, en consecuencia, el nivel de transcripción del gen o genes bajo su control.

La subunidad σ^{54} , codificada por el gen *rpoN*, se asocia habitualmente a procesos relacionados con la asimilación de nitrógeno. Las subunidades σ^{32} , σ^{24} , σ^{28} y σ^{38} son homólogas a σ^{70} , pero σ^{54} posee varias características distintivas que la hacen única (Buck *et al.*, 2000). El complejo de la RNA polimerasa formado por el núcleo y la subunidad σ^{70} puede ser suficiente para la formación del complejo abierto necesario para el comienzo de la transcripción. Por el contrario, la RNA polimerasa solamente puede formar el complejo abierto con σ^{54} con la ayuda de las proteínas activadoras EBP (*Enhancer Binding Proteins*). Los activadores se suelen unir a 100pb, al menos, de la secuencia de unión de σ^{54} , por lo que la interacción entre σ^{54} y las EBP requiere la curvatura del DNA, la cual está facilitada en algunos casos por *DNA bending proteins*, como IHF (*Integration Host Factor*, Carmona *et al.*, 1997).

La secuencia consenso establecida para la unión de σ^{54} al DNA es YTGGCACGNNNNTTGCW (Y: pirimidina; W: A o T.) y en ella se reconocen los elementos característicos -24 (GG) y -12 (GC) (Barrios *et al.*, 1999). En el caso de *E. coli*, el contenido medio en dA+dT de los 50pb localizados inmediatamente a 5' de esta secuencia es del 50-70% y la longitud media de las regiones intergénicas que contienen un promotor σ^{54} es de 267 ± 106 pb y (Reitzer y Schneider, 2001). Las dianas reconocidas por IHF también tienen un alto contenido en dA+dT y en los casos en los que no se necesitan *DNA bending proteins* la curvatura natural del DNA tiene lugar en regiones ricas en dA+dT.

1.2.1.2. Elementos reguladores en *trans*

1.2.1.2.1. Regulación por la estructura del DNA

La estructura del DNA, como puede ser la formación de bucles, tiene gran importancia en procesos como la regulación transcripcional. Estos giros se forman en el DNA cuando 2 proteínas se unen a lugares específicos del DNA separados entre sí e interaccionan entre ellas, o bien, cuando una única proteína se une a dos lugares de unión diferentes y alejados entre si. La formación del giro puede requerir, en función de la fuerza de las interacciones de las uniones, las *DNA bending proteins* (como IHF) que favorecen la formación de esta estructura. Este tipo de proteínas acostumbran a unirse al DNA entre las regiones de unión de las proteínas que deben interaccionar entre sí, ya sean reguladores globales o específicos.

Los factores transcripcionales que producen la curvatura del DNA, denominados de forma general proteínas similares a las histonas (*histonelike proteins*) por su similitud con las histonas de eucariotas, también participan en el empaquetamiento del cromosoma bacteriano. Entre ellas se encuentran las proteínas IHF, FIS (Yuan *et al.*, 1991), HU (Tsunehiro y Adhya, 1997) y H-NS (Spurio *et al.*, 1997). Todas ellas se caracterizan por ser pequeñas, básicas y relativamente abundantes, y aunque son bastantes similares existen diferencias entre ellas. Una de estas diferencias es que mientras que IHF y FIS se unen a una secuencia de DNA específica, HU y H-NS son capaces de unirse al DNA de forma inespecífica en regiones intrínsecamente curvadas.

La proteína IHF está formada por dos subunidades codificadas por los genes *himA* y *himD*. El nombre de IHF procede del hecho de que fue descrita por primera vez como un factor necesario para la integración del fago λ *in vitro*, aunque hoy en día se sabe que la proteína IHF participa en un amplio abanico de procesos fisiológicos, como la replicación, la recombinación específica, la transposición, así como en la regulación de la expresión de diversos genes.

El lugar de unión de IHF es una región de DNA de aproximadamente 35 pb, dividida en dos dominios asimétricos, uno de los cuales está formado por una secuencia conservada de 13 pb y otro por una secuencia degenerada rica en dA+dT (Goodman *et al.*, 1999). La secuencia consenso correspondiente al primer dominio es WATCAAnnnnttR (W=A/T, R=A/G; En mayúsculas, los nucleótidos más conservados).

1.2.1.2.2. Reguladores LysR

Los reguladores de la familia LysR constituyen la familia de reguladores más numerosa en procariontes. En el año 2004 estaba compuesta por más de cien miembros implicados en la regulación de genes con funciones muy diversas (Tropel y van der Meer, 2004). Estas proteínas se caracterizan por presentar una longitud de 276-324aa y contener tres o cuatro dominios característicos: un dominio amino terminal con estructura secundaria de hélice-giro-hélice implicado en el reconocimiento y unión al DNA, un dominio carboxi terminal relacionado con las interacciones entre las distintas subunidades e interacciones DNA-proteína y, finalmente, uno o dos dominios implicados en la unión de las moléculas efectoras (Schell, 1993).

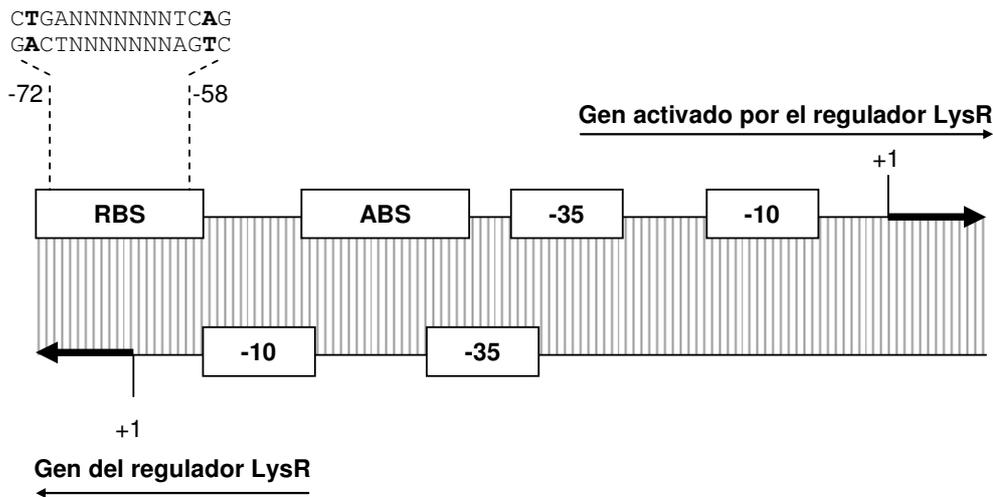


FIGURA 1.6.: Estructura de un promotor divergente regulado por un regulador del tipo LysR. RBS: Regulator/Repressor Binding site. ABS: Activator Binding Site. Se indica un ejemplo de motivo T-N₁₁-A con extremos simétricos, donde se resaltan en negrita la T y la A.

Habitualmente estos reguladores activan la transcripción de los genes que se transcriben de manera divergente a su propio gen, el cual es reprimido por ellos mismos. Dicha activación se produce en respuesta a una molécula inductora y se caracteriza porque el regulador interacciona con dos secuencias del promotor denominadas RBS (*Repressor/Regulator Binding Site*) y ABS (*Activation Binding Site*) (FIGURA 1.6.). El elemento RBS se encuentra en torno a la posición -65 respecto al inicio de transcripción del gen activado y solapada con el promotor del gen del regulador. Contiene la secuencia consenso T-N₁₁-A dentro de una región de 15pb cuyos extremos son simétricos. El elemento ABS, en cambio, no tiene ninguna secuencia consenso asociada pero se caracteriza por

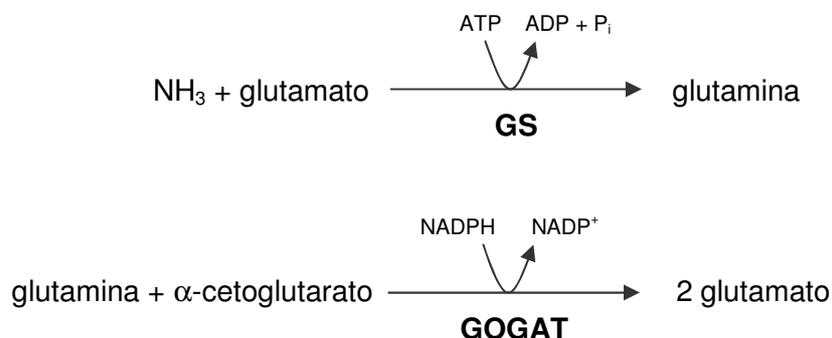
localizarse entre RBS y el promotor activado y, menudo, se encuentra solapado con la caja -35. Mientras que el elemento RBS es fundamental para el reconocimiento del promotor por el regulador LysR y suficiente para que tenga lugar la autorregulación, el elemento ABS es esencial para la activación de la transcripción y, frecuentemente, la interacción con esta secuencia requiere la unión del inductor (Schell, 1993).

1.2.2. REGULACIÓN POR NIVELES DE NITRÓGENO. EL SISTEMA NTR DE ENTEROBACTERIAS

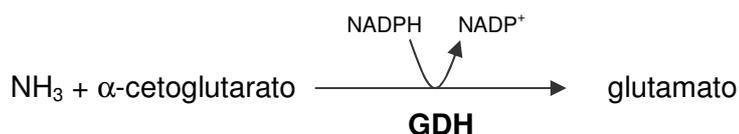
La fuente de nitrógeno preferida por las bacterias es el amonio debido a que con él las células se dividen más rápidamente que con cualquier otra fuente de nitrógeno. Sin embargo, el amonio no siempre se encuentra disponible en el medio y por ello las distintas especies poseen mecanismos moleculares que les permiten obtenerlo de fuentes de nitrógeno alternativas como aminoácidos, algunos compuestos de nitrógeno inorgánicos o bases nitrogenadas. Las condiciones en las que en el medio no se encuentra la fuente de nitrógeno preferida, sino otras alternativas que no permiten un crecimiento tan rápido, se denominan condiciones de nitrógeno limitantes.

La molécula donadora del 75% del nitrógeno celular es el glutamato, mientras que el 25% del nitrógeno celular proviene de la glutamina (Neihardt y Umbarger, 1996). Por tanto, la asimilación de nitrógeno requiere la síntesis de ambos compuestos. En el caso de fuentes de nitrógeno que no pueden transferir el nitrógeno contenido en su estructura directamente a glutamato o glutamina mediante transaminación, el amonio se convierte en el intermediario obligatorio (Reitzer y Schneider, 2001).

Existen dos rutas para la asimilación de amonio en enterobacterias. En la primera, la enzima glutamina sintetasa (GS) cataliza la conversión de amonio y glutamato en glutamina y la enzima glutamato sintasa (GOGAT) transfiere el grupo amida de la glutamina a α -cetoglutarato para producir dos moléculas de glutamato (Merrick y Edwards, 1995).



En la segunda, la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) cataliza la conversión de amonio y α -cetoglutarato en glutamato. Sin embargo, debido a la alta K_m de la GDH (1mM, veinte veces superior a la de la GS), esta vía de asimilación de amonio solamente tiene lugar en condiciones de exceso de nitrógeno (Merrick y Edwards, 1995).



Durante el crecimiento en condiciones limitantes de nitrógeno se induce la expresión de genes implicados en el transporte y catabolismo de diversas fuentes de nitrógeno (Prival

y Magasanik, 1971). La regulación coordinada de la expresión de estos genes se denomina control o regulación por nitrógeno. Hasta el momento, los trabajos publicados sobre esta regulación en enterobacterias, asocian el control por nitrógeno al sistema NTR (*Ni*Trogen *Regulatory system*). Este sistema se compone de cuatro proteínas: UTasa-UR (UridylylTransferase-UridylylRemoving), P_{II}, NtrB y NtrC (*Ni*Trogen *Regulatory protein C*). UTasa-UR y P_{II} están implicadas, por una parte, en la regulación de la actividad de la enzima GS (FIGURA 1.7.) y, por otra parte, en la regulación de la transcripción de genes dependientes de σ^{54} . NtrB es una quinasa que, en condiciones de nitrógeno limitantes, fosforila al regulador NtrC, el cual, en su estado fosforilado es capaz de activar la transcripción de genes a partir de promotores dependiente de σ^{54} .

La activación de la transcripción mediada por NtrC requiere que el promotor del gen activado contenga al menos dos secuencias de unión de NtrC (Porter *et al.*, 1993). Estas secuencias generalmente se localizan en torno a la posición -100 respecto al inicio de transcripción y cada una de ellas es reconocida por un dímero de NtrC. Debido a la distancia existente entre las dianas de NtrC y la secuencia de unión de σ^{54} , el contacto entre ambas proteínas generalmente está facilitado por la curvatura del DNA que produce el factor IHF (Carmona *et al.*, 1997). La disposición de las secuencias de unión de NtrC, IHF y σ^{54} en el promotor del operón *glnHPQ* de *E. coli*, implicado en el transporte de glutamina, se muestra en la FIGURA 1.7. El hecho de que los promotores activados por NtrC contienen al menos dos secuencias de unión de esta proteína se debe a que la interacción entre este activador y la subunidad σ^{54} requiere que NtrC forme un oligómero compuesto por al menos dos dímeros (Porter *et al.*, 1993). La formación de tal oligómero sólo se puede llevar a cabo una vez que NtrC es fosforilado por NtrB.

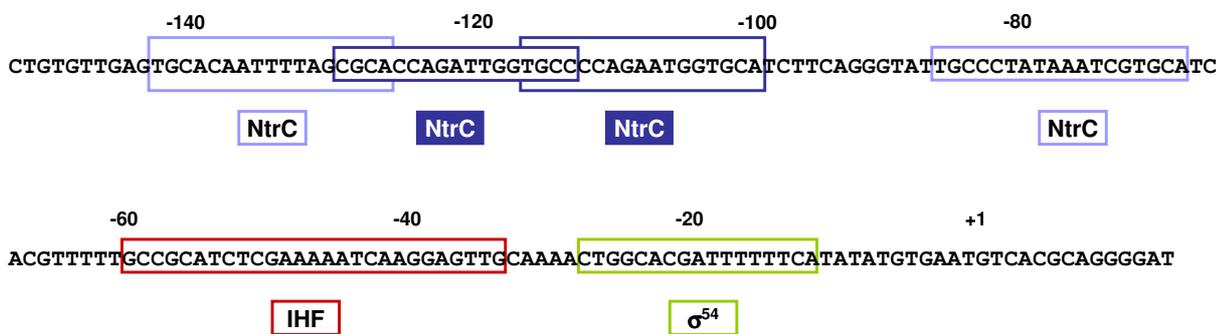


FIGURA 1.7.: Esquema de la localización de las secuencias de unión de NtrC, IHF y σ^{54} en el promotor del operón *glnHPQ* de *E. coli*. Este promotor contiene cuatro dianas de unión de los dímeros de NtrC. Este activador ocupa primeramente las secuencias localizadas en torno a las posiciones -120 y -100 respecto al inicio de transcripción (recuadros azul oscuro). Las secuencias localizadas en torno a las posiciones -140 y -80 (aul claro) son ocupadas cuando la concentración intracelular de NtrC es elevada (Claverie-Martin y Magasanik, 1991).

En condiciones limitantes de nitrógeno UTasa-UR modifica covalentemente a P_{II} añadiéndole el nucleótido UMP. P_{II}-UMP interacciona con NtrB, el cual se autofosforila y transfiere el grupo fosfato a NtrC. NtrC-P interacciona con σ^{54} favoreciendo la formación del complejo abierto necesario para iniciar la transcripción. Por el contrario, en condiciones de exceso de nitrógeno P_{II} permanece sin modificar. P_{II} no uridilado es incapaz de interaccionar con NtrB, lo que provoca la desfosforilación de NtrC-P por NtrB. De esta manera, NtrC desfosforilado puede unirse al DNA pero es incapaz de interaccionar con σ^{54} (FIGURA 1.8.) (Reitzer y Schneider, 2001; Merrick y Edwards, 1995; Bender RA, 1991).

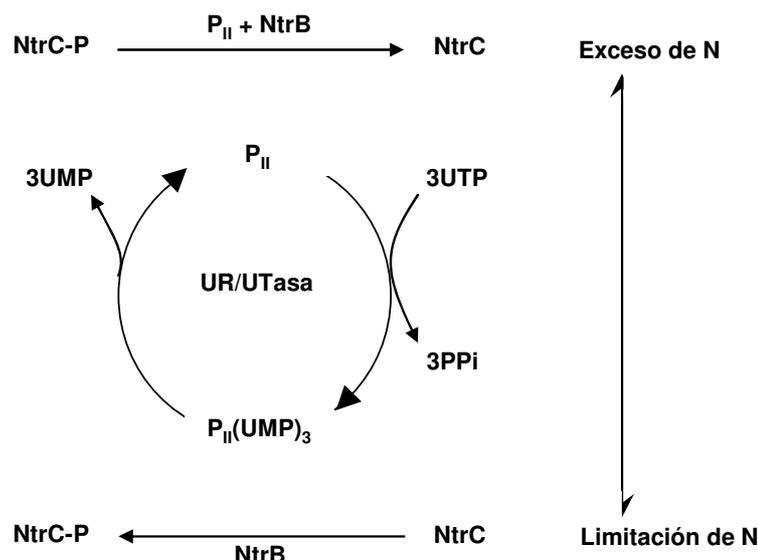


FIGURA 1.8.: Modelo de la regulación de la actividad de NtrC en respuesta a las condiciones de nitrógeno. (Merrick y Edwards, 1995). UR/UTasa cataliza la uridilación y desuridilación de P_{II} . NtrB cataliza la fosforilación y desfosforilación de NtrC.

1.2.2.1. Regulación por nitrógeno en *K. pneumoniae*

Diversos sistemas génicos se encuentran regulados por los niveles de nitrógeno en *Klebsiella pneumoniae* a través del sistema NTR (TABLA 1.1.). La regulación mediada por el sistema NTR puede tener lugar directamente o indirectamente a través de la proteína NAC (*Nitrogen Assimilation Control*).

TABLA 1.1.: Rutas regulables por la disponibilidad de nitrógeno en *K. pneumoniae* (Bender, 1991; Janes y Bender, 1998).

RUTA	METABOLISMO
Glutamina sintetasa (GS)	
Glutamato sintasa (GOGAT)	Asimilación de amonio
Glutamato deshidrogenasa (GDH)	
Utilización de histidina	
Utilización de prolina	
Utilización de triptófano	Catabolismo de aminoácidos
Utilización de alanina	
Utilización de asparragina	
Utilización de ornitina	
Fijación de nitrógeno	Metabolismo de compuestos nitrogenados inorgánicos
Reducción de nitrato	
Utilización de urea	Metabolismo de compuestos nitrogenados orgánicos

NAC es un regulador de la familia LysR que reconoce promotores σ^{70} , a los que se une sin requerir ninguna molécula efectora. En concreto, NAC está implicado en la

regulación de los genes que codifican las enzimas histidasa, prolina oxidasa, ureasa, alanina deshidrogenasa, GDH y GOGAT (Macaluso *et al.*, 1990; Schwacha y Bender, 1993; Janes y Bender, 1998). La regulación por NAC en condiciones de nitrógeno limitantes tiene lugar debido a que la transcripción de su propio gen (*nac*) depende de σ^{54} y es activada por NtrC (Macaluso *et al.*, 1990). De esta manera, NAC acopla la transcripción dependiente de σ^{70} con la regulación efectuada por el sistema NTR, dependiente de σ^{54} (FIGURA 1.9.).

NAC es un regulador muy versátil ya que puede actuar tanto de activador como de represor (Bender, 1991). En general, NAC activa la transcripción de genes implicados en la utilización de malas fuentes de nitrógeno mediante rutas metabólicas que liberan moléculas de amonio (Macaluso *et al.*, 1990), y reprime la expresión de genes implicados en la asimilación de este compuesto como los del operón *gdh* (Schwacha y Bender, 1993). El gen *gdhA* codifica la enzima GDH que, como se expuso anteriormente, en condiciones de exceso de nitrógeno cataliza la incorporación de una molécula de amonio a la estructura molecular del α -cetoglutarato para generar glutamato. Pero además, NAC autorregula la expresión de su propio gen (Feng *et al.*, 1995). Así pues, el gen *nac* es el único dependiente de σ^{54} que es regulado por NAC.

Por lo que respecta a otras enterobacterias, *E. coli* también posee NAC aunque la regulación por esta proteína parece ser insignificante (Bender, 1991). Algunos de los genes regulados por NAC en *K. pneumoniae* o bien están ausentes en *E. coli* (*hut* y *ure*) o no responden a regulación por nitrógeno (*put* y *gdh*; Tyler, 1978). *Salmonella thypimurium*, en cambio, ni siquiera tiene el gen *nac* y los genes *hut* en esta enterobacteria no responden a niveles de nitrógeno (Magasanik, 1978).

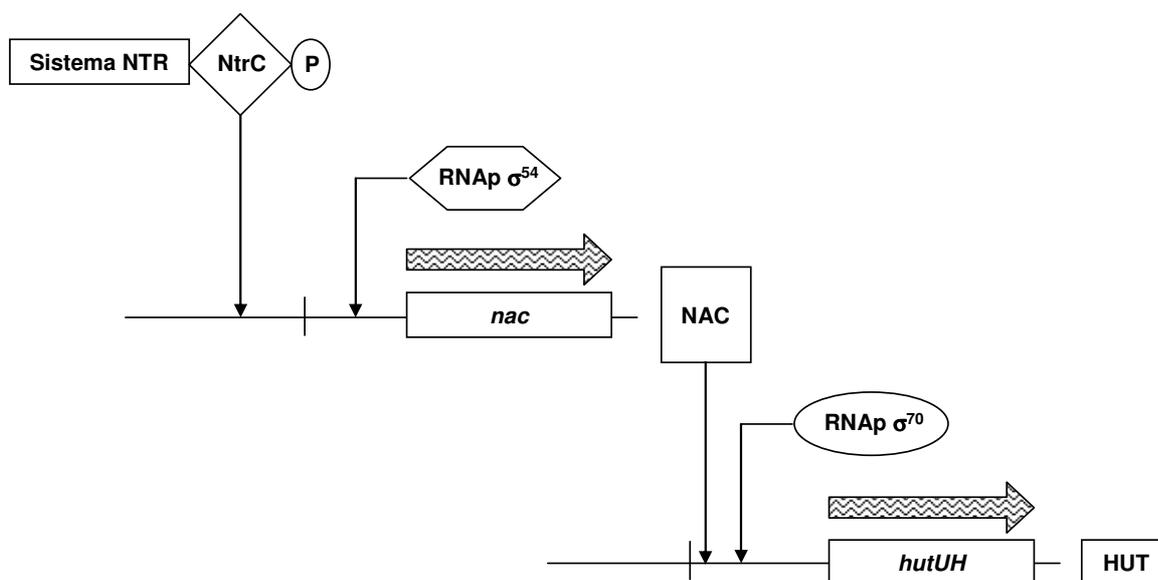


FIGURA 1.9.: El regulador NAC conecta la transcripción de genes dependientes de σ^{70} con la regulación efectuada por el sistema NTR (promotores σ^{54}) (Bender RA, 1991). En el esquema se representa la activación por NAC de la expresión del operón *hut* (histidine utilization) en condiciones de nitrógeno limitantes.

1.2.3. REGULACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE PURINAS EN MICROORGANISMOS

Los microorganismos han desarrollado distintos mecanismos moleculares que les permiten obtener nitrógeno de diversas moléculas y que se activan en condiciones de nitrógeno limitantes. En presencia de una única fuente de nitrógeno distinta de la preferida

por el organismo, como por ejemplo purinas, en el interior celular se transducen dos tipos de señales. En primer lugar aquellas que indican una limitación de nitrógeno. En segundo lugar aquellas que indican la presencia de dicha fuente de nitrógeno y que conllevan a la activación específica de los genes implicados en el catabolismo de dicho compuesto. La transducción de ambas señales requiere la regulación coordinada de los sistemas génicos implicados. Como ejemplo de esta doble regulación expondremos el caso de *B. subtilis* y *A. nidulans*.

1.2.3.1. *Bacillus subtilis*

El mecanismo mediante el cual *B. subtilis* responde a los niveles de nitrógeno no se parece al sistema NTR de las enterobacterias. En lugar de disponer de un sistema que se activa en condiciones de nitrógeno limitantes y se encuentra reprimido bajo un exceso de nitrógeno, *B. subtilis* dispone de tres reguladores, cada uno de los cuales se activa específicamente en cada condición en la que se encuentre esta bacteria. Estos reguladores son CodY, GlnR y TnrA. GlnR actúa como represor cuando las células se encuentran bajo un exceso de nitrógeno. TnrA se activa específicamente en condiciones de nitrógeno limitantes y CodY actúa como represor cuando las células se dividen rápidamente en presencia aminoácidos (Fisher, 1999).

En el apartado INTRODUCCIÓN 1.1.1.1. se explica que el regulón *puc* está implicado en el metabolismo de purinas como fuentes de nitrógeno en *B. subtilis*. En condiciones de nitrógeno limitantes, TnrA activa la transcripción del gen *pucR*, que codifica el regulador PucR (FIGURA 1.10.). PucR induce la transcripción de los genes implicados en el metabolismo de purinas principalmente en presencia de metabolitos derivados de dicho catabolismo. En cambio, PucR inhibe la transcripción del operón *pucABCDE* y de su propio gen (Beier *et al.*, 2002).

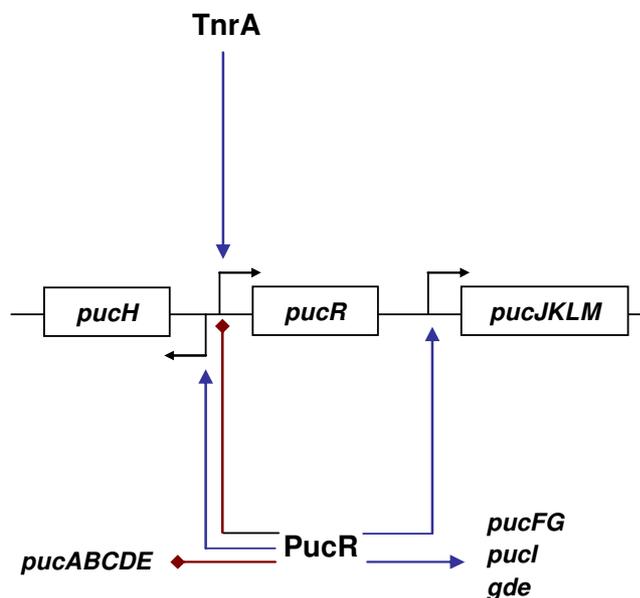


FIGURA 1.10.: Modelo de regulación del regulón *puc* de *B. subtilis*.

Los estudios sobre la regulación del operón *puc* han sido realizados principalmente mediante fusiones de promotor analizadas en cinco condiciones de nitrógeno diferentes: purinas como únicas fuentes de nitrógeno, exceso de nitrógeno, exceso de nitrógeno en presencia de purinas, limitación de nitrógeno y limitación de nitrógeno en presencia de purinas (Christiansen *et al.*, 1997; Nygaard *et al.*, 2000; Beier *et al.*, 2002). Nygaard *et al.*

propusieron el término “semi-exceso de nitrógeno” para definir la situación en la que las purinas se encuentran en un medio con nitrógeno limitante. Estos autores postulan que en estas condiciones la degradación de las purinas, inducida porque las células perciben una situación de limitación de nitrógeno, liberaría moléculas de amonio, lo que provocaría que se activaran los mecanismos de represión por nitrógeno. De esta manera, en esta situación los reguladores asociados a un exceso (GlnR) y a una limitación de nitrógeno (TnrA) actuarían de manera simultánea.

1.2.3.2. *Aspergillus nidulans*

A pesar de ser un organismo eucariota, mencionaremos la regulación del metabolismo de purinas en *A. nidulans* por tratarse de otro ejemplo claro de doble regulación. Las fuentes de nitrógeno preferidas por este hongo son glutamina y amonio, el cual genera glutamina a través de la acción catalizada por la enzima GS. La regulación por nitrógeno se realiza mediante el activador AreA, el cual regula distintos genes implicados en la obtención de nitrógeno mediante represión catabólica por glutamina (Kudla *et al.*, 1990).

La utilización de purinas como únicas fuentes de nitrógeno requiere la síntesis de enzimas catabólicas, mediante la acción de AreA en condiciones de no represión y del regulador específico de este metabolismo UaY. El gen *uaY* se expresa constitutivamente y la inducción por UaY de los genes implicados en el metabolismo de purinas tiene lugar mediante el inductor ácido úrico. La proteína UaY también participa en la regulación del gen *xanA*, el cual está implicado en una vía alternativa de conversión de xantina en ácido úrico (Suárez *et al.*, 1995).

Otras especies de hongos poseen mecanismos de represión catabólica, efectivos durante el crecimiento en condiciones de exceso de nitrógeno, similares al de *A. nidulans*. En algunos casos, parece ser que existe una relación entre la patogenicidad y los reguladores globales como AreA. Dichos reguladores controlan multitud de procesos celulares como reacciones catalizadas por proteasas, las cuales están implicadas en los mecanismos de patogenicidad. Por ejemplo, un mutante *areA* de la especie *A. fumigatus* muestra un crecimiento reducido en tejido pulmonar murino con respecto a la cepa tipo salvaje. Esto, junto a otras evidencias existentes en la bibliografía, muestra que la utilización de las fuentes de nitrógeno disponibles en el pulmón requiere la activación de las enzimas catabólicas pertinentes mediante des-represión de sus genes (Hensel *et al.*, 1995).

MATERIALES

2. MATERIALES

2.1. CEPAS BACTERIANAS

Las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* que fueron utilizadas en este trabajo se presentan en la TABLA 2.1. Se indican las características más importantes y el origen o referencia de cada una de ellas. Las cepas de *E. coli* se emplearon como cepas auxiliares.

TABLA 2.1. Cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Para cada cepa se indica su nombre, descripción del genotipo y/o fenotipo y su origen o referencia.

CEPAS	GENOTIPO/FENOTIPO	REFERENCIA	
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α F'	ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 <i>recA1 endA1</i> λ^- <i>gyrA96 thi-1 hsdR17</i> ($r_K^- m_K^+$) <i>phoA supE44 relA1 deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169	Gibco BRL
	ECL1	HfrC <i>phoA8 relA1 tonA22 T2^f</i> (λ)	Lin, 1976
	HN1491	<i>strA galK2</i> su^o λ^- F ⁻ <i>himA::cat</i>	Granston y Nash, 1993
	RJ1802	MG1655 Δ <i>lac X74 fis::767</i>	Ball <i>et al.</i> , 1992
	BSN27	MC4100 <i>trp::Tn10</i> Δ <i>hns</i>	Johnson <i>et al.</i> , 1998
	XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^fZ</i> Δ M15 Tn10(Tc ^r)]	Stratagene
	S17-1 λ pir	Tp ^f Sm ^f <i>recA thi pro hsdR M^fRP4::2-Tc::Mu::Km Tn7</i> λ	Biomedal
EB6193	RP4-2 <i>tet::Mu -1 kan::Tn7 leu-63::IS10 recA1 creC510 hsdR17 endA1 zbf-5 uidA</i> (Δ MuI): <i>pir+</i> <i>thi Sp^R/Sm^R</i>	R.A. Bender. University of Michigan.	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KC2653	<i>hutC515</i> Δ [<i>bla</i>]-2 <i>dadA1 str-6</i>	Liu y Bender, 2007
	52145	serotipo O1:K2, lleva el plásmido de virulencia pKP100	Nassif <i>et al.</i> , 1989
	ATCC 13882	American Type Culture Collection	Cowan <i>et al.</i> , 1960.
	ATCC 13883	American Type Culture Collection	Sherman <i>et al.</i> , 1980.
	LC1	KC2653 <i>hpxD::mini-Tn5 Km</i>	Este trabajo.
	LC5	KC2653 <i>glnD::mini-Tn5 Km</i>	Este trabajo.
	LC8	KC2653 <i>hpxE::mini-Tn5 Km</i>	Este trabajo.
	LC30	KC2653 <i>gltD::mini-Tn5 Km</i>	Este trabajo.
	LCO20	KC2653 <i>hpxO::kan</i>	Este trabajo.
	LCP6	KC2653 <i>hpxP::kan</i>	Este trabajo.
	LCR3	KC2653 <i>hpxR::kan</i>	Este trabajo.
	KC2562	<i>hutC515 rpoN5018</i>	Macaluso <i>et al.</i> , 1990
	KC5249	<i>hutC515</i> Δ [<i>bla</i>]-2 <i>nac-2</i>	R.A. Bender. University of Michigan.

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KC2738	<i>hutC515 ntrC2::Tn5-131</i>	Bender y Friederich, 1990.
	KC6483	<i>hutC515 Δ[bla]-2 str-6</i> [$\Delta rbs(A'BC'K)::pCB1583$]	R.A. Bender. University of Michigan.
	$\Phi(hpxD-lacZ)$	<i>hpxD</i> (-346 a +97) fusionado a <i>lacZ</i>	Este trabajo.
	$\Phi(hpxR-lacZ)$	<i>hpxR</i> (-212 a +93) fusionado a <i>lacZ</i>	Este trabajo.
	$\Phi(hpxO-lacZ)$	<i>hpxO</i> (-267 a +288) fusionado a <i>lacZ</i>	Este trabajo.
	$\Phi(hpxP-lacZ)$	<i>hpxP</i> (-258 a +297) fusionado a <i>lacZ</i>	Este trabajo.

2.2. VECTORES

En este trabajo se emplearon diferentes tipos de vectores: plasmídicos y fágicos, que se detallan en la TABLA 2.2. Los vectores plasmídicos se utilizaron en la clonación de diferentes fragmentos de DNA, construcción de cepas mutantes, estudio de fusiones de promotor y expresión y/o purificación de proteínas. Los vectores fágicos se usaron para la transducción de material genético entre cepas bacterianas.

TABLA 2.2. Vectores utilizados en este trabajo. Para cada vector se indica su nombre y el tipo de ensayo en el que ha sido utilizado, así como una descripción de sus principales características y su origen o referencia.

VECTOR	APLICACIÓN	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
pUC18 <i>Not</i> (2.715 pb)	Plásmido auxiliar para clonación usando dianas <i>NotI</i> .	Ap ^r , <i>α-lacZ</i> , región de clonación flanqueada por dianas <i>NotI</i> . Alto número de copias.	Biomedal
pGEMT (3 kb)	Clonación de fragmentos con extremos 3' dA.	Ap ^r , <i>α-lacZ</i> . Alto número de copias.	Promega
pUT mini-Tn5 Km (7.575 pb)	Mutagénesis al azar.	Ap ^r , <i>oriR6K</i> , <i>mobRP4</i> , <i>tnp*</i> , mini-Tn5 Km. Bajo número de copias.	Biomedal
pKAS32 (4.400 pb)	Mutagénesis dirigida.	Ap ^r , <i>oriR6K</i> , <i>mobRP4</i> , <i>rpsL</i> . Bajo número de copias.	Skorupsky <i>et al.</i> , 1996.
pRS415 (10.752 pb)	Construcción fusiones transcripcionales.	Ap ^r , <i>lacZYA</i> . Alto número de copias.	Simons <i>et al.</i> , 1987
pCB1583 (14,4 Kb)	Inserción de fusiones transcripcionales.	Ap ^r , Km ^r , <i>oriR6K</i> , <i>mobRP4</i> , <i>rpsL</i> , <i>rbsA' lacZ rbsK'</i> . Bajo número de copias.	Liu y Bender, 2007
pUC19 (2.686 pb)	Clonación.	Ap ^r , <i>α-lacZ</i> . Alto número de copias.	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pMAL-c2x (6.646 pb)	Expresión y purificación de proteínas de fusión a MBP.	Ap ^r , <i>malE</i> , <i>α-lacZ</i> , <i>lacI^q</i> . Alto número de copias.	New England Bio Labs
pBR322 (4.363 pb)	Clonación.	Ap ^r , Tc ^r . Alto número de copias.	Gibco BRL

pKD4 (3.267 pb)	Mutagénesis dirigida	Ap ^r , Km ^r , <i>oriR6K</i> ; <i>kan</i> se encuentra flanqueado por las dianas de la recombinasa FLP.	Datsenko y Wannner, 2000.
P1	Transducción.	Bacteriófago P1 tipo salvaje	Miller, 1992

2.2.1. PLÁSMIDOS

Los vectores pUC18*Not*, pGEMT, pUC19 y pMal-c2x tienen la característica común de permitir discriminar a simple vista las colonias transformadas con los vectores recombinantes de aquellas que contienen los vectores no recombinantes, gracias al fenómeno de la α -complementación.

Estos vectores codifican, bajo el control de un promotor *lac*, el fragmento amino terminal de la enzima β -galactosidasa, conocido como subunidad α , capaz de complementar el producto génico de *lacZ* Δ M15 (subunidad ω). La región de clonación (*polylinker*) de estos plásmidos se localiza dentro de la zona codificante de la subunidad α , de tal forma que cuando no se ha clonado ningún fragmento de DNA, se produce una subunidad α íntegra capaz de complementar la subunidad ω . En cepas *lacZ* Δ M15 (Ej. XL1-Blue) transformadas con un vector no recombinante y en presencia de IPTG (un inductor del operón *lac*) y X-Gal (un sustrato de la β -galactosidasa), se genera una proteína β -galactosidasa funcional capaz de hidrolizar X-Gal, cuyo producto de degradación confiere a la colonia un color azul. Por el contrario, cuando se ha clonado un fragmento de DNA, se interrumpe el gen que codifica la subunidad α (*lacZ*), de tal forma que no es posible la α -complementación, y al no existir una proteína β -galactosidasa funcional, el X-Gal no es hidrolizado y las células mantienen su color blanco.

2.2.1.1. Vectores de clonación

pUC19 deriva de pBR322 y posee la ventaja adicional de permitir distinguir colonias provenientes de células que contienen el vector recombinante gracias al fenómeno de la α -complementación (MATERIALES 2.2.1.).

El vector pUC18*Not* deriva del pUC18 diferenciándose de éste en la presencia de dianas *NotI* flanqueando la región de clonación. El plásmido pUC18 es igual que el pUC19 pero con la región de clonación en sentido opuesto. Esta característica permite emplear pUC18*Not* como plásmido auxiliar en la clonación de fragmentos de DNA. Ya que la diana *NotI* es bastante infrecuente, los genes clonados en pUC18*Not* se pueden escindir como fragmentos *NotI* y ser subclonados en la diana *NotI* de la región de clonación de cualquier otro plásmido (Herrero *et al.*, 1990).

El vector pGEMT se comercializa (Promega) en forma lineal y con una desoxitimidina añadida a cada extremo 3' (3' dT), lo que permite ligar fragmentos de PCR amplificados con DNA polimerasas que añaden desoxiadenosina a cada extremo 3' del producto amplificado (Ej. *Taq*).

2.2.1.2. Plásmidos utilizados para la obtención de mutantes

Los vectores pUTmini-Tn5 Km (Herrero *et al.*, 1990) y pKAS32 (Skorupsky y Taylor, 1996) derivan del plásmido pGP704 (Miller *et al.*, 1988) y guardan varias características comunes que les hacen útiles como herramientas en la obtención de mutantes. En primer lugar, estos plásmidos poseen el origen de replicación *oriR6K* que requiere la proteína π , codificada por el gen *pir*, para su propagación. Por esta razón estos vectores solamente se pueden mantener en cepas que contienen el gen *pir* (Ej. *E. coli* S17-1 λ *pir*). En segundo lugar, contienen el origen de transferencia *mobRP4* de tal manera que pueden ser transferidos de una bacteria donadora, que tenga las funciones de transferencia RP4 integradas en su cromosoma, a una bacteria receptora mediante conjugación.

El vector pUTmini-Tn5 Km se utilizó para procesos de mutagénesis al azar ya que contiene un elemento transponible, el mini-Tn5 Km, que consiste en un casete de Km flanqueado por los extremos I y O, de 19 pb, del transposón Tn5 (de Lorenzo *et al.*, 1990). La transposición de este elemento se lleva a cabo gracias a una transposasa específica codificada por el gen *tnp** localizado en el vector pUT (Herrero *et al.*, 1990).

El vector pKAS32 contiene el gen *rpsL* que codifica para la proteína ribosomal S12, lo que permite distinguir entre bacterias que contengan o no este plásmido. Las cepas que son Sm^r contienen una mutación en el gen *rpsL* cromosómico. En presencia de *rpsL* salvaje, aportado en este caso por pKAS32, dicha mutación se manifiesta recesiva y la cepa muestra un fenotipo Sm^s (Skorupsky y Taylor, 1996).

2.2.1.3. Plásmidos utilizados para la construcción de fusiones transcripcionales

Para el estudio de la actividad promotora de fragmentos de DNA mediante su fusión al gen indicador *lacZ*, que codifica la enzima β -galactosidasa, se emplearon los plásmidos pRS415 y pCB1583. La fusión transcripcional se obtiene en pRS415 y posteriormente se subclona en pCB1583 para su inserción unicopia en el genoma de *K. pneumoniae*.

El gen *lacZ* del vector pRS415 no está bajo el control de ningún promotor. En su lugar encontramos la región de clonación compuesta por las tres dianas de restricción *EcoRI*, *SmaI* y *BamHI*. Esta región de clonación está situada a 5' de los genes *lacZ*, *lacY* y *lacA*, y a 3' de 4 copias del terminador de la transcripción *T1* que evitan que pueda tener lugar la expresión del gen *lacZ* a partir de promotores no caracterizados existentes en el propio vector (Simons *et al.*, 1987). Cuando se clona un fragmento de DNA, el gen *lacZ* se expresará más o menos en función de la actividad promotora del fragmento clonado. Los clones recombinantes se pueden seleccionar, en presencia de X-Gal, por su color, ya que la hidrólisis del X-Gal por la β -galactosidasa origina un compuesto que confiere color azul a las colonias.

Una vez clonado el fragmento en pRS415, la fusión transcripcional se subclona en pCB1583 utilizando las dianas *EcoRI* y *SacI* situadas, respectivamente, en la región de clonación y en el gen *lacZ* (MÉTODOS 3.4.1.2.). En pCB1583 la fusión transcripcional queda flanqueada en un extremo por el gen *rbsA* y en el otro por *rbsK*, que son copias truncadas de los genes *rbsA* y *rbsK*, implicados en el metabolismo de ribosa. El vector pCB1583, al igual que los plásmidos pUTmini-Tn5 Km y pKAS32 (MATERIALES 2.2.1.2.), posee el origen de replicación *ori6K*, dependiente de la proteína π , y el origen de transferencia en los procesos de conjugación *mobRP4*.

2.2.1.4. Vectores utilizados para la expresión y/o purificación de proteínas

Para la expresión y purificación de proteínas se utilizó el vector pMAL-c2x. En este vector la región de clonación se localiza a 3' del gen *malE* que codifica la proteína de unión a maltosa (MBP), dando lugar a un producto de expresión consistente en una proteína de fusión a MBP (Guan *et al.*, 1987). pMAL-c2x contiene el gen *lacI^f*, que sobreexpresa el represor LacI, y al menos una copia del operador *lac*, de manera que la sobreexpresión de la proteína de fusión, como se mencionó anteriormente, es inducible por IPTG. A 3' de *malE* y a 5' de la región de clonación se localiza una secuencia nucleotídica que genera un péptido de 10 asparraginas cuya función consiste en dejar el suficiente espacio entre la MBP y el producto del gen clonado como para que tenga lugar el plegamiento propio de cada una de las dos proteínas. Tras esta secuencia se localiza una secuencia que codifica la diana reconocida por el Factor Xa, proteasa que se utiliza para digerir la proteína de fusión.

2.2.2. FAGOS

El bacteriófago P1 se ha utilizado en la transferencia de material genético de una cepa a otra mediante transducción generalizada (MÉTODOS 3.1.2).

2.3. OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos, cebadores o *primers* utilizados en este trabajo para amplificar fragmentos de DNA mediante PCR (MÉTODOS 3.3.4.), sintetizar cDNA (MÉTODOS 3.5.3.) o secuenciar DNA (MÉTODOS 3.3.7.), fueron suministrados por Invitrogen y Sigma-Genosys. Estos fueron diseñados totalmente complementarios a la secuencia a la que debían hibridar. En algunos casos se adicionó al extremo 5' secuencias que contenían dianas para diferentes endonucleasas de restricción, para facilitar la posterior clonación del producto de PCR resultante.

En el ANEXO 1. se detalla la secuencia de todos los oligonucleótidos utilizados en este trabajo, indicándose para todos ellos su nombre, secuencia nucleotídica y aplicación.

2.4. REACTIVOS Y KITS COMERCIALES

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron adquiridos de la máxima pureza y calidad requerida en cada caso. La conservación (temperatura, humedad, efecto de la luz) y manipulación (esterilidad, toxicidad, preparación extemporánea) se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. También se practicaron las medidas de precaución y seguridad adecuadas.

Los diferentes kits utilizados han sido suministrados por diferentes casas comerciales, según se detallará oportunamente y, salvo que se indique lo contrario, se siguieron los protocolos en ellos incluidos.

2.5. SOPORTE INFORMÁTICO: PROGRAMAS INFORMÁTICOS Y BASES DE DATOS

Durante el desarrollo de este trabajo se estaba llevando a cabo la secuenciación del genoma de *K. pneumoniae* MGH78578 en la Universidad de Washington. Hasta que no concluyó ese proyecto, el estudio del genoma de MGH78578 se realizaba desde la página web del Genome Sequencing Center de esa universidad (<http://genome.wustl.edu>). A partir de julio de 2007, toda la información sobre el genoma de MGH78578 se encuentra disponible en la web del National Center for Biotechnology Information, NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov>).

Las bases de datos más utilizadas fueron **EMBL/GenBank** para el análisis de secuencias de DNA y **Swiss-Prot** o **Pfam** (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) para el análisis de secuencias aminoacídicas. Además, se consultaron las bases de datos **BRENDA** (<http://www.brenda-enzymes.info/>) y **TransportDB** (<http://www.membranetransport.org/index.html>) para obtener información acerca de enzimas y proteínas transportadoras, respectivamente.

El estudio comparativo de las secuencias obtenidas con las ya descritas en las bases de datos se realizó gracias a las distintas modalidades del programa *Basic Local Alignment Search Tool*, **BLAST** (Altschul *et al.*, 1997): BLAST-n, BLAST-p, t-BLAST-n, BLAST-x (Gish y States, 1993), y BLAST-2seq (Tatiana *et al.*, 1999).

Los análisis de las secuencias de DNA y proteínas se realizaron con el programa informático **Omiga v2.0**, desarrollado por Oxford Molecular Ltd. (GCG, Madison, WI, USA). Este programa permite acceder a bases de datos para recuperar secuencias, conocer posibles marcos abiertos de lectura (ORFs), elaborar mapas de restricción, alinear secuencias, etc, pudiéndose trabajar tanto con secuencia de nucleótidos como de aminoácidos.

Para diseñar los cebadores se utilizó el programa informático **Primer Designer v2.2**, que ofrece una amplia información, tanto de las características de los cebadores (temperatura de hibridación, formación de estructuras secundarias) como del producto amplificado.

Para procesar los resultados de reacciones de secuenciación se empleó el programa **Chromas Lite v2.01**, disponible en la web http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html.

El análisis de promotores se llevó a cabo con el programa **Neural Network Promoter Prediction** (Reese, 2001), disponible en la página web http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html.

Para identificar posibles dianas de unión de reguladores de la transcripción se empleó **Virtual Footprint** (Munch *et al.*, 2005), al que se puede acceder en la página web <http://www.prodoric.de/vfp>. La detección de promotores dependientes de la subunidad σ^{54} de la RNA polimerasa se llevó a cabo mediante el programa **PromScan** (Studholme y Nixon, 2003), accesible desde la página web <http://www.promscan.uklinux.net/home.html>.

MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

3.1.1. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Los crecimientos bacterianos se realizaron utilizando diferentes medios de cultivo, completos o mínimos, y diferentes condiciones de temperatura, en función de la cepa utilizada y el tipo de experimento que se pretendía llevar a cabo. En función del experimento a realizar los medios se utilizaron en forma líquida o sólida. Los cultivos líquidos se hicieron crecer en tubos de ensayo o en matraces tipo Erlenmeyer, de tal forma que el volumen del cultivo supusiera entre un 10 y un 20% del volumen total del recipiente utilizado, a la temperatura deseada y en agitación constante a 250rpm en un agitador orbital. El crecimiento bacteriano de los cultivos líquidos se siguió mediante la lectura de la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 600nm, habitualmente. Para la lectura de las DO se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV240. Los medios sólidos se obtuvieron por adición de agar bacteriológico al 1,5% p/v a los medios líquidos. Estos medios se realizaron en placas de Petri que se hacían crecer en un incubador termostatzado a la temperatura deseada.

Los cultivos de *K. pneumoniae* y de las cepas de *E.coli* S17-1 λ *pir* y DH5 α transformada con pBR322 se hicieron crecer a una temperatura de 30°C, mientras que el resto de cepas de *E.coli* se hicieron crecer a 37°C.

COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Medio de cultivo completo o medio rico: Este tipo de medio contiene todo los nutrientes necesarios para el crecimiento de la mayoría de cepas, por lo que no requiere la adición de fuentes de carbono o nitrógeno exógenas. En este trabajo se ha utilizado LB (*Lysogeny Broth*. Bertani, 2004), compuesto por:

LB:	Triptona	1% p/v
	Extracto de levadura	0,5% p/v
	NaCl	0,5% p/v

En los medios de selección de los mutantes de *K. pneumoniae* obtenidos utilizando el vector pKAS32, no se añadió NaCl al medio de cultivo para facilitar los procesos de recombinación homóloga.

Medio mínimo: En este trabajo se ha utilizado el medio mínimo W4, que se compone de un medio mineral basal al que se adicionan fuentes de carbono y nitrógeno exógenas (Smith *et al.*, 1971).

W4:	K ₂ HPO ₄	10,5g/l
	KH ₂ PO ₄	4,5g/l
	MgSO ₄	0,1g/l
	Ajustar pH 7,4 con KOH	

Agar base McConkey: Este medio se utiliza para comprobar la capacidad de fermentar determinados azúcares. Consiste en un preparado al que se le añade el azúcar tras el proceso de esterilización. En este trabajo se empleó el azúcar ribosa a una concentración de 1% p/v. La fermentación del azúcar produce una disminución del pH que da lugar a que las colonias adquieran un color rojo.

Composición del agar base McConkey (Difco):

Peptona	17g	Rojo Neutro	0.03 g
Peptona proteosa	3g	Violeta cristal	1mg
Mezcla de sales biliares nº 3	1.5g	Agar	13.5g
NaCl	5g		

Fuentes de carbono:

- En el medio mínimo W4, la fuente de carbono se añade a una concentración de 0,4% p/v (Smith *et al.*, 1971). En general se utilizó glucosa. En la selección de transconjugantes durante la mutagénesis dirigida de genes de *K. pneumoniae* se utilizó citrato de sodio.

Fuentes de nitrógeno:

- Purinas
 - En el caso de experimentos en los que se pretendía comparar cuantitativamente el rendimiento de cultivos que disponían de adenina, hipoxantina, ácido úrico o alantoína como única fuente de nitrógeno, estos compuestos se utilizaron a una concentración de 0,6mM (Xi *et al.*, 2000). Esta concentración molar equivale a 0,008% p/v de adenina o hipoxantina y 0,01% p/v de ácido úrico o alantoína.
 - Habitualmente se utilizaron hipoxantina o ácido úrico a una concentración de 0,1% p/v (Garzón *et al.*, 1992).

Hipoxantina y ácido úrico son solubles en NaOH 0,1N. La solubilidad de la hipoxantina permite disolverla, como máximo, a una concentración de 1% p/v. El ácido úrico no puede disolverse a concentraciones superiores al 0,15% p/v, por lo que ha de prepararse directamente en el medio de cultivo, el cual se neutraliza con una solución de KH_2PO_4 al 10% p/v (Rouf, 1968).

- Condiciones limitantes de nitrógeno:

En este caso, la fuente de nitrógeno fue glutamina 0,04% p/v. El medio W4 suplementado con glucosa 0,4% p/v y glutamina 0,04% p/v se denomina GGln (Bender *et al.*, 1983).

- Condiciones no limitantes de nitrógeno o exceso de nitrógeno:

Las fuentes de nitrógeno utilizadas para determinar un exceso de nitrógeno fueron $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2% y glutamina 0,2%. El medio W4 suplementado con glucosa 0,4% p/v, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2% p/v y glutamina 0,2% p/v se denomina GNGln (Bender *et al.*, 1983). Ya que la glutamina puede degradarse fácilmente, liberando al medio moléculas de NH_4^+ , las soluciones de este aminoácido han de esterilizarse mediante filtración y los cultivos se han de realizar a 30°C (Bender *et al.*, 1977).

TABLA 3.1.: Medios de cultivo utilizados en los estudios de regulación de la expresión génica. En cada caso se especifica su denominación, la fuente de nitrógeno correspondiente y la condición de nitrógeno que determinan. La fuente de carbono utilizada fue glucosa (G) al 0,4% p/v.

NOMBRE	FUENTE DE NITRÓGENO	CONDICIÓN
GGln	Glutamina 0,04%	Limitación de nitrógeno
GNGln	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2% Glutamina 0,2%	Exceso de nitrógeno
GHx	Hipoxantina 0,1%	Hipoxantina como única fuente de nitrógeno
GGlnHx	Glutamina 0,04% Hipoxantina 0,1%	Hipoxantina en presencia de nitrógeno limitante
GNGlnHx	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2% Glutamina 0,2% Hipoxantina 0,1%	Hipoxantina en presencia de nitrógeno no limitante
GUr	Ácido úrico 0,1%	Ácido úrico como única fuente de nitrógeno
GGlnUr	Glutamina 0,04% Ácido úrico 0,1%	Ácido úrico en presencia de nitrógeno limitante
GNGlnUr	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2% Glutamina 0,2% Ácido úrico 0,1%	Ácido úrico en presencia de nitrógeno no limitante

En los estudios de regulación de la expresión génica llevados a cabo en este trabajo se utilizaron distintos medios de cultivo que suponían diferentes condiciones de nitrógeno. Además de los medios GIn (limitación de nitrógeno) o GNIn (exceso de nitrógeno), se utilizaron hipoxantina o ácido úrico como únicas fuentes de nitrógeno o añadidas a los anteriores medios. En la TABLA 3.1. se muestran todos los medios de cultivo utilizados en estos estudios.

Otros suplementos:

- En el caso de cepas bacterianas con auxotrofia para algún aminoácido, éstos se adicionaron al medio de cultivo a las concentraciones descritas por Davis *et al.*, 1980.
- Cuando fue necesaria la adición de X-Gal o IPTG, éstos se añadieron a una concentración final de 40µg/ml y 1mM respectivamente.
- Para el crecimiento de células que presentaban resistencia a antibióticos, éstos se adicionaron a las siguientes concentraciones:

Ampicilina	100µg/ml
Tetraciclina	12,5µg/ml (<i>E. coli</i>) ó 30µg/ml (<i>K. pneumoniae</i>)
Kanamicina	25µg/ml (<i>E. coli</i>) ó 50µg/ml (<i>K. pneumoniae</i>)
Estreptomicina	20µg/ml (<i>E. coli</i>) ó 50µg/ml (<i>K. pneumoniae</i>)

La concentración de estreptomina se aumentó a 1mg/ml en los medios de selección de los mutantes de *K. pneumoniae* obtenidos utilizando el vector pKAS32.

Los medios de cultivo se esterilizaron a 120°C y 1,2 atmósferas de presión durante 30min. Los componentes termosensibles, como adenina, hipoxantina, ácido úrico, alantoína, ribosa o glutamina, fueron esterilizados mediante filtración (tamaño de poro: 0,22µm) y adicionados al medio en condiciones estériles.

3.1.2. TRANSDUCCIÓN GENERALIZADA CON EL BACTERIÓFAGO P1

Este proceso permite la transferencia de material genético de una cepa de *K. pneumoniae* donadora a otra receptora a través de la acción de un bacteriófago o fago. El método utilizado para la transducción generalizada con el bacteriófago P1 está basado en el descrito por Goldberg, 1974.

3.1.2.1. Preparación de un lisado P1

Los lisados se obtuvieron por crecimiento de la cepa donadora junto al fago P1 salvaje en presencia de Ca²⁺. Este catión permite la adsorción del fago a la pared bacteriana y la posterior penetración del mismo en la célula huésped. El fago se replica en el interior de la cepa donadora incorporando en su genoma fragmentos de DNA de ésta y produciendo la lisis bacteriana.

PROCEDIMIENTO

1. Inocular la cepa donadora en un tubo con 2ml de LB suplementado con el antibiótico apropiado e incubar a 30°C durante 12-16h en agitación.
2. Reinocular la cepa por dilución 1:50 en 10ml del mismo medio de cultivo en presencia de CaCl₂ 5mM e incubar en agitación a 30°C hasta alcanzar una DO a 540nm de 0,5.
3. Mezclar en tubos de ensayo 100µl de distintas diluciones del preparado de fago (Ej. 10⁻¹ a 10⁻⁷) con 200µl del cultivo de la cepa donadora e incubar a 30°C durante 30min sin agitación.
4. Añadir a los tubos 2ml de Top-agar precalentado y extender sobre placas de LB suplementado con CaCl₂ 5mM (LB-Ca²⁺). Incubar durante 12-16h a 30°C.
5. Contar el número de calvas de lisis aparecidas en las placas y proceder a la obtención del lisado a partir de la placa cuyo título sea de 10⁹ a 10¹⁰pfu/ml.

6. Añadir 3ml de LB-Ca²⁺ e incubar a temperatura ambiente durante 5min.
7. Extraer la capa de Top-agar con ayuda de un asa y depositarla en un tubo de centrifuga. Añadir unas gotas de cloroformo, agitar vigorosamente e incubar a temperatura ambiente durante 20min.
8. Centrifugar a 15.000rpm durante 10min a 4°C.
9. Transferir el sobrenadante, que constituye el lisado P1, a un tubo estéril, adicionar unas gotas de cloroformo y guardar a 4°C.

<u>Top-agar:</u>	Triptona	15,5g/l
	Extracto de levadura	8,75g/l
	NaCl	0,5g/l
	Agar	5g/l

3.1.2.2. Transducción a genoma

Para llevar a cabo el proceso de transducción se sigue un proceso análogo al desarrollado para la obtención del lisado pero impidiendo, en este caso, que se produzca la lisis bacteriana. La infección se detiene mediante la adición de un agente quelante, citrato sódico, que secuestra el catión Ca²⁺. De esta forma se favorece la lisogenia (incorporación del material fágico al cromosoma bacteriano mediante recombinación homóloga) pero se impide la lisis celular.

PROCEDIMIENTO

1. Inocular la cepa receptora en 5ml de LB suplementado con el antibiótico adecuado. Incubar a 30°C durante 12-16h en agitación constante.
2. Añadir al cultivo 5ml de LB suplementado con el mismo antibiotico e incubar durante 4h, a 30°C en agitación .
3. Centrifugar el cultivo a 4.000rpm durante 10min a 4°C.
4. Resuspender el sedimento celular en 10ml de MgSO₄ 0,1M y CaCl₂ 5mM.
5. Mezclar en tubos estériles, 200µl de la suspensión de células receptoras y 200µl de varias diluciones de la solución de fago P1 (Ej. 10⁻¹ a 10⁻³).
6. Incubar a 30°C sin agitación durante 20min.
7. Añadir 200µl de citrato sódico 1M y agitar vigorosamente.
8. Añadir 1ml de LB e incubar a 30°C durante 1h en constante agitación.
9. Centrifugar a 5.000rpm durante 10min a temperatura ambiente.
10. Resuspender el sedimento celular en 100µl de citrato sódico 0,5M y extender sobre placas de selección.
11. Incubar a 30°C durante 12h.
12. Purificar los lisógenos obtenidos mediante crecimiento de colonias aisladas en el mismo tipo de placas.

3.1.3. OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

A diferencia de algunos géneros bacterianos como *Neisseria*, *Bacillus* u otros, *K. pneumoniae* y *E. coli* no presentan un estado de competencia natural que les permita incorporar al interior celular DNA libre presente en el medio. Necesitan un tratamiento para adquirir este estado de competencia. Existen dos tipos de métodos para obtener células competentes: métodos físicos y métodos químicos. La elección del método para la obtención de células competentes dependió de la estabilidad de las mismas y del método de transformación posterior.

3.1.3.1. Métodos químicos

3.1.3.1.1. Mediante TFB

Este método fue descrito por Hanahan, 1995 y se basa en la permeabilización de la membrana celular mediante diferentes cationes divalentes presentes en el tampón de transformación (TFB), así como por la presencia de DMSO y DTT.

Las células obtenidas por este método tienen una eficiencia de transformación media dentro de los métodos de obtención de células competentes y deben ser utilizadas en las inmediatas horas a su obtención, no siendo posible su almacenamiento.

PROCEDIMIENTO

1. Inocular la cepa que se quiere hacer competente en 2ml de LB e incubar durante 16h a 37°C en agitación.
2. Reinocular la cepa por dilución 1:50 en el mismo medio de cultivo. Incubar a 37°C en agitación hasta una DO a 600nm igual a 0,5.
3. Parar el crecimiento enfriando las células a 4°C durante 10min. (A partir de este punto las células han de mantenerse siempre a esta temperatura).
4. Recoger las células mediante centrifugación a 3.600xg durante 10min.
5. Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 3ml de TFB.
6. Dejar 10min en hielo.
7. Centrifugar 10min a 3.600xg.
8. Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 0,8ml de TFB.
9. Añadir 28µl de DMSO/DTT. Dejar 10min en hielo.
10. Adicionar otros 28µl de DMSO/DTT y dejar en hielo un mínimo de 10min. A partir de este momento las células ya son competentes.

TFB (Transformation buffer)

MES-K pH 6,2	10mM
KCl	100mM
MnCl ₂	45mM
CaCl ₂	10mM

Solución de DMSO/DTT

Acetato potásico pH 7,5	10mM
DTT	1M
DMSO	90% v/v
Guardar alicuotado a -20°C	

Esterilizar el TFB por filtración y guardar a 4°C

3.1.3.1.2. Mediante CaCl₂

Este procedimiento se basa en el método descrito por Ausubel *et al.*, 1991 en el que la membrana celular se permeabiliza mediante iones Ca²⁺. Tiene una elevada eficiencia de transformación y a diferencia del método anterior presenta la ventaja adicional de poder conservar las células competentes a -80°C hasta su utilización.

PROCEDIMIENTO

1. Inocular la cepa a tratar en LB suplementado con el antibiótico adecuado. Incubar durante 12-16h a 37°C en constante agitación
2. Reinocular la cepa en 100ml del mismo medio de cultivo por dilución 1:100. Incubar a 37°C en constante agitación hasta que el cultivo alcance una DO a 600nm igual a 0,4 (por encima de este valor disminuye la eficacia de transformación).
3. Mantener el cultivo durante 10min en hielo para detener el crecimiento bacteriano.

4. Recoger las células por centrifugación a 3.000xg durante 7min a 4°C. A partir de este momento las células han de permanecer a esta temperatura.
5. Resuspender cuidadosamente el sedimento celular en 20ml de solución de CaCl₂ atemperada a 4°C.
6. Centrifugar a 2.500xg durante 5min a 4°C.
7. Resuspender de nuevo el sedimento celular en 20ml de solución de CaCl₂. Incubar las células resuspendidas durante 30min y en hielo.
8. Centrifugar a 2.500xg durante 5min a 4°C.
9. Resuspender finalmente el sedimento celular en 4ml de solución de CaCl₂. Incubar durante un mínimo de 1h en hielo.
10. Alicuotar en fracciones de 200µl. Guardar a -80°C hasta el momento de su utilización.

SOLUCIÓN DE CaCl₂

Tris- HCl pH 7,0	10mM
CaCl ₂	60mM
Glicerol	15% v/v

3.1.3.2. Métodos físicos: electroporación

Este procedimiento se basa en el método descrito por Dower *et al.*, 1988. El método utiliza una solución de glicerol al 10% v/v para evitar el uso de soluciones salinas que incrementen la conductividad, lo que provocaría la muerte celular por sobrecarga durante la electroporación. Las células la solución de glicerol se pueden conservar a -80°C.

PROCEDIMIENTO

1. Inocular la cepa a tratar en LB suplementado con el antibiótico adecuado. Incubar durante 12-16h a la temperatura adecuada en constante agitación.
2. Reinocular la cepa en 10ml del mismo medio de cultivo por dilución 1:50. Incubar a la temperatura adecuada y en constante agitación hasta que el cultivo alcance una DO a 540nm de 0,75 (por encima de este valor disminuye la eficacia de transformación).
3. Mantener el cultivo 10min en hielo para parar el crecimiento.
4. Recoger las células por centrifugación a 4.500rpm durante 10min a 4°C. A partir de este momento las células han de permanecer a esta temperatura.
5. Resuspender cuidadosamente el sedimento celular en 10ml de glicerol 10% v/v atemperado a 4°C.
6. Volver a recoger las células por centrifugación a 4.500rpm durante 10min a 4°C.
7. De nuevo, resuspender cuidadosamente el sedimento celular en 10ml de glicerol 10% v/v atemperado a 4°C.
8. Volver a recoger las células por centrifugación a 4.500rpm durante 10min a 4°C.
9. Resuspender cuidadosamente el sedimento celular en 1ml de glicerol al 10% v/v atemperado a 4°C.
10. Alicuotar en fracciones de 100µl que se guardarán a -80°C hasta el momento de su utilización.
11. Poner en contacto 100µl de células con el DNA a transformar en una cubeta de electroporación atemperada a 4°C y proceder tal y como se indica en MÉTODOS 3.1.4.2.

3.1.4. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Las células se transformaron por choque térmico o por electroporación, durante el proceso de elaboración de células competentes.

3.1.4.1. Choque térmico

Se aplica a células competentes obtenidas mediante métodos químicos

PROCEDIMIENTO

1. Poner en contacto 200µl de células competentes con 1-500ng del DNA a transformar contenidos en un volumen máximo de 20µl . Mantener la mezcla en hielo durante 30min.
2. Someter la mezcla a un choque térmico por incubación a 37°C durante 5min seguido de una nueva incubación de 2min en hielo.
3. Añadir medio de cultivo LB (800µl LB/200µl células). Mezclar suavemente por inversión e incubar durante 1h a 37°C sin agitación.
4. Sembrar en placas de LB a las que se les ha añadido el antibiótico adecuado para seleccionar las células transformantes. Incubar 12-16h a 37°C.

3.1.4.2. Electroporación

Las células competentes se ponen en contacto con DNA exógeno y se someten a un campo eléctrico para formar poros en la membrana celular, a través de los cuales el DNA penetra en el interior celular.

PROCEDIMIENTO

1. Poner en contacto 100µl de células (MÉTODOS 3.1.3.2.) con el DNA a transformar en una cubeta de electroporación atemperada a 4°C.
2. Someter la mezcla a una descarga eléctrica de 1,8KV durante 3,4s. En este trabajo se ha utilizado el electroporador E. coli Pulser (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA).
3. Añadir 900µl de SOC, transferir a un tubo de ensayo e incubar a la temperatura adecuada durante 1h en constante agitación.
4. Centrifugar a 5000rpm durante 10min a temperatura ambiente.
5. Resuspender el sedimento celular en 200µl de LB y extender 100µl en placas de selección.
6. Incubar a la temperatura adecuada durante 12-16h.

<u>SOC:</u>	SOB	
	Glucosa	0,4% p/v
	MgSO ₄	5mM
	MgCl ₂	5mM
<u>SOB</u>	Triptona	20g/l
	Extracto de levadura	5g/l
	NaCl	0,584g/l
	KCl	0,186g/l
	Ajustar a pH 7 con NaOH	

3.1.5. CONJUGACIÓN

La conjugación bacteriana es el proceso mediante el cual se transfiere material genético desde una bacteria donadora a otra bacteria receptora, promovido por determinados tipos de plásmidos y que requiere contacto directo entre ambas, con intervención de estructuras superficiales especializadas. Para que este proceso tenga lugar, las células donadoras han de contener las funciones implicadas en esta transferencia. En este trabajo se ha utilizado la cepa donadora *E. coli* S17-1 λ *pir* en los procesos de conjugación que se llevaron a cabo durante la mutagénesis al azar y dirigida de *K. pneumoniae*. En estos casos se transfirieron los plásmidos pUTmini-Tn5 Km y pKAS32, respectivamente, que contienen el origen de transferencia *oriT* del vector RP4.

Para seleccionar los transconjugantes se han de tener en cuenta dos factores. En primer lugar, disponer de un marcador contenido en el material que se transfiera (Ej. resistencia a antibióticos). En segundo lugar, un marcador de la cepa receptora que no se encuentre en la donadora (Ej. resistencia a antibióticos o capacidad de metabolizar determinados compuestos).

El protocolo de conjugación aplicado en este trabajo está basado en el propuesto por Biomedal.

PROCEDIMIENTO:

1. Inocular una colonia de *E. coli* S17-1 λ *pir*, transformada con el plásmido que será transferido, y una colonia de la cepa receptora en 2 ml de LB suplementados con el antibiótico adecuado. Incubar los dos cultivos durante 12-16h, en constante agitación a temperatura adecuada.

E. coli S17-1 λ *pir* es termosensible, por lo que ha de ser incubada a 30°C. Se recomienda emplear esta cepa solamente para la conjugación, por lo que los plásmidos a transferir se han de mantener en otra cepa, como EB6193, si son π dependientes.

2. Mezclar en 1 ml de MgSO₄ 10mM los siguientes volúmenes de ambas cepas:
 - 25 μ l Donadora y 25 μ l Receptora (Proporción 1 Donadora: 1 Receptora)
 - 50 μ l Donadora y 25 μ l Receptora (Proporción 2 Donadora: 1 Receptora)
 - 25 μ l Donadora y 50 μ l Receptora (Proporción 1 Donadora: 2 Receptora)

En este trabajo el mayor número de transconjugantes se obtuvo siguiendo la proporción 2 Donadora: 1 Receptora, pero esto también puede depender tanto de la calidad de las cepas como del tiempo durante el que se incuba la conjugación.

3. Centrifugar a 5.000rpm durante 10min a temperatura ambiente.
4. Resuspender el sedimento celular en 20 μ l de MgSO₄ 10mM y depositarlo, sin extenderlo, sobre una placa de LB. Incubar durante 12-16h a 30°C.
5. Recoger la mezcla de conjugación y resuspenderla en 1ml de MgSO₄ 10mM.
6. Centrifugar a 5.000rpm durante 10min a temperatura ambiente.
7. Resuspender el sedimento celular en 1ml de MgSO₄ 10mM y extender 100 μ l de diferentes diluciones (Ej. 10⁹ a 10⁻⁴) en placas de selección.

La mezcla de conjugación puede conservarse durante varias semanas a 4°C y durante varios meses a -80°C en glicerol 15% v/v.

8. Incubar las placas durante 12-16h a la temperatura adecuada.
9. Purificar las colonias de los transconjugantes en el mismo medio de selección.

3.1.6. OBTENCIÓN DE MUTANTES

3.1.6.1. Mutagénesis al azar por inserción del transposón mini-Tn5 Km

Esta técnica da lugar a células con mutaciones localizadas de forma aleatoria en su genoma y conlleva un cambio de fenotipo que permite su selección. Se basa en los elementos de Tn5 que permiten la transposición y en las características del vector suicida pGP704 (Herrero *et al.*, 1990; de Lorenzo *et al.*, 1990).

El método utiliza el vector pUTmini-Tn5 Km, que se compone del esqueleto pUT y el elemento transponible mini-Tn5 Km (FIGURA 3.1.). La familia de mini-Tn5 es un conjunto de elementos transponibles derivados de Tn5 que se componen de un casete de resistencia a un antibiótico, Km en este caso, flanqueado por secuencias de 19pb consistentes en los extremos I y O del Tn5 (de Lorenzo *et al.*, 1990). En el esqueleto pUT se localizan el gen de resistencia a ampicilina (*bla*), el gen de la transposasa (*tnp**), un origen de replicación obtenido a partir del vector R6K (*oriR6K*) y un origen de transferencia derivado de RP4 (*mobRP4*; ver MÉTODOS 3.1.5.). La localización de *tnp** en el esqueleto pUT tiene la ventaja de que el miniTn5 se mantiene insertado de manera estable en el genoma de la cepa mutagenizada y su genoma puede someterse a nuevas inserciones.

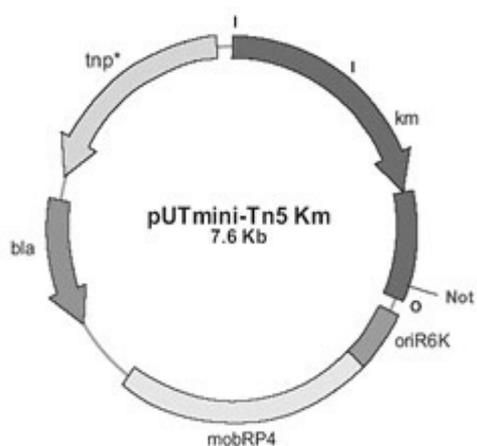


FIGURA 3.1.: Vector pUTmini-Tn5 Km.

El origen de replicación de los plásmidos pUTmini-Tn5 deriva del vector suicida R6K, cuya replicación depende de la presencia del factor π codificado por el gen *pir*. Para mantener estos vectores se ha de utilizar una cepa que contenga el gen *pir*, como EB6193. Se recomienda mantener estos plásmidos en la cepa EB6193 y hacer uso de *E. coli* S17-1 λ *pir* en el momento de la conjugación. La inserción del mini-Tn5 se produce tras la conjugación entre una cepa donadora del pUTmini-Tn5 y una cepa receptora. Ya que la cepa receptora no produce el factor π y por tanto no puede mantener el pUTmini-Tn5 de manera estable, los transconjugantes seleccionados por resistencia al antibiótico, codificada por el minitransposón, son mutantes por inserción del mini-Tn5.

PROCEDIMIENTO

1. Llevar a cabo una conjugación entre *E. coli* S17-1 λ *pir* pUTmini-Tn5 y la cepa receptora tal y como se describe en MÉTODOS 3.1.5.

La selección de las células que contienen el transposón mini-Tn5 se lleva a cabo en presencia del antibiótico del cual el mini-Tn5 codifica la resistencia. La selección de la cepa receptora se llevará a cabo mediante un marcador que le distinga de la cepa donadora. En este trabajo se utilizó el vector pUT mini-Tn5 Km. La selección de los transconjugantes de *K. pneumoniae* Km^r se realizó en un medio que contenía Km y citrato de sodio como única

fuentes de carbono, ya que *K. pneumoniae*, a diferencia de *E. coli*, puede utilizar este compuesto como fuente de carbono.

2. Analizar el fenotipo de los transconjugantes y localizar el punto de inserción del mini-Tn5. En este trabajo las inserciones se localizaron mediante PCR inversa (MÉTODOS 3.3.4.4.).

3.1.6.2. Mutagénesis dirigida en *K. pneumoniae* por inserción de un casete KAN

Durante el desarrollo de este trabajo se puso a punto la metodología aplicada para obtener mutantes dirigidos en *K. pneumoniae*. Esta metodología se basa en las propiedades del vector pKAS32 (Skorupski y Taylor, 1996) y en la recombinación homóloga entre un gen salvaje y un casete (casete KAN) consistente en ese gen interrumpido por el gen de resistencia a Km, *kan*.

El vector pKAS32 se compone de un gen de resistencia a ampicilina (*bla*), de una región de clonación formada por 8 dianas de restricción, de un origen de replicación derivado del vector R6K (*oriR6K*; ver MÉTODOS 3.1.6.1.), de un origen de transferencia derivado del vector RP4 (*oriT*; ver MÉTODOS 3.1.5. y 3.1.6.1.) y del gen *rpsL* que permite la selección de los mutantes (FIGURA 3.2). *rpsL* codifica la proteína ribosomal S12. Mutaciones en este gen confieren resistencia a estreptomicina, pero estas mutaciones se manifiestan recesivas en presencia de una copia salvaje de *rpsL* (Lederberg, 1951). Por esta razón, cepas resistentes a Sm se vuelven Sm^s cuando contienen pKAS32. Este fenómeno permite seleccionar los transconjugantes que han incorporado el casete pero han eliminado pKAS32.

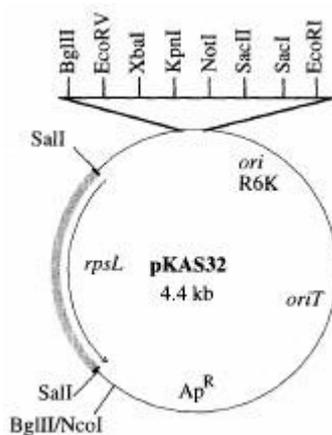


FIGURA 3.2.: Vector pKAS32.

El gen *kan* de resistencia a Km se obtuvo mediante amplificación del mismo por PCR (MÉTODOS 3.3.4.) a partir del vector pKD4 (Datsenko y Wanner, 2000). El casete KAN se construye clonando el gen que se desea mutar en pKAS32 e interrumpiéndolo con el gen *kan*, de manera que el tamaño de los fragmentos específicos de *K. pneumoniae* que flanquean el gen *kan* tengan un tamaño mínimo de 500pb para que la recombinación homóloga pueda tener lugar. En el caso de que las secuencias del gen de *K. pneumoniae* y/o *kan* contengan dianas incompatibles con este proceso, se puede emplear el plásmido auxiliar pUC18*NotI*. Este vector contiene la región de clonación flanqueada por dianas *NotI*. Ya que es bastante infrecuente encontrar dianas *NotI*, casi cualquier inserto clonado en pUC18*NotI* puede ser digerido del mismo y clonado en otro vector como fragmento *NotI*.

Una vez construido el vector recombinante con el casete KAN, se transfiere a una cepa Sm^r, como KC2653, mediante conjugación. Tras la conjugación, los transconjugantes se someten a siembras sucesivas en diferentes medios de selección que ejercen la presión selectiva necesaria para que la recombinación homóloga entre el gen salvaje y el casete KAN tenga lugar y se elimine el resto de pKAS32. El medio idóneo para que la recombinación homóloga se complete consiste en LB sin NaCl y suplementado con Sm 1mg/ml.

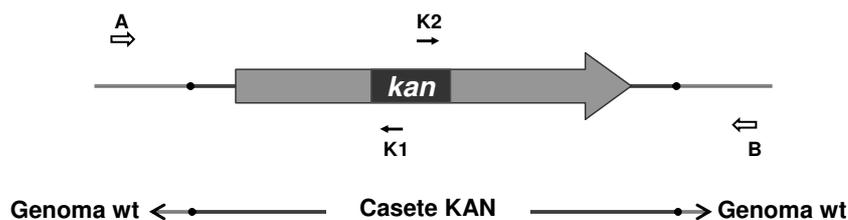


FIGURA 3.3.: Esquema que representa la comprobación por PCR de la inserción del gen *kan*. K1 y K2, oligonucleótidos internos al casete KAN (Datsenko y Wanner, 2000); A y B, oligonucleótidos correspondientes al genoma de la cepa tipo salvaje cuyo gen se desea mutar.

En el momento en el que se identifican colonias $Sm^r Ap^s Km^r$ con el fenotipo deseado, la localización del casete en el genoma se puede realizar mediante PCR (MÉTODOS 3.3.4.) usando los oligonucleótidos K1 o K2 internos al casete KAN (Datsenko y Wanner, 2000) y un oligonucleótido (A o B en FIGURA 3.3.) correspondiente a la región del genoma adyacente a los fragmentos utilizados para construir el casete KAN (FIGURA 3.3.).

PROCEDIMIENTO

1. Clonar el gen que se desea mutar en pKAS32.
2. Amplificar por PCR el gen *kan* a partir del vector pKD4, utilizando oligonucleótidos con diana/s de restricción compatible/s con el vector recombinante construido anteriormente. Esta/s diana/s ha/n de localizarse únicamente dentro del gen clonado, de manera que al interrumpir dicho gen queden, al menos, 500pb a ambos lados de *kan*.
3. Purificar el producto de PCR tal y como se describe en MÉTODOS 3.3.5.5.
4. Clonar el gen *kan* en el plásmido recombinante que contiene el gen a mutar utilizando la/s enzima/s de restricción específicas de las dianas que se especifican en el punto 2.
5. Transformar la cepa EB6193 con el producto de la ligación y sembrar la transformación en placas de LB suplementadas con Km 25µg/ml.
6. Identificar mediante PCR un clon que haya insertado el casete KAN y obtener su DNA plasmídico. Comprobar por digestiones enzimáticas y secuenciación la correcta inserción y orientación del casete KAN.
7. Transformar la cepa *E. coli* S17-1 λ *pir* con el plásmido circular pKAS32 KAN. Sembrar en placas de LB suplementadas con Km 25µg/ml.
8. Purificar una colonia de *E. coli* S17-1 λ *pir* pKAS32 KAN en placas de LB suplementadas con Km 25µg/ml.
9. Realizar un proceso de conjugación entre *E. coli* S17-1 λ *pir* pKAS32 KAN y KC2653. La mezcla de conjugación se siembra en placas de medio mínimo W4 con $(NH_4)_2SO_4$ 0,2% p/v como fuente de nitrógeno, citrato de sodio 0,4% p/v como fuente de carbono y suplementadas con Km 50µg/ml. Incubar durante 48h a 30°C.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se recomienda sembrar en, al menos 5 placas de selección, 100 µl de una dilución 10^{-3} de la mezcla de conjugación que contiene la proporción 2 Donadora: 1 Receptora.

10. Purificar las colonias transconjugantes en las mismas placas de selección. Incubar durante 48h a 30°C.
11. Sembrar colonias aisladas en LB suplementado con Km 50µg/ml. Incubar durante 12-16h y a 30°C.
12. Sembrar colonias aisladas en LB carente de NaCl y suplementado con Sm 1mg/ml. Incubar durante 12-16h a 30°C.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se recomienda sembrar tantas colonias aisladas de cada transconjugante sean necesarias como para tener un total de 15-20 colonias.

13. De nuevo, sembrar colonias aisladas en LB carente de NaCl y suplementado con Sm 1mg/ml. Incubar durante 12-16h a 30°C.
14. Sembrar colonias aisladas en LB suplementado con Km 50µg/ml. Incubar durante 12-16h a 30°C.
15. Purificar las colonias Km^r en LB suplementado con Km 50µg/ml
16. En este trabajo, la inserción se comprobó mediante PCR (ver FIGURA 3.3.), Southern Blot (MÉTODOS 3.3.8.) y por análisis del fenotipo.

3.2. ANÁLISIS Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

3.2.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES

El medio intracelular de los cultivos bacterianos se obtuvo según el procedimiento descrito por Boronat y Aguilar (1979).

PROCEDIMIENTO

1. Realizar un cultivo de la cepa de la que se quiere obtener el extracto celular. Dejar crecer hasta el final de la fase exponencial.
2. Recoger las células por centrifugación a 12.000xg 4°C durante 15 min.
3. Resuspender el sedimento celular en un volumen de solución tampón equivalente a 4 veces su peso húmedo (el tampón utilizado dependerá del posterior uso a que se destine el extracto).
4. Someter la suspensión celular a una descarga ultrasónica, a una amplitud de onda de 12-14 micrones, durante 30s por cada mililitro de suspensión. Durante este proceso la muestra se mantiene sumergida en una mezcla refrigerante realizada con agua, hielo y NaCl. Para este proceso se utilizó un sonicador MSE de 150W.
5. Centrifugar la mezcla obtenida en el paso anterior. Recoger la fracción sobrenadante, que constituye el extracto celular o extracto crudo, y que se corresponde con los espacios periplasmático y citosólico. Las condiciones de centrifugación y de conservación del extracto dependen de las características y del uso a que se destine.

3.2.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE LOWRY

La cuantificación de proteínas en los extractos celulares y en las diferentes fracciones de purificación se determinó siguiendo una modificación del método descrito por Lowry *et al.*, 1951 que permite determinar la concentración de proteínas en el rango de 20-200µg/ml. Las determinaciones se hicieron por duplicado y a partir de diferentes diluciones de la muestra problema. El valor de concentración era la media de los valores obtenidos, siempre que éstos no se diferenciases de la media en más de un 10%.

PROCEDIMIENTO

1. Añadir 100µl de H₂O desionizada a los tubos de ensayo de la recta patrón y de las muestras cuya concentración proteica se desea cuantificar.
2. Añadir a los tubos correspondientes a la recta patrón un rango de µg de BSA.
3. Añadir a los tubos correspondientes a las muestras 25µl de varias diluciones de las mismas.
4. Añadir 1ml del reactivo alcalino. Agitar vigorosamente y dejar en reposo durante 10min a temperatura ambiente.
5. Añadir 100µl del reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu 1N y agitar vigorosamente.
6. Incubar durante 30min a temperatura ambiente.

7. Determinar la absorbancia a una longitud de onda de 680nm.
8. La concentración proteica en este trabajo se expresa en μg proteína/ μl .

<u>Reactivo alcalino:</u>	CuSO ₄	0,02% p/v
	NaKC ₄ O ₆	0,04% p/v
	En NaOH 0,1N / Na ₂ CO ₃ 3% p/v	

Preparar añadiendo los reactivos en el orden establecido en su composición para evitar la formación de un precipitado.

<u>Folin-Ciocalteu:</u>	$\frac{1}{2}$ del volumen final de Folin-Ciocalteu 2 N	
	$\frac{1}{2}$ del volumen final de H ₂ O destilada y desionizada	

3.2.3. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A MBP

En este trabajo el regulador HpxR se purificó mediante su fusión a la proteína de unión a maltosa (*Maltose Binding Protein*, MBP) ya que es un sistema que presenta varias ventajas: La expresión de la proteína de fusión depende del promotor P_{tac}, gracias al cual se puede conseguir un rendimiento de hasta 100mg de proteína de fusión por cada litro de cultivo; La fusión a MBP incrementa la solubilidad, con lo que se minimiza el riesgo de precipitación de la proteína sobreexpresada y, por último, la proteína de fusión se puede purificar mediante cromatografía de afinidad (Guan *et al.*, 1987).

Para llevar a cabo la purificación se utilizó el kit “pMALTM Protein and Purification System” (New England Biolabs), un kit multifuncional que se suministra con la serie de vectores de expresión de la familia pMAL adecuada al tipo de purificación que se pretende desarrollar. En este caso se utilizó la serie de vectores pMAL-c2, que contienen una mutación en el gen *malE*, que codifica MBP, de manera que la proteína de fusión se sobreexpresa y localiza en el citoplasma. En concreto se empleó el vector pMAL-c2x (MATERIALES 2.2.1.4.), que contiene a 3' de *malE* y a 5' de la región de clonación una secuencia que codifica la diana de la proteasa Factor Xa, que servirá para digerir la proteína de fusión generando MBP (42,5KDa) y la proteína de interés.

La región de clonación de estos plásmidos está situada a 3' de *malE*, de tal forma que MBP queda fusionada por su extremo carboxi terminal al extremo amino terminal de la proteína que se pretende purificar. La expresión de la proteína de fusión está bajo el control del promotor P_{tac} y el operador *lac*. En ausencia de inducción, el operador *lac* se encuentra ocupado por el represor LacI, codificado por el propio vector, impidiéndose la expresión de la proteína de fusión, que sólo tiene lugar cuando se adiciona IPTG al medio de cultivo. En ausencia de inserto, la región de clonación se localiza a 5' del gen α -*lacZ*, lo que permite discriminar entre colonias blancas y azules de una cepa capaz de llevar a cabo la α -complementación (MATERIALES 2.2.1.) en un medio suplementado con X-Gal.

Para la purificación de la proteína de fusión se utilizó una columna con resina de amilosa. La MBP presenta afinidad por esta resina. Tras una serie de lavados, durante los que la proteína de fusión permanece unida a la resina, la proteína de fusión se eluye gracias a un tampón que contiene maltosa, el ligando de la MBP. Posteriormente, la proteína de fusión puede ser digerida por Factor Xa. Aunque no se haya llevado a cabo en este trabajo, la proteína problema puede ser separada de MBP y FactorXa (42,4KDa) según las pautas de purificación indicadas por la casa comercial.

PROCEDIMIENTO

1. Clonar el gen que codifica la proteína que se pretende purificar en el vector de la familia pMal adecuado. Para HpxR se utilizó el plásmido pMAL-c2x.
2. Transformar la cepa XL1-Blue con el DNA plasmídico obtenido en el paso anterior, siguiendo el procedimiento descrito en MÉTODOS 3.1.4.

3. Inocular 1 colonia en 2ml de LB suplementado con Ap y dejar crecer a 37°C en constante agitación durante 12-16h.
4. Reinocular en 100ml de LB (dilución 1:100) suplementado con glucosa y Ap y crecer en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO a 600nm de 0,5.
5. Añadir IPTG a una concentración final de 0,3mM. Incubar a 37°C y mantener en constante agitación durante 2-4h.
6. Recoger las células por centrifugación a 4.500rpm, a 4°C durante 10min. Descartar el sobrenadante. El sedimento celular puede conservarse a -80°C para su uso posterior.
7. Resuspender el sedimento celular en el tampón de lisis apropiado y obtener el extracto celular (MÉTODOS 3.2.1). Comprobar el nivel de expresión mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS (MÉTODOS 3.2.4).
8. Diluir el extracto celular 5 veces con el Tampón de columna, aunque el factor de dilución puede variar en función de lo concentrado que esté el extracto celular.

En general 1g de peso húmedo de células puede dar lugar a 50-120mg de proteína de fusión.

9. Preparar la columna con el volumen apropiado de la resina de amilosa. La cantidad de resina dependerá de la cantidad de proteína de fusión producida.

La resina puede unir 3mg de proteína de fusión por ml. De esta manera, con 15ml de resina se podrían conseguir 45mg de proteína de fusión por cada litro de cultivo.

10. Lavar la resina con 8 volúmenes de Tampón de Columna.
11. Añadir el extracto crudo diluido y mantener su contacto con la resina durante 15min a temperatura ambiente.
12. Lavar con 12 volúmenes de Tampón de columna.
13. Eluir con Tampón de columna suplementado con maltosa 10mM. Recoger 8-10 fracciones de 1ml, que se irán conservando en hielo, para ser analizadas. Se recomienda tratar un pequeño volumen de estas fracciones con el reactivo de Bradford para comprobar cualitativamente la presencia de la proteína de fusión.
14. Analizar las fracciones en un gel de poliacrilamida-SDS (MÉTODOS 3.2.4.).
15. Digerir la proteína de fusión con la proteasa adecuada, que dependá del vector de expresión utilizado. Como en este trabajo se utilizó pMAL-c2x, la proteína de fusión MBP-HpxR se digirió con Factor Xa.
Digerir 100µg de la proteína de fusión con 1U de Factor Xa durante 12-16h a temperatura ambiente.
16. Analizar la digestión de la proteína de fusión en un gel de poliacrilamida-SDS (MÉTODOS 3.2.4.).

<u>Tampón de columna:</u>	Tris HCl pH 7,4	20mM
	NaCl	200mM
	EDTA	1mM

3.2.4. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE-SDS)

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (Laemli, 1970) es una técnica básica utilizada para separar proteínas en función de su peso molecular. Las proteínas, cargadas negativamente por la presencia en el medio del detergente aniónico SDS, migran hacia el ánodo en un campo eléctrico. Para eliminar las interacciones no covalentes y los puentes disulfuro que puedan formar las proteínas que se someten a la electroforesis, las muestras proteicas son tratadas también con agentes reductores como el DTT o el β -mercaptoetanol (β -ME).

La masa molecular de las proteínas separadas se determinó utilizando el marcador "BENCHMARK™ Prestained Protein Ladder" (Gibco BRL) formado por 10 proteínas de masa molecular comprendida entre 9,3KDa y 172,6KDa.

En este trabajo se utilizaron geles con un porcentaje de acrilamida del 10%. La polimerización de los geles se consigue mediante la adición de persulfato amónico y TEMED.

La parte superior del gel (una tercera parte) constituye el gel apilador, que agrupa las proteínas antes de la separación. El resto del gel constituye el separador, donde las proteínas se separan en función de su peso molecular. Para la realización de los geles se utilizó el equipo "Mighty Small™ SE245 Dual Gel Caster" (Hoefer Scientific Instruments), mientras que para la electroforesis se utilizó una cubeta "Mighty Small II SE250/260" de la misma casa comercial.

La composición de las soluciones utilizadas se muestra a continuación:

Gel apilador

Tris-HCl pH 6,8	0,13M
SDS	0,1%
Acrilamida: Bisacrilamida (37,5:1)	4%
Persulfato amónico	0,16%
TEMED	0,075% v/v

Gel separador

Tris-HCl pH 8,9	0,38M
SDS	0,1%
Acrilamida: Bisacrilamida (37,5:1)	10%
Persulfato amónico	0,08%
TEMED	0,075 % v/v
β -ME	20%

Tampón de muestra (4x)

Tris-HCl pH 6,8	0,25M
SDS	8%
Glicerol	40%
Azul de bromofenol	0,08%

Tampón de electroforesis:

Tris-HCl pH 8,3	25mM
Glicina	192mM
SDS	0,1%p/v

La electroforesis tiene lugar a una intensidad de corriente de 15mA.

Una vez finalizada la electroforesis, y para poder visualizar las bandas proteicas separadas, se procedía a una tinción con azul brillante de Coomassie, colorante que permite detectar específicamente bandas proteicas correspondientes a un mínimo de 1 μ g. Por último, el gel era secado al vacío mediante un secador "SCIE-PLAS Gel Dryer Model GD4534".

PROCEDIMIENTO

1. Separar el gel de los vidrios utilizados para la electroforesis.
2. Sumergir el gel en la solución de tinción. Mantener en agitación durante 20min.
3. Sumergir el gel en la solución de lavado. Mantener en agitación durante 20min.
4. Sumergir el gel en la solución de fijación. Mantener en agitación durante un mínimo de 20min.
5. Secar el gel al vacío.

Solución de tinción

Azul brillante de Coomassie	0,1%
Ácido acético glacial: Metanol: Agua destilada	1: 5: 5

Solución de lavado

Ácido acético glacial: Metanol: Agua destilada	1: 5: 5
------------------------------------------------	---------

Solución de fijación

Ácido acético glacial: Metanol: Agua destilada	1: 1: 18
------------------------------------------------	----------

3.2.5. ENSAYOS DE TRANSPORTE

La caracterización del transporte de hipoxantina en *K. pneumoniae* se realizó mediante el estudio de la incorporación al interior celular de [³H]-hipoxantina según un protocolo basado en los trabajos de Hacking y Lin, 1976, Allende *et al.*, 2002 y Diallinas *et al.*, 1995.

PROCEDIMIENTO

1. Inocular en un medio de cultivo adecuado la cepa de *K. pneumoniae*. Incubar a 30°C, en constante agitación y durante 12-16h.
2. Reinocular la cepa en 10ml del mismo medio de cultivo por dilución 1:50 y crecer el nuevo cultivo a 30°C en constante agitación hasta alcanzar la fase de cultivo en la que se quiere analizar el transporte.
3. Determinar la DO del cultivo a 500nm.
4. Recoger las células por centrifugación a 5.000rpm durante 10min.
5. Lavar dos veces con KCl 1% p/v.
6. Resuspender el sedimento celular en el volumen de KCl 1% p/v que proporcione una densidad celular de 440µg/ml, peso húmedo (una DO a 500nm igual a 1 corresponde a una densidad celular de 220µg/ml).
7. Preparar una solución de [³H]-hipoxantina utilizando como solvente H₂O desionizada.
8. Atemperar las células, la solución de [³H]-hipoxantina y la de KCl al 1% p/v a la temperatura a la que se determinará el transporte.
9. Poner en contacto las células con la solución de [³H]-hipoxantina, en una proporción de volumen 9:1, iniciándose en este momento el ensayo.
10. Extraer a diferentes tiempos alícuotas de 150 µl y filtrarlas inmediatamente a través de filtros de nitrocelulosa de 0,45µm de diámetro de poro (Millipore).
11. Lavar los filtros con 4ml de KCl 1% justo después de filtrar las alícuotas.
12. Poner el filtro en un vial de centelleo y añadir 5ml de solución "Emulsifier-Safe" (Packard, Meriden, CT). Mezclar vigorosamente durante 10s para extraer los compuestos radiactivos de los filtros.

13. Realizar las lecturas de las muestras en un contador de centelleo. En este trabajo se utilizó el contador "LKB 1217 RACKBETA".

La [³H]-hipoxantina utilizada en este trabajo fue [8-³H]-hipoxantina (22Ci/mmol, 1mCi/ml, Amersham Pharmacia Biotech)

La acumulación de sustrato en el interior celular se expresa en este trabajo en nmoles de sustrato incorporado (por minuto) por cada 10⁹ células.

3.2.6. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

3.2.6.1. Determinación de la actividad xantina deshidrogenasa

La enzima xantina deshidrogenasa (XDH) cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y de ésta a ácido úrico, utilizando H₂O como donador del oxígeno incorporado en los productos de la reacción y NAD⁺ como aceptor de electrones.

La actividad XDH se ensayó mediante la determinación espectrofotométrica de la reducción de NAD⁺ o Ferricianuro (FeCN).

3.2.6.1.1. Mediante determinación espectrofotométrica de NADH

En este trabajo se siguió el protocolo aplicado por Leimkühler *et al.*, 1998. Este método se basa en el incremento de la absorbancia a una longitud de onda de 340nm, provocado por la reducción de NAD⁺ a NADH.

PROCEDIMIENTO

1. Preparar 1ml de una mezcla de reacción que contenga:
 - Tris-HCl 50mM (pH 8)
 - EDTA 1mM
 - DTT 2,5 mM
 - NAD⁺ 1mM
 - Cantidad adecuada de enzima
2. Iniciar la reacción, a 30°C, mediante adición de hipoxantina 0,3mM (concentración final).
3. Medir en el espectrofotómetro "Shimadzu UV 1603" la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 340nm.

Una unidad de actividad XDH se refiere a la cantidad de enzima que cataliza la reducción de 1µmol de NAD⁺ por minuto en las condiciones de ensayo aplicadas.

3.2.6.1.2. Mediante determinación espectrofotométrica de FeCN

En este trabajo se siguió el protocolo aplicado por Self, 2002. Este método se basa en la disminución de la absorbancia a una longitud de onda de 420nm, provocada por la reducción de ferricianuro, que se utiliza como aceptor de electrones en lugar de NAD⁺, a ferrocianuro.

PROCEDIMIENTO

1. Preparar 1ml de una mezcla de reacción que contenga ferricianuro potásico 0,5mM y la muestra enzimática a ensayar en un tampón de fosfato de sodio 0,1M (pH 8).
2. Iniciar la reacción, a 30°C, mediante adición de hipoxantina 1mM (concentración final).
3. Medir en el espectrofotómetro "Shimadzu UV 1603" la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 420nm.

Una unidad de actividad XDH se refiere a la cantidad de enzima que cataliza la reducción de 1 μ mol de FeCN por minuto en las condiciones de ensayo aplicadas.

3.2.6.2. Determinación de la actividad uricasa

La enzima uricasa cataliza la oxidación de ácido úrico a ácido hidroxisourico (Lee *et al.*, 2005). El método aplicado para determinar la actividad uricasa se basa en la disminución de la absorbancia a una longitud de onda de 293nm debida a la desaparición de ácido úrico (Huang y Wu, 2004).

PROCEDIMIENTO

1. Preparar 1ml de una mezcla de reacción que contenga la muestra a ensayar en un tampón de Tris-HCl 0,1M (pH 8.5).
2. Iniciar la reacción a 30°C mediante adición de ácido úrico 0,1mM (concentración final).
3. Medir en el espectrofotómetro "Shimadzu UV 1603" la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 293nm.

Una unidad de actividad uricasa se refiere a la cantidad de enzima que transforma 1 μ mol de ácido úrico en ácido 5-hidroxisourico por minuto en las condiciones de ensayo aplicadas.

3.2.6.3. Determinación de la actividad ureasa

La enzima ureasa cataliza la transformación de urea en CO₂ y NH₃. El método utilizado se basa en la generación del producto coloreado indofenol a partir del NH₃ (Weatherburn, 1967) producido por la ureasa (McGee *et al.*, 1999; Liu y Bender, 2007). En un medio alcalino y en presencia del catalizador nitroprusiato de sodio, el NH₃ reacciona con fenol e hipoclorito de sodio generando indofenol, cuya presencia se puede determinar mediante lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 546nm.

En este trabajo la actividad ureasa se determinó a partir de células de *K. pneumoniae* lavadas con KCl 1% p/v. Las células han de proceder de un cultivo en presencia de NiSO₄ 1 μ M, ya que el níquel es el cofactor de la ureasa. La concentración de proteína celular se determinó mediante el método de Lowry (MÉTODOS 3.2.2.).

PROCEDIMIENTO

Preparación de las células:

1. Inocular una colonia de *K. pneumoniae* en el medio de cultivo deseado y en presencia de NiSO₄ 1 μ M. Incubar durante 12-16h, a 30°C y en constante agitación.
2. Reinocular la cepa en 10ml del mismo medio de cultivo mediante dilución 1:50 y crecer el nuevo cultivo a 30°C en constante agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 540nm igual a 0,5.
3. Centrifugar el cultivo a 5.000rpm durante 10min y a 4°C. A partir de aquí, mantener las células en frío.
4. Resuspender el sedimento celular en 10ml de KCl 10% p/v.
5. Centrifugar a 5.000rpm durante 10min y a 4°C.
6. Resuspender el sedimento celular en 1ml de KCl 10% p/v.

Recta patrón:

7. Preparar la recta patrón con distintas cantidades de NH₄Cl.
Preparar varios tubos con distintas cantidades de NH₄Cl.

Añadir 100µl de Solución C.

Añadir 500µl de Solución A, seguidos de 500µl de Solución C.

Incubar durante 30min a 30°C.

Leer la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 546nm.

Ensayo:

8. Añadir a un tubo de ensayo 400µl de Solución C.
9. Añadir 25µl de la suspensión celular e incubar a 30°C durante 5min.
10. Iniciar la reacción mediante la adición de 50µl de urea 1M. Agitar vigorosamente.
11. Incubar el tiempo que se estipule.
12. Para parar la reacción, tomar 100µl de las muestras y añadirlos a tubos de ensayo que contengan 500µl de Solución A. Inmediatamente añadir 500µl de Solución B y agitar vigorosamente.
13. Incubar durante 30min a 30°C.
14. Centrifugar a 13.500rpm durante 10min para descartar los restos celulares.
15. Medir en el espectrofotómetro "Shimadzu UV 1603" la absorbancia de los sobrenadantes a una longitud de onda de 546nm.

Una unidad de actividad ureasa se define como la cantidad de enzima que produce un nmol de NH₃ por minuto en las condiciones de ensayo.

<u>Solución A:</u>	Fenol	1% p/v
	Nitroprusiato de Sodio	0,005% p/v
<u>Solución B:</u>	Hipoclorito de Sodio	0,262% v/v
	NaOH	0,5% p/v
<u>Solución C:</u>	KH ₂ PO ₄	50mM, pH 7,5
	CTAB	0,002% p/v
<u>Urea:</u>	Urea 1M ha de prepararse al momento	

3.2.6.4. Determinación de la actividad β-galactosidasa

La enzima β-galactosidasa cataliza la hidrólisis de β-galactósidos, como la lactosa, en monosacáridos. El método para determinar la actividad β-galactosidasa se basa en la hidrólisis del sustrato ONPG por acción de la β-galactosidasa en β-D-galactosa y o-nitrofenol, compuesto que se caracteriza por presentar un color amarillo que se puede determinar mediante lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 420nm (Baldauf *et al.*, 1988).

En este trabajo la actividad β-galactosidasa se determinó a partir de células de *K. pneumoniae* lavadas con KCl 1% p/v. La suspensión celular en KCl 1% se puede conservar como máximo durante 24h y a 4°C. La concentración de proteína celular se determinó mediante el método de Lowry (MÉTODOS 3.2.2.).

PROCEDIMIENTO

Preparación de las células:

1. Inocular una colonia de *K. pneumoniae* en el medio de cultivo deseado e incubar durante 12-16h, a 30°C en constante agitación.
2. Reinocular la cepa en 10ml del mismo medio de cultivo mediante dilución 1:50 y crecer el nuevo cultivo a 30°C en constante agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 540nm igual a 0,5.
3. Centrifugar el cultivo a 5.000rpm durante 10min a 4°C. A partir de aquí, mantener las células en frío.

4. Resuspender el sedimento celular en 10ml de KCl 10% p/v.
5. Centrifugar a 5.000rpm durante 10min a 4°C.
6. Resuspender el sedimento celular en 1ml de KCl 10% p/v.

Ensayo:

7. Añadir 100µl de H₂O desionizada a los tubos de ensayo donde se llevará a cabo la reacción.
8. Añadir 10µl de la suspensión celular.
9. Añadir 900µl de Tampón β-Gal preparado en el momento, agitar vigorosamente, e incubar durante 20min a 30°C.
10. Iniciar la reacción mediante la adición de 200µl de ONPG 4mg/ml. Agitar vigorosamente.
11. Incubar durante el tiempo que se estipule a 30°C.
12. Parar la reacción mediante la adición de 500µl de Na₂CO₃ 1M. Agitar vigorosamente.
13. Centrifugar las muestras a 13.500rpm durante 10min.
14. Leer la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 420nm.

Una unidad de actividad β-galactosidasa corresponde a la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar un nmol de ONPG por minuto.

<u>Tampón β-Gal:</u>	Tampón Z	1x
	CTAB	1x
	Deoxicolato de Sodio	1x
	β-ME	4mM
<u>Tampón Z 5x:</u>	Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	80,5g/l
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	27,5g/l
	KCl	3,75g/l
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,23g/l
	Ajustar a pH 7	
<u>CTAB 5x:</u>	CTAB	1g/l
<u>Deoxicolato de Sodio 50x:</u>	Na Deoxicolato	5g/l

3.3. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA

3.3.1. OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO

Para la obtención de DNA genómico se ha utilizado el kit comercial "Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit" (Promega). Este método consta de cuatro etapas diferenciadas. En una primera etapa se produce la lisis celular, a continuación el RNA y las proteínas son eliminados, respectivamente, por acción de la RNasa y mediante una precipitación salina, y por último se extrae el DNA genómico, que había quedado en solución, por precipitación con isopropanol. El DNA obtenido por este método tiene un alto grado de pureza y es adecuado para posteriores manipulaciones enzimáticas sin necesidad de purificaciones adicionales. La cantidad de DNA genómico obtenido es del orden de 40µg.

3.3.2. OBTENCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

3.3.2.1. Obtención de DNA plasmídico a pequeña escala: Método de la lisis alcalina

Para obtener DNA plasmídico por este método se utilizó el kit “Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega), que permite la obtención del DNA de forma rápida y sencilla. Este método se basa en la obtención de un lisado celular en medio alcalino seguida de la acción de la RNasa A, que degrada el RNA, y de la fosfatasa alcalina aislada de *Bacillus licheniformis* que a pH básico inactiva endonucleasas y otras proteínas liberadas durante la lisis celular que pueden afectar la calidad del DNA plasmídico. En el siguiente paso se procede a la desnaturalización de las proteínas por acción de clorhidrato de guanidina y a la precipitación de las mismas y del DNA genómico bacteriano por acción de una solución de acetato potásico a pH ácido. El último paso es la purificación del DNA plasmídico utilizando las columnas “Wizard[®] Plus SV Minipreps Spin Columns” en las que queda adsorbido. El DNA plasmídico obtenido por este método es estable a -20°C o a 4°C dependiendo de si el tampón utilizado en su elución es agua libre de nucleasas o solución de TE (MÉTODOS 3.3.3.5.2.), respectivamente. El DNA obtenido ($>8\mu\text{g}$) se encuentra mayoritariamente en forma circular superenrollada y es de una gran pureza, pudiéndose utilizar directamente en diferentes aplicaciones. Este método permite la utilización tanto de cepas EndA^- como EndA^+ , aunque se recomienda la utilización de las primeras. Así mismo, también es recomendable que el tamaño de plásmido no exceda de 20.000pb.

3.3.2.2. Obtención de DNA plasmídico a media escala

La obtención de DNA plasmídico a media escala se llevó a cabo mediante el kit “Wizard[™] Plus SV Midipreps DNA Purification System” (Promega), también basado en la lisis alcalina y con las mismas características que el comentado en el apartado anterior excepto el volumen del cultivo de partida y la concentración de las preparaciones obtenidas, que en este caso es mucho más elevada ($>50\mu\text{g}$).

3.3.3. MANIPULACIÓN ENZIMÁTICA DEL DNA

3.3.3.1. Digestión del DNA: Endonucleasas de restricción

Las endonucleasas de restricción son enzimas purificadas a partir de hongos o bacterias cuya función fisiológica es actuar como mecanismo de defensa hidrolizando enlaces fosfodiéster de DNA exógeno. Aunque existen diferentes clases de endonucleasas de restricción, las desoxirribonucleasas de tipo II son las más versátiles y una de las herramientas más importantes en la biología molecular. Estas enzimas de restricción reconocen una determinada secuencia en el DNA y realizan dos cortes, uno en cada cadena. Típicamente, la diana de estas enzimas es una secuencia palindrómica perfecta de 4-8pb. La rotura del DNA se produce dentro de la secuencia diana y origina un extremo 3'-hidroxilo y otro 5'-fosfato. Cuando el punto de corte coincide en ambas cadenas se habla de extremos romos, mientras que cuando el corte se produce a una altura diferente en cada cadena se habla de extremos cohesivos o protuberantes, que pueden serlo tanto en 3' como en 5'.

Todas las enzimas de restricción presentan una dependencia absoluta del catión Mg^{2+} , sin embargo, cada una requiere unas condiciones de reacción específicas en cuanto a pH, temperatura y fuerza iónica. Por este motivo, se utilizó una solución tampón específica en cada caso y se siguieron las indicaciones proporcionadas por la casa comercial suministradora del enzima en cuestión.

La mayoría de las endonucleasas de restricción son termosensibles permitiendo su inactivación por incubación a 65°C durante 15min. Las enzimas resistentes a la inactivación se eliminaron utilizando el kit comercial “QIAquick PCR Purification Kit” (Qiagen) (MÉTODOS 3.3.5.2.) o bien se inactivaron por cambios bruscos de temperatura (se realizaron incubaciones a -80°C seguidas de incubaciones a 65°C). La inactivación de las enzimas de restricción se realizó siempre previamente a la adición de la DNA ligasa. Los productos de la reacción se comprobaron mediante electroforesis en geles de agarosa, tal y como se describe en MÉTODOS 3.3.5.1.

3.3.3.2. Desfosforilación del DNA

La digestión de un vector de clonación con una única enzima de restricción origina extremos compatibles que podrían volverse a unir entre sí. Para evitar la recircularización de los vectores en las clonaciones no dirigidas, éstos se sometieron a la acción de la enzima fosfatasa alcalina (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, CIAP).

Las fosfatasas alcalinas catalizan la hidrólisis de residuos fosfato situados en el extremo 5' de cadenas de DNA o RNA, así como de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos trifosfato. Aunque existen diferentes fosfatasas alcalinas, se escogió CIAP porque presenta una mayor actividad específica y es fácilmente inactivable por calor (10min a 70°C).

El protocolo seguido fue el indicado por la casa comercial suministradora de la enzima.

3.3.3.3. Obtención de extremos romos

Para que la unión entre dos fragmentos de DNA sea posible sus extremos han de ser compatibles. Esto se consigue mediante la digestión de ambos fragmentos con las mismas enzimas o con enzimas que dejen extremos compatibles entre sí. Sin embargo, en ocasiones esto no es posible, por lo que se recurre a la obtención de extremos romos, siempre compatibles entre sí, a partir de extremos protuberantes incompatibles.

Con este fin, se utilizó el fragmento grande (Klenow) de la DNA polimerasa I, que presenta actividad polimerasa 5'→3' y exonucleasa 3'→5'. De esta manera fue posible convertir en extremos romos tanto extremos protuberantes 5' como 3'.

PROCEDIMIENTO

1. Adicionar 1U de la enzima Klenow por cada 1-4µg de DNA.
2. Incubar 15min a 37°C (Actúa la actividad exonucleasa 3'→5').
3. Adicionar 1µl de dNTP's 0,125mM.
4. Incubar 5min a 37°C (Actúa la actividad polimerasa 5'→3').
5. Inactivar la enzima por calor (70°C durante 20min).

3.3.3.4. Ligación de fragmentos de DNA

Dos fragmentos de DNA con extremos compatibles son susceptibles de ser unidos. Para ello se utiliza la DNA ligasa del bacteriófago T4, una enzima que cataliza la unión de dos fragmentos de DNA mediante la formación de un enlace fosfodiéster entre el grupo 5'-fosfato de un fragmento y el grupo 3'-hidroxilo del otro. La T4 DNA ligasa actúa tanto sobre extremos protuberantes como romos, aunque en este último caso la eficiencia es menor.

Este procedimiento fue utilizado para la construcción de plásmidos recombinantes.

PROCEDIMIENTO

1. Preparar convenientemente tanto el vector como el inserto para la ligación (digestión, defosforilación...).
2. Determinar la concentración aproximada de vector e inserto.
3. Preparar la reacción de ligación según las siguientes proporciones:

DNA vector	variable ⁽¹⁾
DNA inserto	variable ⁽²⁾
T4 DNA ligasa	1U
Tampón de ligación	1x

⁽¹⁾Normalmente 100ng

⁽²⁾La cantidad de inserto a ligar se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{ng inserto} = \text{tamaño del inserto (Kb)} \times \frac{\text{ng vector}}{\text{tamaño del vector (Kb)}} \times \text{relación molar} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}}$$

(Habitualmente se utilizó una relación molar vector: inserto de 1:3 aunque ésta puede ser variable)

4. Incubar la mezcla de reacción según la siguiente pauta:
 - a. Extremos protuberantes: 1h a 18°C y 1h a 24°C.
 - b. Extremos romos: Toda la noche en un gradiente de temperatura desde 14°C a temperatura ambiente.

3.3.3.5. Marcaje de fragmentos de DNA

3.3.3.5.1. Marcaje homogéneo con DIG-11-dUTP

Este método permite obtener fragmentos de DNA marcados a lo largo de toda su longitud de manera no radioactiva. Para ello se empleó el marcador DIG-11-dUTP (Roche), que consiste en una molécula de digoxigenina unida covalentemente a la base pirimidínica del nucleótido desoxiuridina trifosfato. El marcaje se realizó mediante PCR (MÉTODOS 3.3.4.) utilizando una mezcla de nucleótidos, a las concentraciones indicadas por la casa comercial, que contiene una proporción de dTTP a DIG-11-dUTP de 2:1. Durante la reacción de PCR, la DNA polimerasa utiliza como sustrato DIG-11-dUTP en lugar de dTTP. Los fragmentos de DNA marcados se purificaron según el protocolo descrito en MÉTODOS 3.3.5.2..

En este trabajo los fragmentos de DNA marcados con DIG-11-dUTP se utilizaron como sondas para la detección de inserciones en el genoma de *K. pneumoniae* mediante Southern Blot (MÉTODOS 3.3.8.).

3.3.3.5.2. Marcaje radioactivo 5' terminal

Este método permite obtener fragmentos de DNA marcados radiactivamente sólo en su extremo 5'. Para este tipo de marcaje se utilizó la T4 polinucleótido quinasa (T4 PNK), enzima que cataliza la transferencia del fosfato en posición γ del ATP a los extremos 5'-fosfato del DNA y del RNA. Como donador de grupos fosfato marcados radiactivamente se utilizó $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (3000mCi/mmol) y para purificar la sonda marcada se realizó una cromatografía de gel filtración en una columna de Sephadex[®] G-25.

Los fragmentos de DNA marcados con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ se utilizaron como sondas en los ensayos de retardación de la movilidad electroforética (MÉTODOS 3.4.2.).

PROCEDIMIENTO

1. Preparar la siguiente mezcla en un tubo de microcentrífuga:

DNA	1 μg
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$	20 μCi
T4 PNK	20U
Tampón T4 PNK	1x
H ₂ O c.s.p.	40 μl

2. Incubar a 37°C durante 1h.
3. Parar la reacción añadiendo 60 μl de TE y congelar la muestra a -20°C.
4. Purificar la sonda marcada mediante gel filtración en una columna de Sephadex[®] G-25:

- Preparar una columna con 2ml de una suspensión de Sephadex[®] G-25 en TE (0,2g/ml). Encajar la columna en un tubo de microcentrífuga.
- Centrifugar a 500xg durante 15min para compactar el Sephadex[®].
- Retirar el tubo de microcentrífuga de la columna y sustituirlo por uno nuevo.
- Aplicar la muestra que contiene la sonda marcada a la columna. Centrifugar a 500xg durante 15min.
- Extraer el tubo de microcentrífuga, que contiene la sonda purificada, de la columna y guardarlo a -20°C (la sonda marcada es estable a esta temperatura durante 2 semanas). Asumiendo que no hay pérdida en el proceso de purificación, la concentración de la sonda marcada es de 10ng/μl.

TE

Tris-HCl pH 8,0 10mM

EDTA pH 8,0 1mM

3.3.4. TÉCNICA DE PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) diseñada por K.B. Mullis a mediados de los años 80 se utiliza para amplificar, de forma exponencial, un fragmento de DNA de doble cadena delimitado por regiones de secuencia conocida (Arnheim *et al.*, 1992). El proceso de PCR consiste en desnaturalizar el DNA molde mediante calor para, a continuación, unir los oligonucleótidos cebadores que son complementarios respectivamente a cada una de las dos cadenas. A partir de estos cebadores, una DNA polimerasa sintetizará las nuevas cadenas de DNA. Este proceso se repite de forma cíclica de 20 a 30 veces. Puesto que los productos de un ciclo sirven también como molde para el siguiente, al final del proceso se obtienen $m \cdot 2^n$ moléculas, siendo m el número de moléculas de DNA molde iniciales y n el número de ciclos aplicados.

Las DNA polimerasas utilizadas en esta técnica han de resistir la elevada temperatura necesaria para la desnaturalización del DNA molde y también tienen que sintetizar las nuevas cadenas de DNA a una temperatura tal que reduzca la obtención de fragmentos inespecíficos. Por ello se utilizan polimerasas termoestables. En este trabajo se ha utilizado de forma general la *Taq* DNA polimerasa (BioTherm[™], GeneCraft), excepto cuando se requería una alta fidelidad o que los fragmentos de DNA amplificados tuviesen los extremos romos; en estos casos se utilizó la *Pfu Turbo*[™] DNA Polimerasa (Stratagene). Estas enzimas requieren el catión Mg^{2+} como cofactor.

Las reacciones de PCR son muy susceptibles al tipo de DNA molde utilizado, así como a la concentración de Mg^{2+} , cebadores y dNTPs. Por este motivo, no existe un protocolo generalizado, sino que cada reacción necesita ser puesta a punto. Básicamente se siguió el protocolo descrito por Sambrook *et al.*, 1989.

PROCEDIMIENTO

- Preparar la mezcla de reacción en tubos de 0,5ml de capacidad y colocar en el termociclador.

Mezcla de reacción

DNA molde	variable ⁽¹⁾
Cebador A	0,025mM
Cebador B	0,025mM
dNTPs	0,2mM
DNA polimerasa	2,5U
Tampón de amplificación	1x
Mg^{2+} ⁽²⁾	1,5-4mM
H ₂ O desionizada	c.s.p. ⁽³⁾

- ⁽¹⁾ 2 ng de DNA genómico, 50ng de DNA plasmídico o una colonia celular.
- ⁽²⁾ Siempre y cuando no estuviese incluido en el tampón de reacción.
- ⁽³⁾ Volumen final de 100µl para la obtención de fragmentos de DNA y 20µl para el análisis de clones recombinantes.
2. Desnaturalizar el DNA molde a 94°C (1min para DNA plasmídico y 5min para DNA genómico o colonia celular).
 3. Aplicar un número variable de ciclos (20-30) con los siguientes pasos:
 - a. Desnaturalización del DNA: 94°C, durante 45s.
 - b. Unión de los cebadores: 45s a la T_m óptima (específica para cada pareja de cebadores).
 - c. Extensión: 72°C durante el tiempo necesario (1min por cada 1Kb excepto cuando se utiliza la *Pfu* que amplifica 1Kb cada 2min aproximadamente).
 4. Aplicar un último ciclo de extensión durante 10min y a 72°C.
 5. Purificar el DNA obtenido por alguna de las técnicas descritas en MÉTODOS 3.3.5..

Las reacciones se realizaron en dos modelos diferentes de termociclador: "Eppendorf Mastercycler 5330" (Eppendorf) y "MiniCycler™" (MJ Research).

La técnica de PCR se ha utilizado en este trabajo con diferentes finalidades que se detallan en los siguientes apartados.

3.3.4.1. Obtención de fragmentos de DNA

La técnica de PCR se utilizó tanto para la obtención de fragmentos de DNA que posteriormente fueron clonados en diferentes plásmidos, como para la obtención de sondas de DNA utilizadas en experimentos de *Southern Blot* y de retardación de la movilidad electroforética en geles de poliacrilamida.

Para comprobar que durante el proceso de amplificación la DNA polimerasa no hubiese introducido mutaciones, todos los fragmentos obtenidos mediante esta técnica fueron secuenciados.

3.3.4.2. Selección de clones recombinantes

La técnica de PCR también permite la selección de clones recombinantes que provienen de la ligación entre un fragmento de DNA y un vector de clonación. Para ello se utiliza una pareja de cebadores pertenecientes al vector de clonación o bien un cebador del vector y otro del fragmento clonado. En los casos en los que el DNA clonado y las cepas utilizadas para la transformación de las ligaciones sean del mismo microorganismo, no es posible utilizar dos cebadores propios del fragmento clonado, ya que estos podrían unirse también al cromosoma bacteriano y originar falsos positivos.

La realización de esta técnica no requiere la obtención previa del DNA plasmídico recombinante, ya que es posible llevarla a cabo directamente utilizando colonias bacterianas.

3.3.4.3. PCR inversa

El análisis de mutaciones por inserción del transposón mini-Tn5 Km (MÉTODOS 3.1.6.1.) se llevó a cabo mediante PCR inversa (Sambrook *et al.*, 2001), que permite amplificar las secuencias genómicas que flanquean el transposón. Dado que la inserción del transposón es al azar, es necesaria la utilización de una técnica que nos permita localizar en el genoma el transposón insertado. Esta técnica se basa en la digestión total del DNA genómico del mutante a analizar con una única enzima de restricción que produzca cortes frecuentes en el DNA, de forma que se obtengan fragmentos de tamaño no superior a 1Kb. Para ello se suelen utilizar endonucleasas que reconocen secuencias de 4pb que cortan aproximadamente cada 256pb. En este trabajo se utilizaron las

endonucleasas de restricción *HhaI* y *TaiI*. Los fragmentos obtenidos tras la digestión son sometidos a la acción de la T4 DNA ligasa con la finalidad de obtener fragmentos de DNA genómico recircularizados. Para favorecer la formación de ligaciones intramoleculares la ligación se lleva a cabo diluyendo significativamente los productos de la digestión. Utilizando oligonucleótidos de un extremo del transposón se amplifica por PCR el fragmento de DNA recircularizado. En este trabajo se utilizó una pareja de cebadores complementaria al extremo I del transposón (oligonucleótidos IminiTn5Km.int y miniTn5Km.ext). Además, se empleó otra pareja de cebadores complementaria al extremo O (oligonucleótidos OminiTn5Km.int y miniTn5Km.ext). El fragmento de DNA obtenido mediante PCR es purificado y tras su secuenciación, con los mismos cebadores mencionados anteriormente, se puede localizar el punto de inserción del transposón en el genoma bacteriano (FIGURA 3.4.).

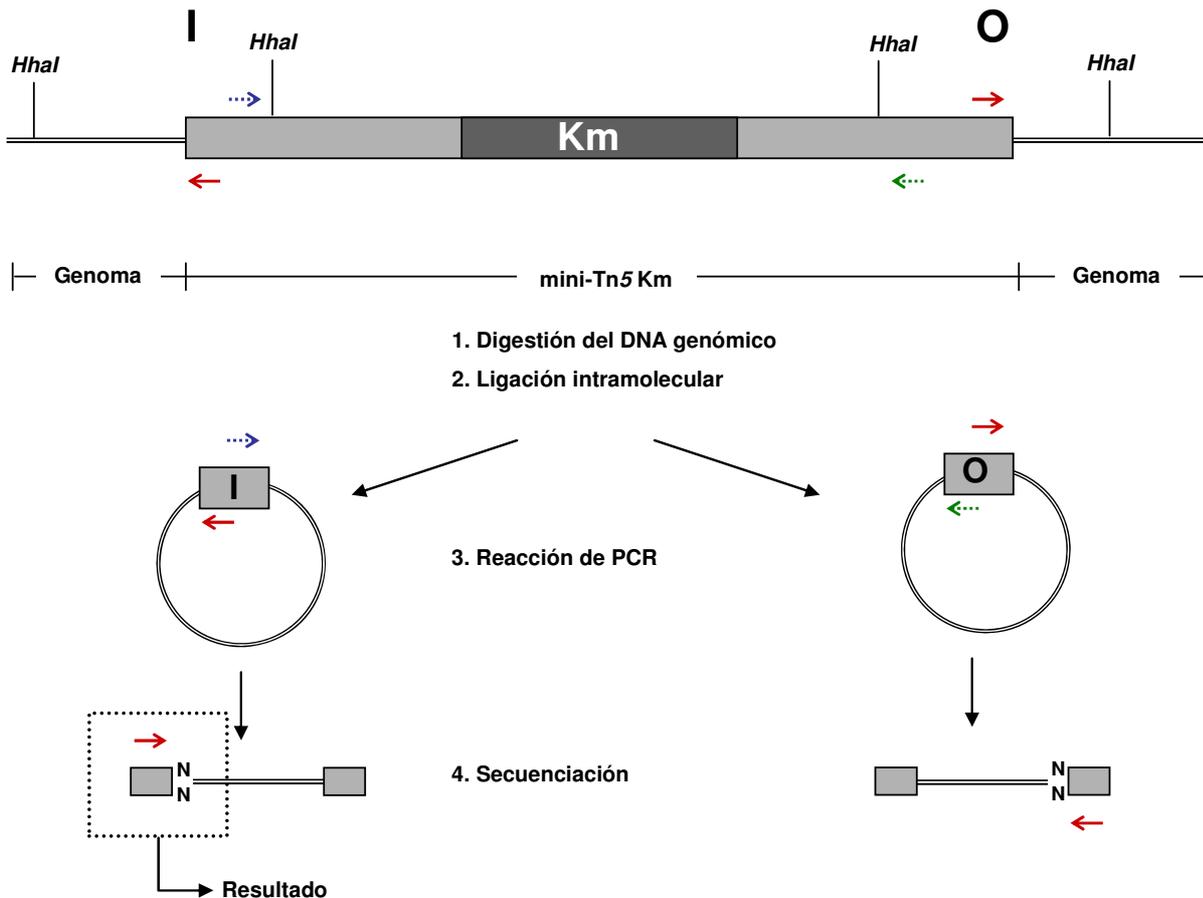


FIGURA 3.4.: Localización del punto de inserción del transposón mini-Tn5 Km en el genoma mediante PCR inversa. El DNA genómico que contiene el transposón mini-Tn5 Km insertado es aislado y sometido a digestión sencilla. En esta trabajo se utilizaron las endonucleasas de restricción *HhaI* y *TaiI*. Posteriormente los productos de la digestión son sometidos a ligación intramolecular. La reacción de ligación se utiliza como molde en una reacción de PCR con cebadores complementarios a los extremos I (oligonucleótidos IminiTn5Km.int y miniTn5Km.ext) u O (oligonucleótidos OminiTn5Km.int y miniTn5Km.ext) del transposón. Se muestra el procedimiento utilizando la enzima de restricción *HhaI*. Flechas rojas: cebador miniTn5Km.ext. Flecha azul discontinua: cebador IminiTn5Km.int. Flecha verde discontinua: cebador OminiTn5Km.int. N: Nucleótido correspondiente al genoma de *K. pneumoniae* adyacente al extremo correspondiente del transposón

3.3.5. RESOLUCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

3.3.5.1. Separación de fragmentos de DNA en geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa es una técnica que permite la separación analítica y preparativa de fragmentos de DNA de un tamaño comprendido entre 0,1 y 25Kb. La capacidad de resolución de estos geles depende de la concentración de agarosa con la que se han preparado, de

forma que es posible discriminar entre bandas de DNA de tamaño muy parecido mediante la variación de la concentración de agarosa del gel. Así pues, los geles eran preparados a diferente concentración en función del tamaño de las bandas que se pretendían separar (Sambrook *et al.*, 1989).

El uso de bromuro de etidio, presente en el gel de agarosa, permite, una vez realizada la electroforesis, visualizar los fragmentos de DNA por irradiación con luz ultravioleta de corta longitud de onda (310nm). De esta forma es posible detectar bandas de tan sólo 5ng de DNA. También permite visualizar RNA.

La migración de las bandas de DNA es proporcional al logaritmo de su peso molecular. La masa molecular de los fragmentos de DNA separados se determinó utilizando un marcador de fragmentos de DNA de tamaño conocido. Dado que la movilidad de las moléculas de DNA en el gel depende de la forma de las mismas (lineal, circular, superenrollada) sólo pueden ser comparadas movilidades de moléculas de la misma forma. En la determinación del tamaño de fragmentos lineales de DNA se utilizó el marcador de DNA λ digerido con *Hind* III (MBI Fermentas) si las bandas eran de tamaño superior a 2Kb y marcador de 100pb (Invitrogen Life Technologies) si el tamaño de las bandas era inferior a 2Kb. En este trabajo se han utilizado geles de agarosa preparados entre el 0,8 y el 1,5% (p/v).

Los geles de agarosa se preparan mediante la fusión de la agarosa en tampón de electroforesis (TAE 1x) y posterior adición, una vez atemperada la solución, de bromuro de etidio (concentración final de 0,5 μ g/ml). La mezcla se deja solidificar sobre un molde, de tal forma que en uno de los extremos del gel se forman los pocillos en los que se aplicarán las muestras de DNA.

Antes de aplicar las muestras se añade a éstas un tampón de carga, que aporta la densidad adecuada para depositarlas en los pocillos del gel y además permite seguir el frente de la electroforesis.

La electroforesis se realiza horizontalmente, y con el gel completamente sumergido en tampón de electroforesis (TAE 1x), con una diferencia de potencial de 1-10V/cm.

Tampón de electroforesis (TAE 50x)

Tris base	5M
Ácido acético glacial	1M
EDTA pH 8,0	50mM

Tampón de carga (10x)

Glicerol	5%
Azul de bromofenol	5%

3.3.5.2. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Para este procedimiento se utilizó el kit "QIAquick™ Gel Extraction Kit" (QIAGEN), que permite la extracción y purificación de fragmentos de DNA, de tamaño comprendido entre 70pb y 10Kb, a partir de geles de agarosa.

El método consiste en la solubilización del fragmento de agarosa que contiene el DNA que se desea purificar, el cual ha sido previamente recortado del gel, y la posterior adsorción selectiva de los ácidos nucleicos a una membrana. La adsorción del DNA a la membrana de sílica-gel ocurre sólo en presencia de una elevada concentración de sales caotrópicas (Vogelstein y Gillespie, 1979), que modifican la estructura del agua (Hamaguchi y Geiduscheck, 1962). La adsorción del DNA a la membrana también depende del pH, siendo ésta máxima (95%) a pH < 7,5. Por el contrario, la elución del DNA se produce a bajas concentraciones de sales y pH básico.

3.3.5.3. Separación de fragmentos de DNA en geles de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida presentan una mayor capacidad de resolución que los geles de agarosa, permitiendo separar fragmentos diferenciados en un solo desoxirribonucleótido. Por este motivo, cuando fue necesario purificar fragmentos de DNA de tamaños muy similares, se utilizó este procedimiento. De esta forma, es posible eliminar fragmentos contaminantes que diferían en pocos pares de bases del fragmento que se quería purificar.

La concentración de poliacrilamida depende del tamaño del fragmento de DNA que se quiere purificar (Sambrook *et al.*, 1989). En este trabajo, todos los geles de poliacrilamida se han preparado con una concentración del 5%, adecuada para separar fragmentos con un tamaño comprendido entre 30 y 400pb.

Los geles se preparaban entre dos vidrios, previamente tratados con etanol absoluto, de 19,5cm de alto por 16,5cm de ancho. Ambos vidrios se separaban entre sí colocando en los laterales, unas tiras de plástico de 1mm de grosor, lo que determinaba también el grosor del gel. Este montaje era fijado con ayuda de unas pinzas y sellado con agarosa al 1% p/v por los laterales y por la parte inferior. El gel, aún líquido, se depositaba por la parte superior, y antes de que polimerizase se colocaba la pieza que formaría los pocillos donde se aplicarían las muestras. Una vez polimerizado, el gel podía usarse pasadas 2h o bien conservarse a 4°C hasta 72h.

El gel se colocaba en la cubeta de electroforesis de forma vertical y se cubría la parte superior e inferior con tampón de electroforesis. Antes de aplicar las muestras, el gel se sometía a electroforesis durante 30min a 20mA. Pasado este tiempo, las muestras eran preparadas por adición de tampón de carga 6x y aplicadas en el gel. Para conocer el tamaño de las bandas de DNA, se reservaba un carril para el marcador de peso molecular. La electroforesis se desarrollaba a 20mA durante un tiempo que variaba en función del tamaño de las bandas que se querían separar.

Una vez finalizada la electroforesis, el gel era separado de los vidrios y teñido con bromuro de etidio para visualizar las bandas. Para ello, el gel se depositaba en una bandeja con 100ml de agua destilada y bromuro de etidio (4µg/ml) y se mantenía en agitación durante 30min. El exceso de bromuro de etidio era eliminado cambiando el gel a otra bandeja con 100ml de agua destilada y manteniéndolo en agitación durante 30min.

Gel de poliacrilamida

Acrilamida: Bisacrilamida (29: 1)	5%
Tampón de electroforesis TBE	1x
Persulfato amónico	0,07% p/v
TEMED	0,07% v/v
Desgasificar filtrando al vacío (tamaño de poro 0,45µm)	

Tampón de electroforesis (TBE 5x)

Tris-HCl pH 8,0	450mM
Ácido bórico	450mM
EDTA pH 8,0	10mM

Tampón de carga 6x

Azul de bromofenol	1mg/ml
Xilencianol	1mg/ml
Glicerol	50% v/v

3.3.5.4. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de poliacrilamida

Una vez realizada la electroforesis y teñido el gel de poliacrilamida, éste se coloca sobre una fuente de luz ultravioleta para poder visualizar las bandas de DNA y recortar el fragmento de gel que contiene la banda a purificar. El fragmento de gel se pone en contacto con 400µl de una solución de acetato amónico 2M en tampón TE (MÉTODOS 3.3.3.5.2.) y se deja en agitación a 37°C un mínimo de 48h para que eluya el DNA. Se retira el fragmento de poliacrilamida y se recupera el DNA de la muestra como si se tratara de un producto de PCR (MÉTODOS 3.3.5.5).

3.3.5.5. Purificación de fragmentos de DNA obtenidos por PCR

3.3.5.5.1. Método de extracción fenol-cloroformo

Este método se emplea para purificar DNA contaminado de proteínas como, en este caso, la *Taq* polimerasa. Volúmenes iguales de la muestra de DNA y los solventes orgánicos forman una mezcla en la que se pueden distinguir dos fases, una orgánica que contiene las proteínas y otra acuosa que contiene el DNA. Al final de la purificación, el DNA es precipitado con etanol.

PROCEDIMIENTO

1. Añadir a la muestra de DNA un volumen equivalente de Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico (25:24:1; Sigma). Agitar vigorosamente.
2. Centrifugar a 14.500rpm durante 5min a 4°C.
3. Transferir la fase acuosa a un tubo de microcentrífuga nuevo. Añadir un volumen equivalente de Cloroformo:Alcohol isoamílico (24:1). Agitar vigorosamente.
4. Centrifugar a 14.500rpm durante 5min a 4°C.
5. Transferir la fase acuosa a un tubo de microcentrífuga que contenga 10µl de Acetato de sodio 3M pH 5,2. Añadir 250µl de etanol 100% v/v por cada 100µl de DNA. Agitar vigorosamente.
6. Centrifugar a 14.500rpm durante 20min a 4°C.
7. Descartar el sobrenadante y lavar el sedimento correspondiente al DNA con 1ml de etanol 70% v/v.
8. Centrifugar a 14.500rpm durante 10min a 4°C. Descartar el sobrenadante y dejar secar el DNA a temperatura ambiente.
9. Resuspender el DNA en un volumen apropiado de H₂O desionizada.

3.3.5.5.2. Kit Qiagen

Cuando las muestras obtenidas por PCR no presentaban bandas de DNA inespecíficas, éstas podían ser purificadas directamente mediante el kit "QIAquick™ PCR Purification Kit" (QIAGEN), que permite eliminación de los cebadores, nucleótidos, sales y DNA polimerasa.

Este método permite purificar productos de PCR de entre 0,1 y 10Kb y se basa en el mismo principio ya comentado en MÉTODOS 3.3.5.2.

3.3.6. CONSTRUCCIÓN DE MOLÉCULAS HÍBRIDAS DE DNA

El proceso de obtención de moléculas híbridas de DNA consta de diferentes etapas, todas ellas comentadas en apartados anteriores. El primer paso consiste en la obtención del DNA de partida (vector de clonación e inserto que se desea clonar). El inserto puede obtenerse mediante la técnica de PCR (MÉTODOS 3.3.4.) o por digestión a partir de otro plásmido. A continuación ambos DNAs deben ser digeridos mediante el uso de las endonucleasas de restricción apropiadas (MÉTODOS 3.3.3.1.) y modificados por las enzimas necesarias (MÉTODOS 3.3.3.2. y 3.3.3.3.) con el objeto de obtener en

ambas moléculas extremos compatibles. El vector y el inserto así tratados son ligados (MÉTODOS 3.3.3.4.) y transformados en la cepa más adecuada según el caso (MÉTODOS 3.1.4.). Por último se selecciona un clon que contenga la molécula híbrida de interés (MÉTODOS 3.3.4.2.) y se obtiene el DNA plasmídico (MÉTODOS 3.3.2.). El DNA obtenido se puede analizar mediante secuenciación (MÉTODOS 3.3.7.).

3.3.7. SECUENCIACIÓN DE DNA (MÉTODO DE SANGER) CON SUSTRATOS FLUORESCENTES

La secuenciación es la técnica más importante en la caracterización del DNA. En este trabajo se realizó la secuenciación de fragmentos de DNA con la finalidad de comprobar la correcta construcción de las moléculas híbridas, para evidenciar que ninguna mutación se había introducido durante la amplificación por PCR del DNA, para localizar mutaciones por PCR inversa e incluso para obtener la secuencia de determinadas regiones del genoma de la cepa de *K. pneumoniae* utilizada en este trabajo.

La secuenciación del DNA según el método descrito por Sanger *et al.*, 1977 aprovecha la capacidad de la DNA polimerasa para utilizar los análogos 2'-3'-didesoxirribonucleótidos (ddNTP) a la vez que los sustratos naturales desoxirribonucleótidos (dNTP). La incorporación de estos análogos provoca la interrupción de la síntesis de la cadena naciente debido a la falta del grupo 3'-OH necesario para su elongación. Con una proporción adecuada de ddNTP:dNTP se produce un conjunto de cadenas representativo de todos los tamaños posibles.

Para la secuenciación del DNA de forma automática se utilizó el kit "ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.1" (PE Biosystems). Este método se basa en la incorporación de didesoxirribonucleótidos trifosfato fluorescentes durante la síntesis del DNA.

PROCEDIMIENTO:

1. Preparar las mezclas de reacción en tubos de microcentrífuga de 0,5ml de capacidad y colocar en el termociclador.

La mezcla de reacción cambia en función del tipo de DNA que se desea secuenciar. En este trabajo se secuenciaron por este método DNA plasmídico obtenido a pequeña y mediana escala (MÉTODOS 3.3.2) y productos de PCR purificados (MÉTODOS 3.3.4.).

MEZCLA DE REACCIÓN

	DNA PLASMÍDICO	Producto de PCR
Terminator Ready Reaction Mix ¹	2µl	8µl
Muestra de DNA ²	1µl	3µl
Oligonucleótido	0,5 µl	0,5µl
H ₂ O desionizada c.s.p.	10µl	20µl

¹Este reactivo proporcionado por la casa comercial contiene los elementos necesarios para que tenga lugar la síntesis controlada de la cadena de DNA a partir del oligonucleótido (terminadores fluorescentes, dNTPs, DNA polimerasa AmpliTaq, FS, MgCl₂ y tampón Tris-HCl pH 9,0).

²El volumen de DNA es el indicado, siempre y cuando la cantidad de cada preparación de DNA sea la óptima.

2. Incubar a 96°C durante 30s.
3. Incubar a 50-55°C (esta temperatura varia dependiendo del oligonucleótido utilizado) durante 15s.
4. Incubar a 60°C durante 4min.
5. Realizar 25 ciclos (cada ciclo está formado por los pasos 2, 3, 4).
6. Añadir H₂O desionizada y etanol 96% v/v a la mezcla para precipitar el DNA (concentración final de etanol igual a 60% v/v). Incubar a temperatura ambiente durante 15min.

7. Centrifugar a 14.000xg a temperatura ambiente durante 20min.
8. Lavar dos veces el precipitado con 250µl de etanol 70% v/v y centrifugar a 14.000xg durante 10min.
9. Desechar el sobrenadante y eliminar los restos etanólicos por evaporación a temperatura ambiente durante 30min.
10. Separar y detectar las diferentes cadenas de DNA sintetizadas por electroforesis en el analizador "ABI Prism 377" de los Servicios científicotécnicos de la Universidad de Barcelona (AbiPrism, PE Biosystems).

3.3.8. ANÁLISIS DE DNA POR SOUTHERN BLOT

Esta técnica se emplea para conocer el tamaño de determinados fragmentos de restricción obtenidos a partir de la digestión de DNA genómico con diferentes enzimas de restricción (Sambrook *et al.*, 1989). Los productos de las digestiones se transfieren a una membrana de nailon y los fragmentos de los que se desea conocer el tamaño se detectan mediante hibridación con una sonda marcada. En este trabajo las sondas se marcaron con DIG-11-dUTP (Roche), cuya detección se realiza mediante la unión de un anticuerpo anti-digoxigenina (Roche) que es capaz de generar una señal quimioluminiscente a partir del sustrato CDP-Star (Roche).

PROCEDIMIENTO:

Digestiones de DNA genómico

1. Digerir el DNA genómico con las endonucleasas de restricción apropiadas.
2. Separar los fragmentos de restricción en un gel de agarosa.
3. Para desnaturalizar el DNA realizar dos lavados del gel, de 20min cada uno, con NaOH 0,5M y NaCl 1,5M.
4. Para neutralizar el medio, realizar tres lavados del gel, de 20min mínimo cada uno, con Tris-HCl 0,5M pH 7,5, NaCl 3M y EDTA 1mM.

Transferencia de los productos de la digestión a una membrana de nailon

5. Preparar una cubeta de vidrio que contenga SSC 20x con un vidrio encima. Sobre el vidrio colocar 3 papeles Watman de 15cm de ancho que sobresalgan del mismo de manera que se sumergan en el SSC 20x contenido en la cubeta. Colocar sobre éstos los siguientes elementos en el orden indicado: el gel, una membrana de nailon (previamente humedecida con SSC 2x y equilibrada con SSC 20x) del mismo tamaño que el gel, tres papeles Watman del mismo tamaño que el gel, una pila de papeles de filtro del mismo tamaño que el gel y un vidrio. Envolver el montaje con un film de plástico para evitar que se evapore al H₂O del tampón SSC, colocar un peso mayor a 0,5Kg sobre el vidrio superior y dejar a temperatura ambiente durante 12-16h.

Preparación de la membrana para la hibridación con la sonda Dig-11-dUTP.

6. Retirar la membrana y lavarla con SSC 2x.
7. Colocar la membrana entre dos papeles Watman y secarla durante 30min a 80°C.
8. Para fijar el DNA a la membrana, exponerla durante 3min a una radiación ultravioleta. Esta membrana puede conservarse a 4°C durante varios días.
9. Pre-hibridación: Equilibrar la membrana con SSC 2x durante 3min e incubarla en un horno de hibridación a 37°C durante 3h en 15ml de la solución de prehibridación de Roche "Dig Easy Hyb" precalentada a la misma temperatura.

Hibridación con una sonda marcada con DIG-11-dUTP (MÉTODOS 3.3.3.5.1.)

10. Para desnaturalizar la sonda (10ng/ml solución hibridación), incubar a 100°C durante 10min. Inmediatamente después de ese tiempo, dejarla durante 5min en hielo.
11. Descartar la solución de prehibridación y añadir la solución de hibridación (15ml "Dig Easy Hyb" precalentados a 37°C y conteniendo la sonda desnaturalizada). Incubar en un horno de hibridación a 37°C durante 12-16h.
12. Lavar la membrana de la siguiente manera:

- a. Durante 6min en el horno de hibridación a temperatura ambiente con SSC 2x y SDS 0,1% p/v.
- b. Durante 10min en el horno de hibridación a temperatura ambiente con SSC 2x y SDS 0,1 % p/v.
- c. Durante 20min en el horno de hibridación a temperatura ambiente con SSC 0,5x y SDS 0,1% p/v.
- d. Durante 25min en el horno de hibridación a 68°C con SSC 0,5x y SDS 0,1% p/v precalentados a la misma temperatura.

Detección (Temperatura ambiente). Para la detección se siguieron las indicaciones de la casa comercial.

13. Equilibrar la membrana con el Tampón de Lavado durante 1min.
14. Bloquear la membrana con la Solución bloqueante 1x durante 30–60min en constante agitación.
15. Cambiar la Solución bloqueante por la Solución del anticuerpo e incubar durante 30min y en agitación constante.
16. Descartar la Solución del anticuerpo y lavar la membrana dos veces, durante 15min cada una, con el Tampón de lavado.
17. Descartar el Tampón de lavado y equilibrar la membrana con el Tampón de detección durante 2min.
18. En oscuridad y manteniendo la membrana húmeda, colocarla sobre una lámina de plástico, añadir la Solución del sustrato, colocar encima otra lámina de plástico y extender la Solución del sustrato homogéneamente por toda la membrana.
19. Colocar la membrana en un casete para contactar, colocar una película de autorradiografía y dejar contactando el tiempo apropiado antes del revelado de la película.

Deshibridación:

20. El DNA de una membrana puede ser hibridado con diferentes sondas, para lo que es necesario evitar que la membrana se seque y deshibridar cada vez la última sonda utilizada. En primer lugar se equilibra la membrana con SSC 2x
21. Lavar la membrana dos veces, durante 15 min cada una y en el horno de hibridación a 37°C, con NaOH 0,2M y SDS 0,1% p/v precalentados a la misma temperatura.
22. Equilibrar con SSC 2x durante 5min a temperatura ambiente.
23. Guardar la membrana en SSC 2x a 4°C hasta la siguiente hibridación.

<u>SSC 20x:</u>	NaCl	3M
	Citrato sódico	0,3M
	Ajustar a pH 7,0 con HCl	
<u>Tampón de lavado:</u>	Tween [®] 20 0,3% v/v en Tampón del Ácido Maléico	
<u>Solución bloqueante (10x):</u>	Reactivo de Bloqueo (Roche) 10% p/v en el Tampón del Ácido Maléico. Para disolver el reactivo es necesario autoclavar la solución.	
<u>Solución del anticuerpo:</u>	Anticuerpo anti-digoxigenina diluido 1:20.000 en la Solución bloqueante 1x.	
<u>Tampón de detección:</u>	Tris-HCl	0,1M
	NaCl	0,1M
	pH 9,5	
<u>Solución del Sustrato:</u>	CDP-Star, atemperado a temperatura ambiente, diluido 1:300 en el Tampón de Detección	
<u>Tampón del ácido maleico:</u>	Ácido Maléico	100mM
	NaCl	150mM
	Ajustar el pH a 7,5 con NaOH sólida	

3.4. CARACTERIZACIÓN DE PROMOTORES

3.4.1. FUSIÓN DE PROMOTORES AL GEN *lacZ*

La fusión de promotores al gen *lacZ* es una técnica que permite estudiar la regulación de la transcripción de diferentes genes. Mediante esta técnica es posible analizar la expresión del gen o genes en estudio a través de la expresión del gen *lacZ*, que codifica la enzima β -galactosidasa, cuantificable mediante un ensayo sencillo y sensible.

En primer lugar se obtuvieron las fusiones de promotor en el vector multicopia pRS415 (Simons *et al.*, 1987). Posteriormente se subclonaron en el vector suicida pCB1583 (Liu y Bender, 2007) para, a continuación, transferir únicamente una copia al genoma de *K. pneumoniae*.

3.4.1.1. Obtención de fusiones en vector multicopia

El vector utilizado para obtener las fusiones transcripcionales de promotor al gen *lacZ* pertenece a la familia pRS descrita por Simons *et al.*, 1987. En concreto se utilizó el plásmido multicopia pRS415 (MATERIALES 2.2.1.3.).

Los fragmentos cuya actividad promotora se quería estudiar se obtuvieron mediante PCR. Para ello se utilizó una pareja de cebadores que incorporaban las dianas para las endonucleasas de restricción *EcoRI*, *SmaI* o *BamHI* en sus respectivos extremos 5'. De esta forma se facilitaba la posterior clonación de forma dirigida.

3.4.1.2. Transferencia de fusiones de promotor de plásmido a genoma

Las fusiones de promotor al gen *lacZ* fueron transferidas de plásmido a genoma según el método descrito por Liu y Bender, 2007. En primer lugar la fusión se subclona en el vector suicida pCB1583 (MATERIALES 2.2.1.3.) para transferirla a continuación, mediante transformación del vector recombinante, a una cepa de *K. pneumoniae* Sm^r y rbs^+ en cuyo fondo genómico se quiera estudiar la actividad promotora.

El vector pCB1583 permite la transferencia de la fusión transcripcional al genoma de *K. pneumoniae* gracias a dos propiedades. Como se explicó en MATERIALES 2.2.1.3. este vector solamente puede mantenerse en una cepa que produzca el factor π y, además, contiene los genes *rbsA'* y *rbsK'* flanqueando la fusión transcripcional, lo que permite la inserción de la fusión en el genoma mediante recombinación homóloga en el operón de la ribosa.

De esta forma, cuando se transforma una cepa de *K. pneumoniae* Sm^r y rbs^+ con el plásmido pCB1583 recombinante se produce la recombinación homóloga entre los genes *rbsA'* y *rbsK'* del plásmido y *rbsA* y *rbsK* del cromosoma bacteriano, de manera que la cepa pierde su capacidad de metabolizar el azúcar ribosa. En un primer lugar el plásmido recombinante permanece integrado en el operón *rbs*, de manera que, tras la transformación, la cepa se cultiva en sucesivos medios de selección que ejercen la presión necesaria para que la recombinación homóloga se complete, adquiriendo la fusión transcripcional y perdiendo el resto del vector. En estos medios, la selección de las cepas recombinantes se realiza analizando su fenotipo según la siguiente pauta:

rbs^- : Las cepas recombinantes no pueden metabolizar ribosa ya que el operon *rbs* es sustituido por la fusión transcripcional, de manera que sus colonias presentan color blanco en el medio McConkey Ribosa (MÉTODOS 3.1.1.).

Sm^r : En presencia de pCB1583 la cepa Sm^r se manifiesta Sm^s a través de la acción del producto del gen *rpsL* localizado en el vector (MÉTODOS 2.2.1.2.). Una vez se ha completado la recombinación homóloga, la cepa recupera la resistencia a Sm .

Km^s Ap^s : Puesto que los genes que codifican la resistencia a los antibióticos Km y Ap , localizados en el pCB1583, se pierden al producirse la recombinación homóloga, las cepas recombinantes son sensibles a este antibiótico.

PROCEDIMIENTO

1. Clonar el promotor en el vector pRS415 utilizando las dianas de restricción *EcoRI*, *SmaI* o *BamHI* e introducirlo en la cepa de *E. coli* DH5 α . Sembrar la transformación en placas de LB suplementado con Ap y X-Gal. Seleccionar colonias azules y obtener el DNA plasmídico recombinante.
2. Subclonar la fusión transcripcional en el plásmido pCB1583 a partir de pRS415 recombinante, utilizando como dianas de restricción alguna de las localizadas en la región de clonación y la diana *SacI* localizada en *lacZ*. Transformar la cepa de *E. coli* EB6193 y sembrar la en placas de LB que contengan Km y X-Gal.
3. Obtener células competentes de KC2653 y transformarlas con el plásmido pCB1583 recombinante mediante electroporación. En este caso, el sedimento celular se resuspende en 100 μ l de LB y se siembra en placas de LB suplementado con Km. Incubar durante 24h a 30°C.
4. Purificar las colonias resultantes de la transformación en LB suplementado con Km. Incubar durante 12-16h a 30°C.
5. Purificar colonias Km^r en placas de McConkey Ribosa. Incubar durante 12-16h a 30°C.
6. Purificar tanto colonias rojas como colonias blancas, ya que todavía no se ha completado la recombinación homóloga entre el vector pCB1583 recombinante y el operón de la ribosa tipo salvaje, en placas de LB suplementado con Sm. Incubar durante 12-16h a 30°C.
7. Purificar colonias Sm^r en placas de LB suplementado con Sm. Incubar durante 12-16h a 30°C.
8. Purificar colonias Sm^r en placas de McConkey Ribosa. Incubar durante 12-16h a 30°C.
9. Purificar colonias blancas en placas de LB suplementado con Sm. Incubar durante 12-16h a 30°C.
10. Comprobar que las colonias Sm^r son Km^s y Ap^s. La presencia de la fusión en la cepa puede comprobarse, además, mediante PCR a partir de colonia utilizando los oligos pRS415ext y pRS415seq (ANEXO 1.), localizados a 5' y 3' respectivamente de la región de clonación de pRS415.
11. Medir la actividad β -galactosidasa de las cepas que contienen la fusión integrada tal y como se detalla en MÉTODOS 3.2.6.4.

3.4.2. ENSAYOS DE RETARDACIÓN DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Los ensayos de retardación de la movilidad electroforética (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*, EMSA) permiten analizar las uniones e interacciones entre DNA y proteínas. Estas interacciones tienen una importancia fundamental en la regulación génica y en el crecimiento celular.

La técnica se basa en la diferente movilidad electroforética que presenta un fragmento de DNA cuando interacciona con una proteína: el complejo DNA-proteína ve retardada su movilidad electroforética respecto al mismo fragmento de DNA libre.

Estos ensayos pueden realizarse tanto con extractos crudos como con proteína purificada, siendo esta última la situación ideal en el estudio del papel regulador de una proteína concreta. Cuando se trabaja directamente con extractos crudos, la retardación en la movilidad puede ser debida a la unión de más de una proteína al fragmento de DNA, siendo difícil de analizar la composición del complejo multiprotéico.

3.4.2.1. Preparación de la fracción proteica

En este trabajo, los ensayos de retardación en gel se realizaron tanto con proteína purificada como con extractos crudos. La obtención de extractos crudos se realizó tal y como se explica en MÉTODOS 3.2.1. La composición del tampón utilizado es la siguiente:

Tampón de lisis

Fosfato potásico pH 7,4	100mM
KCl	50mM
EDTA pH 8,0	1mM
Glicerol	10%
DTT	1mM
PMSF	160µg/ml

La concentración proteica de los extractos crudos y de las proteínas purificadas (MÉTODOS 3.2.3.) se determinó por el método de Lowry (MÉTODOS 3.2.2.). Las muestras se guardaron a -20°C, a una concentración final de glicerol del 25%, y su caducidad depende de la estabilidad de la proteína en estudio.

3.4.2.2. Preparación del fragmento de DNA utilizado como sonda

Los fragmentos de DNA utilizados como sondas en los experimentos de retardación en gel, fueron obtenidos mediante PCR (MÉTODOS 3.3.4.) y purificados en geles de poliacrilamida (MÉTODOS 3.3.5.3.). Una vez purificados, estos fragmentos se marcaron en su extremo 5' tal y como se describe en MÉTODOS 3.3.3.5.2.. El tamaño de las sondas utilizadas en este trabajo oscila entre 100 y 400pb.

3.4.2.3. Reacción de unión DNA-proteína

La reacción de unión DNA-proteína(s) (*binding*) se llevó a cabo tal y como describieron Lane *et al.*, 1992. Las mezclas de reacción tenían un volumen final de 20µl y su composición era la siguiente:

Mezcla de reacción 1x

Tris-HCl pH 7,5	10mM
KCl	75mM
DTT	2 mM
Glicerol	10%
Poly[d(I·C)]	0,1µg
DNA	20ng
Proteína	variable ⁽¹⁾

⁽¹⁾La cantidad de proteína varía según se usen extractos crudos (5µg) o proteína purificada (0,5µg).

Para que todas las muestras tuviesen la misma concentración de sales, se igualaba el volumen con el mismo tampón utilizado para la obtención de las muestras proteicas.

Para facilitar la preparación de las muestras, se tenía preparado un tampón de hibridación 5x que contenía todos los elementos de la mezcla de reacción excepto el DNA y las proteínas.

Una vez preparadas las mezclas de reacción, éstas se incubaban a 37°C durante 15min. Después de la incubación, las muestras se guardaban en hielo hasta el momento de realizar la electroforesis.

3.4.2.4. Preparación del gel de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida utilizados para llevar a cabo la electroforesis de las mezclas de reacción se prepararon de la misma forma que los utilizados para la purificación de fragmentos de DNA, tal y como se describe en MÉTODOS 3.3.5.3., aunque con ligeras variaciones. Para evitar la distorsión de las uniones DNA-proteína a causa de las sales presentes en el medio, estos geles fueron preparados con tampón TBE 0,5x (MÉTODOS 3.3.5.3.). Además, para evitar la dispersión de los complejos retardados a lo largo del carril de siembra, los geles contenían glicerol a una concentración idéntica a la de las muestras.

Gel de poliacrilamida (ensayos de retardación)

Acrilamida: Bisacrilamida (29: 1)	5%
Glicerol	5%
Tampón de electroforesis TBE	0,5x
Persulfato amónico	0,07%
TEMED	0,07% v/v
Desgasificar filtrando al vacío (tamaño de poro 0,45µm)	

3.4.2.5. Separación electroforética de las sondas y los complejos de retardación

El desarrollo de la electroforesis se llevó a cabo a 4°C (en una cámara fría). El gel de electroforesis y el tampón de electroforesis TBE 0,5x (MÉTODOS 3.3.5.3.) eran preparados con antelación y atemperados a 4°C.

Los geles fueron sometidos a electroforesis, antes de aplicar las muestras, durante una hora a una intensidad de 20mA. Las muestras eran aplicadas en el gel sin la adición previa de tampón de carga. El tampón de carga era aplicado a un carril libre para poder seguir el desarrollo de la electroforesis. La duración de la electroforesis variaba en función del tamaño de la sonda utilizada. Una vez acabada la electroforesis el gel era secado en un secador de geles y puesto en contacto con una película de autorradiografía, a -80°C y con la ayuda de una pantalla intensificadora (HyperScreen™, Amersham).

3.5. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA

El RNA es un ácido nucléico que es degradado con mucha facilidad por acción de las RNAsas (Ehretsmann *et al.*, 1992). En todos los experimentos en los que se manipula RNA, el material y las soluciones se autoclavaban dos veces para eliminar estas enzimas. Las sustancias necesarias para realizar las diferentes soluciones nunca se pusieron en contacto con ningún recipiente que no hubiese sido autoclavado o esterilizado por calor (o/n a 200°C). Todas las soluciones se prepararon con H₂O-DEPC autoclavada dos veces.

H₂O-DEPC

DEPC (Dietilpirocarbonato)	1ml
H ₂ O desionizada	1l
Agitar o/n y autoclavar dos veces	

3.5.1. OBTENCIÓN DE RNA TOTAL

Para la obtención de RNA total se utilizó el kit comercial “Rneasy Mini Kit” (Qiagen) que proporciona un RNA de alta calidad a partir de las células procedentes de 1ml de cultivo de la cepa

deseada. Tras producirse la lisis celular, mediante la acción de la lisozima, tiene lugar la desnaturalización de proteínas celulares por acción de un tampón que contiene tiocianato de guanidina y β -ME, lo que conlleva a la inactivación de la RNasa endógena (Chirgwin *et al.*, 1979). El RNA es purificado por adsorción a la superficie de partículas de sílica-gel localizadas en una columna ("RNeasy mini columns") en presencia de concentraciones elevadas de sales caotrópicas (Vogelstein y Gillespie, 1979) que provocan una modificación de la estructura del agua. Los restos de contaminantes se eliminan mediante una serie de lavados y el RNA es eluido de la columna con H_2O .

El DNA genómico contaminante se eliminó tras la purificación con DNasa ("*DNase I Treatment*"; Ambion). El RNA obtenido por este método combinado de purificación y posterior tratamiento con DNasa es lo suficientemente puro como para poder ser utilizado en aplicaciones posteriores sin necesidad de purificaciones adicionales. La cantidad media de RNA obtenido es de $100\mu g$ por 10^9 células.

En la obtención del RNA total hay que tener en cuenta el número de células de partida, ya que éste se encuentra limitado por la cantidad de RNA ($100\mu g$) que puede unir la membrana de sílica-gel y por el número de células que pueden ser tratadas con un volumen del tampón que contiene tiocianato de guanidina y β -ME. El número máximo de células es 10^9 , lo que implica partir de 1ml de cultivo cuya densidad óptica a una longitud de onda de 600nm se encuentre entre 0,5 y 1. Adicionalmente, en el caso de *K. pneumoniae*, se ha de tener en cuenta que el polisacárido capsular disminuye la eficiencia de la lisis celular llevada a cabo por la lisozima, lo que conlleva a la obtención de un RNA de baja calidad y muy contaminado de DNA genómico. Por esta razón, para obtener RNA de buena calidad a partir de células de *K. pneumoniae*, se recomienda partir de varias muestras de 1 ml de cultivo con una densidad celular baja pero que se procesarán en la misma columna. De esta manera la eficiencia de la lisis celular aumenta, la contaminación por DNA genómico disminuye y se consigue una cantidad de RNA apropiada para futuras aplicaciones.

Separación electroforética del RNA en geles desnaturalizantes de agarosa

El RNA total obtenido fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v en tampón MOPS 1x separándose las diferentes moléculas de RNA en función de su tamaño. Como las moléculas de RNA tienen gran tendencia a formar estructuras secundarias que dificultarían su correcta separación por tamaño, el RNA fue desnaturalizado por calor previamente a la electroforesis y se incorporó formaldehído al gel a una concentración de 2,2M como agente desnaturalizante.

Al igual que en la separación electroforética de moléculas de DNA, se utilizó un marcador de fragmentos de RNA de tamaño conocido, con la finalidad de determinar el tamaño del mRNA. El marcador utilizado en este trabajo (Gibco, BRL) contiene moléculas de RNA de tamaño comprendido entre 0,24Kb y 9,49Kb.

PROCEDIMIENTO

1. Pesar y disolver por calor en tampón MOPS 1x la agarosa necesaria para una concentración final del 1% p/v.
2. Atemperar a $55^{\circ}C$ y añadir el formaldehído a una concentración final de 2,2M.
3. Extender la solución en soporte estanco de tamaño adecuado sobre el que se apoya una pieza para crear los pocillos donde se cargarán las muestras a analizar. Esperar a que la solución solidifique.
4. Preparar las muestras de RNA. Mezclar 5-10 μg de RNA total con tampón de carga para muestras de RNA (2x) en una proporción 1:1. Este tampón le proporciona a la muestra la densidad adecuada gracias al glicerol, un colorante (azul de bromofenol) que permite seguir el frente durante la electroforesis, bromuro de etidio para visualizar el ácido nucleico y agentes desnaturalizantes (formamida y formaldehído). Incubar las muestras a $70^{\circ}C$ durante 10min.
5. Sumergir el gel en tampón MOPS 1x con formaldehído al 6% p/v y cargar las muestras y 10 μl del marcador de RNA, preparado de igual modo.
6. Realizar la electroforesis a 5V/cm de gel durante 4h, hasta que el frente del tampón de carga llegue al final del gel.

TAMPÓN DE CARGA PARA RNA (2x)

Tampón de electroforesis MOPS	1 x
Formamida desionizada	50%
Formaldehído	20%
Azul de bromofenol saturado	5%
Glicerol	5%
Bromuro de etidio	0.01µg/ml

TAMPÓN MOPS (5x)

MOPS	200mM
Acetato sódico	50mM
EDTA	5mM

Ajustar a pH 7,0 con NaOH

3.5.2. ANÁLISIS DE RNA POR RT-PCR

La técnica de RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*; Sambrook *et al.*, 2001) permite determinar la expresión del gen objeto de estudio en una cepa bacteriana crecida en unas determinadas condiciones mediante la cuantificación de su mRNA específico. Esta técnica se basa en la obtención del cDNA a partir del RNA mediante la acción de la retrotranscriptasa o transcriptasa inversa y la posterior amplificación mediante PCR (MÉTODOS 3.3.4.), a partir de este cDNA, de un fragmento de DNA interno al gen cuya expresión se estudia.

PROCEDIMIENTO

1. Obtener el RNA total a partir de la cepa de estudio crecida en las condiciones más apropiadas para el mismo.
2. Desnaturalizar 1µg de RNA total mediante incubación a 70°C durante 5min.
3. Añadir: DTT (10mM), hexanucleótidos degenerados (6,25ng/µl), dNTPs (0,5mM), RNAsin (Inhibidor de RNAsas) (20U), el tampón proporcionado por la casa comercial (1x) y 200U de enzima transcriptasa inversa (M-MLVTM Reverse Transcriptase, Gibco, BRL). Incubar 1h a 37°C.
4. Realizar una reacción de PCR utilizando una pareja de oligonucleótidos internos al gen objeto de estudio y como molde el cDNA sintetizado.
5. Visualizar los productos de PCR amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5-2% p/v. Preparar y procesar en paralelo dos controles, uno en ausencia de RNA y otro en ausencia de transcriptasa inversa.

3.5.3. DETERMINACIÓN DEL INICIO DE TRANSCRIPCIÓN

Para determinar el inicio de transcripción de un gen u operón se utilizó la técnica RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*), que se basa en la síntesis y posterior secuenciación del cDNA correspondiente al gen en estudio a partir de RNA total usando un oligonucleótido complementario a la región interna del gen en cuestión y una transcriptasa reversa. Para aplicar esta técnica se utilizó el kit comercial "5'/3' RACE kit, 2nd Generation" (Roche), que permite conocer los inicios de transcripción de una manera sencilla y rápida.

En primer lugar se obtiene el cDNA de cadena sencilla a partir de RNA total usando un oligonucleótido (SP1) complementario a la región interna del gen en cuestión y la transcriptasa reversa "Transcriptor Reverse Transcriptase". En segundo lugar, este cDNA es purificado mediante el kit comercial "High Pure PCR product purification kit" (Roche), que se basa en el mismo principio explicado en MÉTODOS 3.3.5.2. En tercer lugar se procede a la incorporación de una cola de nucleótidos de adenina (poli-dA) en el extremo 3' del cDNA mediante la acción de la transferasa

“Terminal Transferase”, lo que permitirá la complementareidad con el oligonucleótido *Oligo d(T)-anchor primer* que contiene una región poli-dT rica en nucleótidos de timina (ANEXO 1.). En cuarto lugar se sintetiza el cDNA de doble cadena mediante PCR utilizando el oligonucleótido *PCR anchor primer* complementario a la cola de poli-dA y un oligonucleótido antisentido (*reverse*; SP2) localizado a 5' respecto al oligonucleótido empleado para sintetizar el cDNA de cadena sencilla. En caso de que el producto obtenido mediante esta PCR no sea totalmente específico, se puede proceder a una segunda reacción de PCR a partir del producto de la primera u empleando el mismo cebador sentido y como cebador antisentido el mismo utilizado anteriormente (SP2) u otro situado a 5' respecto a éste (SP3).

PROCEDIMIENTO

1. Llevar a cabo la técnica RACE según las indicaciones de la casa comercial (Roche).
2. Separar mediante electroforesis en gel de agarosa el producto o productos de la PCR realizada para sintetizar el cDNA de doble cadena según el protocolo descrito en MÉTODOS 3.3.5.1.
3. Purificar el fragmento de cDNA específico según el protocolo descrito en MÉTODOS 3.3.5.2.
4. Clonar el fragmento de cDNA en el vector pGEMT según las indicaciones de la casa comercial (Promega), utilizando la cepa de *E. coli* XL1-Blue y como medio de selección LB suplementado con ampicilina, X-Gal e IPTG.
5. Obtener el vector recombinante según el protocolo descrito en MÉTODOS 3.3.2.
6. Analizar el fragmento clonado mediante PCR y secuenciación (MÉTODOS 3.3.7.) utilizando los oligonucleótidos complementarios al vector proporcionados por la casa comercial.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. UTILIZACIÓN DE PURINAS Y DERIVADOS POR *K. pneumoniae*

La alantoína es uno de los metabolitos de la vía de degradación de purinas en bacterias. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio mostraron que *E. coli* es capaz de utilizar alantoína como fuente de nitrógeno únicamente en condiciones anaeróbicas (Cusa *et al.*, 1999). Algunos aislados patógenos de *K. pneumoniae*, en cambio, pueden usar este compuesto como fuente de nitrógeno y de carbono tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas mediante un sistema génico ortólogo al de *E. coli* (Chou *et al.*, 2004). Este sistema génico no está presente en la cepa de *K. pneumoniae* MGH78578, cuyo genoma ha sido secuenciado recientemente. Las condiciones en las que las enterobacterias pueden metabolizar purinas y derivados depende de la especie e incluso existe variabilidad entre cepas de una misma especie.

4.1.1. UTILIZACIÓN DE PURINAS Y SU DERIVADO ALANTOÍNA POR *K. pneumoniae*

Con la finalidad de valorar la capacidad de asimilación de los nitrógenos de las purinas por parte de *K. pneumoniae* con respecto a *E. coli*, se llevaron a cabo crecimientos aeróbicos de estas enterobacterias en medio mínimo con NH₄Cl, adenina, hipoxantina o alantoína, a concentraciones equimoleculares, como fuentes de nitrógeno. En concreto se analizaron las cepas ECL1 de *E. coli* y KC2653 de *K. pneumoniae*. El rendimiento celular se determinó mediante medida de la DO de los cultivos a 600nm en fase estacionaria. Los resultados se muestran en la TABLA 4.1.

TABLA 4.1.: Rendimiento celular (DO a 600nm) de cultivos de *E. coli* ECL1 y *K. pneumoniae* KC2653 en los que las fuentes de nitrógeno se utilizaron a una concentración equimolecular de 0,6mM. La fuente de carbono fue glucosa 0,4%. NC: No crecimiento.

CEPA	DO ₆₀₀ de cultivos con diferentes fuentes de nitrógeno			
	NH ₄ Cl	Adenina	Hipoxantina	Alantoína
<i>E. coli</i> ECL1	0,214	0,2578	NC	NC
<i>K. pneumoniae</i> KC2653	0,227	0,859	0,813	0,983

El rendimiento que alcanzan los cultivos de la cepa ECL1 de *E. coli* con adenina es el mismo que el alcanzado con NH₄Cl a una concentración equimolecular, lo que indica que esta cepa sólo es capaz de asimilar uno de los átomos de nitrógeno de este compuesto en condiciones aeróbicas (Xi *et al.*, 2000). Sin embargo, el rendimiento de los cultivos de *K. pneumoniae* KC2653 con adenina, hipoxantina o alantoína como fuentes de nitrógeno es muy superior, del orden de cuatro veces, al que se consigue con NH₄Cl a una concentración equimolecular. Este resultado sugiere que en condiciones aeróbicas *K. pneumoniae* KC2653 utiliza todos o casi todos los nitrógenos de estos compuestos. Otras cepas de *K. pneumoniae* analizadas (ATCC13882, ATCC13883 y 52145) mostraron el mismo fenotipo que la cepa KC2653.

Con el objetivo de analizar la capacidad de la cepa KC2653 de utilizar hipoxantina o alantoína como fuentes de carbono, se realizaron cultivos de esta cepa en medio mínimo con (NH₄)₂SO₄ como fuente de nitrógeno e hipoxantina o alantoína como fuente de carbono,

y en medio mínimo con hipoxantina o alantoína como únicas fuentes de carbono y nitrógeno. No se observó crecimiento alguno bajo ninguna de las condiciones analizadas. Los resultados obtenidos indican que la cepa KC2653 no puede utilizar hipoxantina o alantoína como fuentes de carbono, pero sí como fuentes de nitrógeno.

Chou *et al.*, 2004 vincularon la capacidad de asimilación de alantoína con la presencia del regulón *all* en aislados patógenos de *K. pneumoniae*. Por ello nos planteamos comprobar mediante PCR la presencia de dicho sistema génico en la cepa KC2653. Se utilizaron los cebadores 336F y 1416R diseñados por Chou *et al.* como control interno. Adicionalmente se emplearon diversas parejas de cebadores (ANEXO 1.) diseñados a partir de la secuencia del locus *all* de la cepa *K.pneumoniae* NTUH-K2044 (nº acceso AB115590) para amplificar las regiones correspondientes a los genes *allS*, *allA*, *allR*, *gcl*, *allB*, y *allD*. Para cada pareja de cebadores se ensayaron distintas Tm y concentraciones de MgCl₂ pero en ningún caso se amplificó fragmento específico alguno. El mismo resultado se obtuvo con las cepas ATCC13882, ATCC13883 y 52145. Estos resultados concuerdan con los reportados por Chou *et al.* sobre la prevalencia de este locus en el genoma de cepas de *K.pneumoniae* causantes de infecciones hepáticas. Además, sugieren que la capacidad de utilizar alantoína como fuente de nitrógeno por parte de la cepa de laboratorio KC2653 no va asociada a la presencia del regulón *all*.

El tiempo de duplicación de la cepa KC2653 en medio mínimo con glucosa 0,4% como fuente de carbono e hipoxantina 0,1% como única fuente de nitrógeno fue determinado y resultó ser de 3h 45min. En cambio, los tiempos de duplicación con un exceso de nitrógeno (GNGln) o con nitrógeno limitante (GGln) son de 44min y 1h 30min, respectivamente.

4.2. IDENTIFICACIÓN DEL SISTEMA GÉNICO *hpx* DE *K.pneumoniae* IMPLICADO EN LA UTILIZACIÓN DE HIPOXANTINA COMO FUENTE DE NITRÓGENO

Los resultados presentados hasta el momento muestran que, a diferencia de *E. coli*, la cepa no patógena de *K.pneumoniae* KC2653 es capaz de utilizar aeróbicamente hipoxantina o alantoína como fuentes de nitrógeno, pero no como fuentes de carbono, y que esta capacidad no parece estar vinculada al regulón *all*. Al inicio de este trabajo, los únicos genes de *K. pneumoniae* implicados en el metabolismo de purinas como fuentes de nitrógeno que estaban descritos, eran los pertenecientes al regulón *all* (Chou *et al.*, 2004). Sin embargo, no existían referencias relacionadas con la vía de oxidación de los precursores adenina o hipoxantina hasta alantoína. Por ello nos planteamos identificar los genes implicados en el metabolismo aeróbico de hipoxantina en esta cepa.

4.2.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE *K. pneumoniae* INCAPACES DE UTILIZAR HIPOXANTINA COMO FUENTE DE NITRÓGENO

4.2.1.1. Mutagénesis al azar mediante inserción del transposón mini-Tn5 Km

Para la obtención de mutantes al azar mediante inserción del transposón mini-Tn5 Km, se realizó una conjugación entre *E. coli* S17-1 λ *pir* pUT mini-Tn5 Km y *K. pneumoniae* KC2653 (MÉTODOS 3.1.5.). Los transconjugantes Km' de KC2653 se replicaron en placas de medio mínimo con hipoxantina como única fuente de nitrógeno y suplementadas con Km. A continuación, las colonias hipoxantina negativas se sembraron en placas con adenina o alantoína como únicas fuentes de nitrógeno, para valorar la capacidad de asimilación de

estos compuestos. En la TABLA 4.2. se muestran los fenotipos de los 4 mutantes seleccionados LC1, LC5, LC8 y LC30.

En la ruta de asimilación de adenina como fuente de nitrógeno (FIGURA 1.1) se generan hipoxantina, ácido úrico y alantoína como metabolitos intermediarios, de tal manera que un mutante que tuviese afectados alguno de los genes estructurales implicados en la oxidación de hipoxantina hasta alantoína debería presentar reducido o alterado el crecimiento en un medio con adenina como fuente de nitrógeno. Los mutantes LC1, LC5 y LC8 muestran un fenotipo en placa adenina positivo/hipoxantina negativo debido a que el amonio liberado a partir de la adenina es suficiente para permitir un crecimiento observable en placa.

4.2.1.2. Localización de la inserción mediante PCR inversa

La localización de las inserciones se realizó mediante la técnica de PCR inversa (MÉTODOS 3.3.4.3). Los fragmentos amplificados presentaban un tamaño diferente en el caso de cada mutante debido a que las inserciones se habían producido en posiciones diferentes.

Para localizar con precisión el punto de inserción de mini-Tn5 Km se procedió a la secuenciación de los productos amplificados por PCR, una vez purificados, con los mismos oligonucleótidos empleados en la PCR inversa (FIGURA 4.1.). El análisis computacional de las secuencias permitió localizar la inserción del transposón mini-Tn5 Km en los genes especificados en la TABLA 4.2.

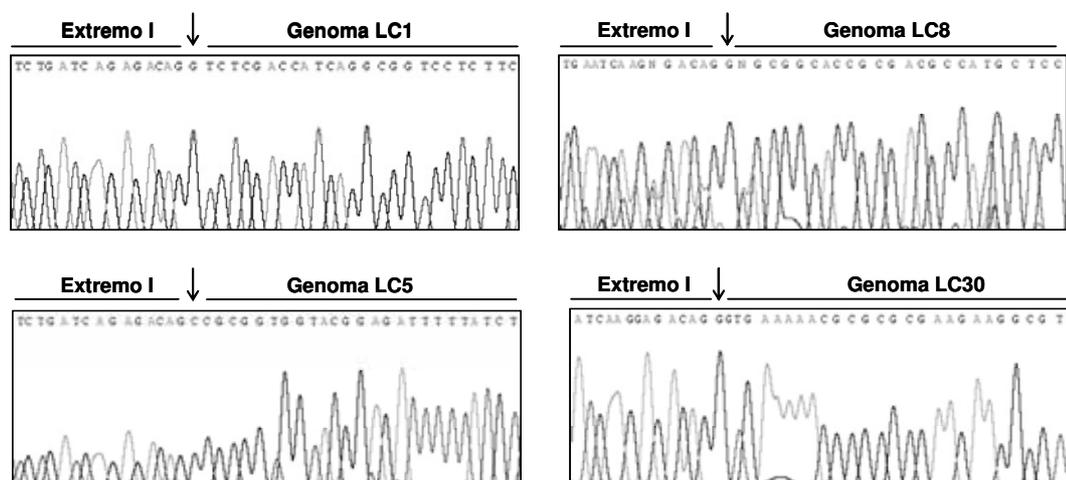


FIGURA 4.1.: Localización del punto de inserción del transposón mini-Tn5 Km en los mutantes LC1, LC5, LC8 y LC30 por PCR inversa. El DNA genómico fue aislado de las cepas mutantes y sometido a digestión por las endonucleasas de restricción *HhaI* o *TalI*. Posteriormente los productos de la digestión fueron sometidos a ligación intramolecular. La reacción de ligación se utilizó como molde en una reacción de PCR con cebadores complementarios al extremo I (oligonucleótidos miniTn5Km.ext y lminiTn5Km.int) ó al extremo O (oligonucleótidos OminiTn5Km.int y minitn5Km.ext) del transposón. Se muestran las reacciones de secuencia de los productos de PCR provenientes de las digestiones con *HhaI* en el caso de los mutantes LC1, LC5 y LC8, y de la digestión con *TalI* en el caso de LC30. La flecha indica el nucleótido del genoma adyacente al extremo I del transposón en cada mutante.

En los mutantes hipoxantina negativos LC5 y LC30 el elemento mini-Tn5 Km se encuentra insertado en genes que ya habían sido caracterizados y que están involucrados en el metabolismo general del nitrógeno. En concreto el gen *glnD* (mutante LC5) codifica uno de los componentes del sistema NTR, la UTasa-UR, y el gen *gltD* (mutante LC30) codifica una de las subunidades de la glutamato sintasa (GOGAT). Este último gen se

encuentra bajo el control de la proteína reguladora NAC (Macaluso *et al.*, 1990; Merrick y Edwards, 1995). Dichas inserciones anulan también la capacidad de utilizar alantoína como fuente de nitrógeno. Las inserciones en los mutantes hipoxantina negativos LC1 y LC8 eran de especial interés, ya que afectaban a genes que todavía no habían sido descritos y anulaban específicamente la asimilación de hipoxantina pero no de alantoína. Además, estos genes se encuentran localizados en un mismo locus que, al ser analizado computacionalmente, sugería estar implicado en la oxidación de hipoxantina.

TABLA 4.2.: Análisis fenotípico de los mutantes obtenidos por inserción de mini-Tn5 Km y localización del transposón en el genoma de cada mutante. Ade: Adenina. Hx: Hipoxantina. All: Alantoína.

MUTANTE	FENOTIPO EN PLACA	GEN AFECTADO (Nº ACCESO)	PUNTO DE INSERCIÓN
LC1	Ade ⁺ Hx ⁻ All ⁺	-	A 120 pb, a 5' del inicio de traducción de KPN_01661
LC5	Ade ⁺ Hx ⁻ All ⁻	<i>glnD</i> , uridil transferasa (KPN_00180)	A 2.099 pb del codon de inicio de la traducción
LC8	Ade ⁺ Hx ⁻ All ⁺	Probable oxidorreductasa (KPN_01661)	A 825 pb del codon de inicio de la traducción
LC30	Ade ⁻ Hx ⁻ All ⁻	<i>gltD</i> , subunidad pequeña de glutamato sintasa (KPN_03625)	A 990 pb del codon de inicio de la traducción

El fenotipo hipoxantina negativo/alantoína positivo del mutante LC8 va asociado a la mutación en un gen cuyo producto es similar a enzimas oxidativas que contienen FAD y centros ferrosulfurados (2Fe-2S), ambos cofactores típicos de XDH, lo que sugería que este gen podría codificar una subunidad de la XDH implicada en la oxidación de hipoxantina hasta ácido úrico. Desde ese momento dicho gen se denominó *hpxE*. En el mutante LC1 el transposón mini-Tn5 Km se había localizado a 5' de *hpxE*. Sin embargo esta región, a pesar de que no contiene ningún codon de parada de la traducción, no tiene ningún ORF asociado en la base de datos GenBank. El análisis computacional llevado a cabo en este trabajo reveló un posible ORF que codificaría una enzima similar a oxigenasas que también contienen centros ferrosulfurados. Dicho ORF solapa en su codon de parada con el codon de inicio de la traducción de *hpxE*. Debido a que la inserción en el mutante LC1 da lugar a un fenotipo hipoxantina negativo/alantoína positivo, se asoció dicho ORF con un posible gen al que se denominó *hpxD* que podría codificar otra subunidad de la XDH.

4.2.2. ORGANIZACIÓN GÉNICA DEL SISTEMA *hpx*

La caracterización de mutantes incapaces de utilizar específicamente hipoxantina como fuente de nitrógeno permitió identificar los genes *hpxD* y *hpxE*. En base al fenotipo que presentan los mutantes en estos genes y la similitud de los productos génicos derivados de su secuencia con proteínas implicadas en procesos degradativos, se propuso que cada uno de estos genes podría codificar una subunidad de la enzima XDH. Adicionalmente, el análisis computacional del locus donde se localizan *hpxD* y *hpxE* reveló la existencia de 5 posibles genes que podrían estar implicados en la oxidación de hipoxantina hasta alantoína. Este grupo de genes podrían constituir un sistema génico que fue denominado sistema génico *hpx*.

4.2.2.1. Secuenciación del sistema génico *hpx*

Dada la gran variabilidad fenotípica y genotípica existente entre cepas de *K. pneumoniae* se procedió a secuenciar el locus de la cepa KC2653 que contiene los genes *hpxD* y *hpxE*. Para ello se diseñaron, a partir del genoma de la cepa MGH78578 (nº acceso NC_009648), diversas parejas de oligonucleótidos complementarias al locus en estudio de tal manera que se generaran fragmentos sucesivos, solapados en sus extremos un mínimo de una 130pb y con un tamaño variable comprendido entre unas 600 y 2300pb. Como molde se utilizó DNA genómico de KC2653. Los productos de PCR se purificaron y se secuenciaron utilizando los mismos cebadores con los que se amplificó cada fragmento. Adicionalmente, en el caso de fragmentos con un tamaño superior a 600pb, se utilizaron también oligonucleótidos internos diseñados de tal manera que la distancia entre sus extremos fuera inferior a 600pb. La secuencia de todos los cebadores empleados se detalla en ANEXO 1.

En total fueron secuenciados 7453pb de la cepa KC2653 de los que 6743pb corresponden al sistema génico *hpx* (nº acceso bankit1085041 EU653284), el cual se encuentra localizado entre los genes *KPN_01660* e *hipB* del genoma de *K. pneumoniae*. El análisis computacional de esta secuencia reveló algunas diferencias con la secuencia del locus correspondiente en el genoma de la cepa MGH78578, que no afectan a la organización génica del sistema identificado. Estas diferencias se comentarán con más detalle en los apartados relativos a cada gen.

4.2.2.2. Análisis computacional del sistema génico *hpx*

La secuencia obtenida se analizó con el programa Omega v2.0. La secuencia de los ORFs identificados y la de los productos proteicos se compararon con la de proteínas conocidas mediante los programas Blast-x y Blast-p, respectivamente. De esta manera se identificaron 5 genes que, basándose en la similitud que presentan las proteínas que codifican con las presentes en las bases de datos, podrían estar implicados, junto a *hpxD* y *hpxE*, en la oxidación de hipoxantina hasta alantoína (FIGURA 4.2.). Estos genes se denominaron *hpxR*, *hpxO*, *hpxP*, *hpxQ* y *hpxT*.

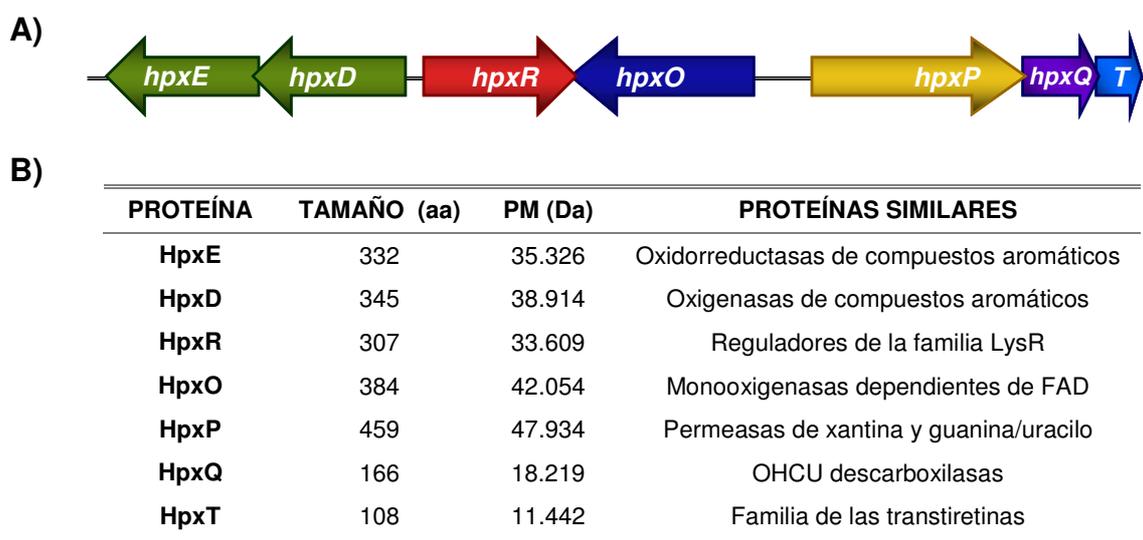


FIGURA 4.2.: Sistema génico *hpx*. Panel A: Organización génica. La longitud de cada gen se determinó mediante análisis del correspondiente ORF con los programas Omega v2.0 y Blast-x (MATERIALES 2.5.), y comparación de cada gen con los de la cepa MGH78578 disponibles en la base de datos GenBank. **Panel B: Características de los productos génicos derivados de la secuencia de los genes del regulón.** La longitud y peso molecular de los productos génicos se predijo con el programa Omega v.2. La similitud con proteínas conocidas se determinó mediante comparación de la secuencia aminoacídica, generada mediante Omega v2.0 a partir de la secuencia de cada gen, con las proteínas de la base de datos del National Center for Biotechnology Information mediante los programas Blast-x y Blast-p. OHCU: 2-oxo-4-hidroxi-4-carboxi-5-ureidoimidazolina.

Los resultados de este análisis sugieren que *hpxP* codificaría un transportador de purinas y/o derivados. Como se explicó anteriormente, *hpxD* y *hpxE* codificarían subunidades de la enzima XDH que oxida hipoxantina hasta ácido úrico. El gen *hpxO* codificaría una uricasa implicada en la oxidación de ácido úrico hasta el intermediario 5-hidroxiisourato (HIU), el cual sería transformado en alantoina por acción de las enzimas codificadas por *hpxQ* y *hpxT*. Por último, *hpxR* codificaría una proteína de la familia de reguladores LysR responsable de la regulación de dicho metabolismo.

El conjunto de estos genes, que muy probablemente estarían regulados de manera coordinada, fue denominado sistema génico *hpx*.

4.2.3. ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL SISTEMA GÉNICO *hpx*

Las regiones localizadas a 5' de cada uno de los genes se analizaron mediante el programa Neural Network Promoter Prediction, con el objetivo de identificar potenciales inicios de transcripción. El programa identificó inicios de transcripción muy probables en las regiones analizadas correspondientes a los genes *hpxD*, *hpxR*, *hpxO* y *hpxP*. Sin embargo, el programa no detectó ningún inicio asociado al gen *hpxT* y los identificados para los genes *hpxE* y *hpxQ* eran muy poco probables. En base a estos datos y a la organización génica, sugerimos la existencia de cuatro unidades transcripcionales: *hpxDE*, *hpxR*, *hpxO* y *hpxPQT*. La unidad *hpxDE* se transcribiría de manera divergente a *hpxR*, así como *hpxO* respecto a *hpxPQT*.

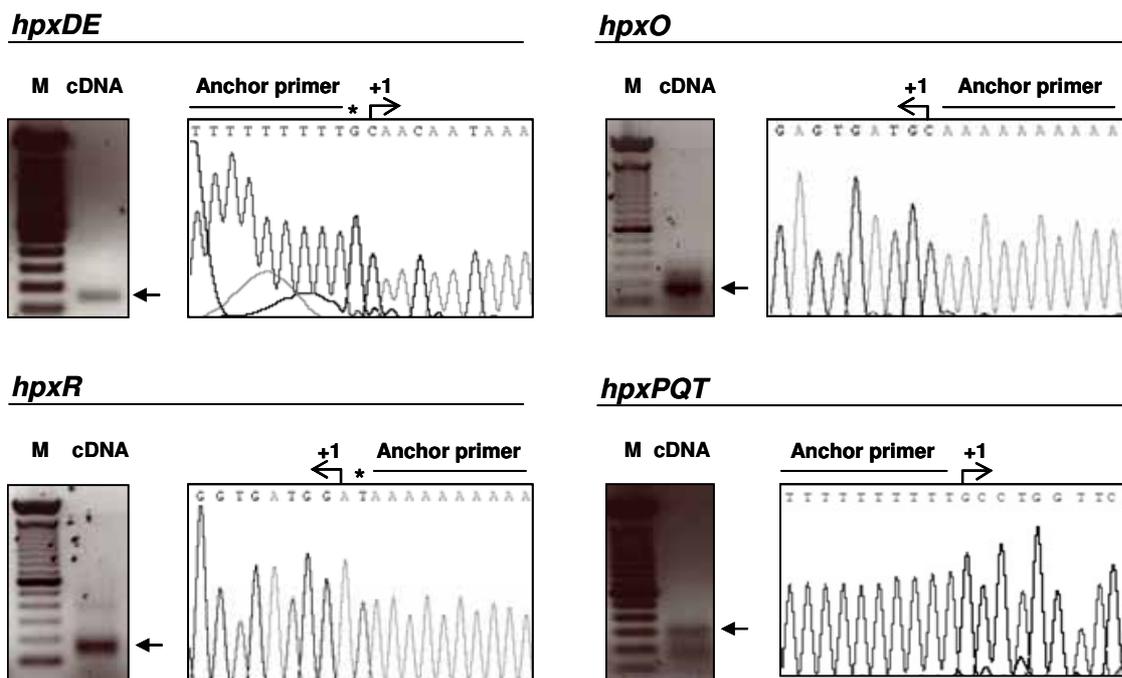


FIGURA 4.3.: Identificación de los inicios de transcripción de las unidades transcripcionales *hpxDE*, *hpxR*, *hpxO* y *hpxPQT* mediante amplificación de extremos de cDNA (RACE). El RNA total se obtuvo de cultivos de la cepa KC2653 crecidos con hipoxantina como única fuente de nitrógeno. Los fragmentos de cDNA de cadena doble se obtuvieron por PCR utilizando un cebador complementario a la cola de poliA (*PCR Anchor primer*) y un oligonucleótido complementario a la región promotora. Los fragmentos de cDNA de cadena doble fueron clonados en el vector pGEMT. Los clones obtenidos se analizaron mediante secuenciación con oligonucleótidos complementarios al propio plásmido. Se muestran las bandas correspondientes a los fragmentos de cDNA obtenidos y los resultados de la secuenciación, indicando la localización del cebador *PCR Anchor Primer* y del inicio de transcripción identificado. *: Nucleótido V del *PCR Anchor primer* (ANEXO 1).

Los inicios de transcripción se determinaron mediante la técnica RACE (MÉTODOS 3.5.3.). El RNA total provenía de cultivos crecidos con hipoxantina 0,1% como única fuente de nitrógeno. Los resultados se presentan en la FIGURA 4.3. En el caso de las unidades *hpxDE*, *hpxR* y *hpxO*, el inicio de transcripción se localizó a 40, 50 y 222pb, respectivamente, respecto al codon de inicio de la traducción correspondiente. Estas localizaciones tan sólo se diferencian en algunos pb con respecto a los inicios de transcripción más probables identificados mediante análisis *in silico*. Sin embargo, la posición +1 del operón *hpxPQT* se localizó a 151pb del codon ATG, en torno a uno de los inicios menos probables.

Seguidamente se analizó la región 5' adyacente a los inicios de transcripción, para identificar posibles cajas -10 y -35 reconocidas por la subunidad σ^{70} y secuencias de unión de la subunidad σ^{54} de la RNA polimerasa (TABLA 4.3.).

TABLA 4.3.: Cajas reconocidas por las subunidad σ^{70} o σ^{54} de la RNA polimerasa identificadas en los promotores del sistema génico *hpx*. En rojo se indican los nucleótidos idénticos a los de la secuencia consenso. Cajas σ^{70} : En negrita se indica el nucleótido localizado en la posición -10 respecto al origen de transcripción. Caja σ^{54} : En azul se indican los elementos -24 (GG) y -12 (GC). aNI: No identificado.

CAJAS σ^{70}	-10	-35	Caja σ^{54}	LOCALIZACIÓN
Consenso	TATAAT	TTGACA, a 17pb +/-1 de -10	TGGCACGGCTCTTGCT	-11
P_{hpxD}	AACAAT	TGGATG, a 18pb de -10	NI	NI
P_{hpxR}	TAGGGT	TTGTGA, a 17pb de -10	NI	NI
P_{hpxO}	TACGCT	TCCAAA, a 15pb de -10	NI	NI
P_{hpxP}	TATCGT	TCTGTA, a 16pb de -10	TTCATTAAGAACTCTA	-12

En los promotores P_{hpxD} , P_{hpxR} y P_{hpxO} se localizaron cajas -10 y -35 muy similares a la secuencia consenso y no se encontraron secuencias de unión de σ^{54} . Por ello proponemos que los promotores P_{hpxD} , P_{hpxR} y P_{hpxO} son reconocidos por σ^{70} . En el caso del promotor P_{hpxP} , se identificaron tanto cajas -10 y -35 correspondientes a un promotor σ^{70} como una secuencia de unión de σ^{54} . La caja -35 se asemeja muy poco a la secuencia consenso y, según el programa Promscan, la secuencia de unión de σ^{54} es muy poco probable. Estos datos no nos permitían proponer qué tipo de promotor es P_{hpxP} . El análisis de los promotores se ampliaría mediante estudios de regulación llevados a cabo fusiones de promotor a *lacZ* (RESULTADOS 4.4.2.3.). Por último, añadir que en los cuatro promotores, a 5' de las cajas -35, se identificaron regiones ricas en dA+dT.

4.3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL SISTEMA GÉNICO *hpx*

Tras identificar este sistema génico nos planteamos la caracterización funcional del mismo.

4.3.1. FUNCIÓN DEL OPERÓN *hpxDE* EN LA OXIDACIÓN DE HIPOXANTINA A ÁCIDO ÚRICO

Las mutaciones *hpxD::miniTn5 Km* (mutante LC1) y *hpxE::miniTn5 Km* (mutante LC8) impiden la utilización de hipoxantina como fuente de nitrógeno mientras que no afectan al metabolismo de alantoína. Además, los productos génicos de *hpxD* y *hpxE* parecen contener dominios de unión a cofactores que también son utilizados por XDH (FAD y centros

ferrosulfurados). Por ello se propuso que estos genes podrían codificar subunidades de la enzima XDH que cataliza la oxidación de hipoxantina a ácido úrico. La caracterización funcional de los productos codificados por *hpxD* y *hpxE* se abordó mediante tres aproximaciones: caracterización fenotípica de los mutantes LC1 y LC8, análisis computacional de los productos génicos de *hpxD* y *hpxE* y determinación de la actividad enzimática asociada a dichas proteínas.

4.3.1.1. Caracterización fenotípica de mutantes *hpxD*::mini-Tn5 Km o *hpxE*::mini-Tn5 Km

Para determinar en qué reacción de la vía de oxidación de hipoxantina hasta alantoína están implicados las proteínas codificadas por los genes *hpxD* y *hpxE*, se realizaron cultivos de las cepas mutantes LC1 y LC8, así como de la cepa parental KC2653, crecidos en medio mínimo con NH₄Cl, adenina, hipoxantina o ácido úrico 0,6mM como fuentes de nitrógeno y se determinaron sus rendimientos celulares.

TABLA 4.4.: Rendimientos celulares de cultivos de las cepas KC2653, LC1 y LC8 en los que las fuentes de nitrógeno se utilizaron a una concentración equimolecular de 0,6mM. NC: No crecimiento.

CEPA	DO ₆₀₀ de cultivos con diferentes fuentes de nitrógeno			
	NH ₄ Cl	Adenina	Hipoxantina	Ácido úrico
KC2653	0,227	0,859	0,813	0,863
LC1	0,213	0,242	NC	0,879
LC8	0,233	0,221	NC	0,896

Los mutantes LC1 y LC8 alcanzan con adenina el mismo rendimiento que con NH₄Cl y no pueden crecer con hipoxantina, aunque su capacidad de utilizar ácido úrico como fuente de nitrógeno es equiparable a la de KC2653 de la que derivan. Estos resultados confirman que *hpxD* y *hpxE* están implicados en la oxidación de hipoxantina hasta ácido úrico, reacción catalizada por la enzima XDH.

4.3.1.2. Análisis computacional de la secuencia de aminoácidos de HpxD y HpxE

La secuencia de los genes *hpxD* y *hpxE* y de sus productos génicos se analizó con los programas Blast-n y Blast-p.

En cuanto al gen *hpxD*, en la base de datos Genbank no se encuentra ningún ORF asociado a la región equivalente en el genoma de la cepa MGH78578. Las secuencias nucleotídicas del gen *hpxD* de la cepa KC2653 y del mismo locus en la cepa MGH78578 mantienen una identidad del 98%. Dicho locus ni siquiera contiene ningún codon de parada de la traducción. De hecho, la proteína que codificaría la secuencia de la cepa MGH78578 sólo se diferenciaría en 2aa con respecto a HpxD.

Las proteínas con las que guardan similitud HpxD y HpxE, sorprendentemente, no se corresponden con XDH, sino más bien con enzimas implicadas en la oxidación de compuestos aromáticos (TABLA 4.5.). De hecho, los productos de *hpxD* y *hpxE* son muy similares a las subunidades oxigenasa y oxidorreductasa, respectivamente, de la enzima vanillato o-demetilasa. Esta enzima está implicada en la degradación de 2,4-diclorobenzoato, compuesto perteneciente a la familia de los bifenilos policlorados, sustancias utilizadas principalmente en la producción de transformadores y altamente resistentes a la biodegradación.

TABLA 4.5. Proteínas que presentan similitud con HpxD yHpxE. La secuencia aminoacídica de los productos de *hpxD* y *hpxE* se analizó mediante el programa Blast-p.

PROTEÍNA	IDENTIDAD (%)	PROTEÍNA SIMILAR	MICROORGANISMO
HpxD	30-64	Subunidad oxigenasa de vanillato o-demetilasa.	Especies de los géneros <i>Xanthomonas</i> y <i>Acinetobaer</i> , <i>Granulibacter bethesdensis</i> , <i>Frankia alni</i> , etc...
	30-53	Proteínas <i>Rieske</i> con grupos 2Fe-2S.	Especies del género <i>Burkholderia</i> , <i>Myxococcus xanthus</i> , <i>Acidovorans avenae</i> , <i>Comamonas testoteroni</i> , etc...
HpxE	97	Probable oxidorreductasa (gen KPN_01661)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> MGH78578
	45-50	Subunidad oxidorreductasa de vanillato O-demetilasa.	Especies de los géneros <i>Xanthomonas</i> y <i>Pseudomonas</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> MGH78578 (gen KPN_02035), etc...
	40-47	Ferredoxina implicada en la transferencia de electrones.	Especies de los géneros <i>Pseudomonas</i> y <i>Burkholderia</i> , <i>Polaromonas naphthalenivorans</i> , <i>Chromohalobacter salexigens</i> , etc...
	38	Orto-benzoquinona reductasa	<i>Alcalygenes sp.</i> NyZ215
	44	Ftalato 4,5-dioxigenasa	<i>Delftia acidovorans</i>
	42	Citocromo p450	<i>Loktanella vestfoldensis</i>
	41	MnbB: 3-Nitrobenzoato dioxigenasa	<i>Comamonas sp.</i> JS46
39	ScmC: Reductasa de 2-aminobenzenesulfonato dioxigenasa.	<i>Alcaligenes sp.</i> O-1	

Las XDH típicas guardan una característica común y es que su actividad depende de la unión de centros ferrosulfurados (2Fe-2S), FAD y MoCo a distintos dominios o subunidades. Basados en la hipótesis de que los genes *hpxD* y *hpxE* codifican subunidades de la XDH, se esperaría la existencia de otro gen que codificase la subunidad que contiene el cofactor de molibdeno (MoCo). Los posibles dominios de HpxD y HpxE se analizaron mediante comparación con los presentes en la base de datos Pfam (TABLA 4.6.). Mediante este análisis no se encontró ningún dominio de unión a MoCo. Además, el dominio de unión a NAD⁺ identificado en HpxE no está relacionado con el dominio de unión a NAD⁺ presente en las XDH.

Para analizar con más detalle la similitud existente entre XDH descritas y las proteínas en estudio, se compararon las secuencias de HpxD y HpxE con las XDH de *Rhodobacter capsulatus* y *Drosophila melanogaster*, y la proteína de la misma familia aldehído oxidorreductasa de *Desulphovibrio gigas*, mediante el programa bl2seq-p. Ni el producto de *hpxD* ni el producto de *hpxE* guardan parecido alguno con las XDH mencionadas.

Con la finalidad de localizar en el genoma de *K. pneumoniae* un posible gen responsable de la subunidad de la XDH que une el MoCo, se comparó la secuencia de las XDH de *Rhodobacter capsulatus* y *Drosophila melanogaster* y aldehído oxidorreductasa de *Desulphovibrio gigas* con el genoma de *K. pneumoniae* MGH78578, mediante el programa t-Blast-n. Los resultados del análisis confirmaron que MGH78578 no posee ningún gen cuyo producto de expresión guarde relación alguna con las enzimas anteriores. Debido a que esta

cepa también posee el sistema *hpx*, este resultado podría indicar que la cepa KC2653 probablemente tampoco contiene una XDH.

TABLA 4.6. Dominios de HpxD y HpxE. La secuencia aminoacídica de HpxD y HpxE se comparó con los dominios presentes en la base de datos Pfam.

PROTEÍNA	DOMINIO	POSICIONES (aa)	CARACTERÍSTICAS
HpxD	Rieske	25 - 124	Dominio [2Fe-2S] Rieske de oxidorreductasas. Este dominio tiene un centro [2Fe-2S], en el que un átomo de hierro se encuentra coordinado a dos cisteínas conservadas y el segundo átomo de hierro se encuentra coordinado a dos histidinas conservadas. Implicado en el transporte de electrones.
	FAD_6	11-108	Dominio de unión a FAD de oxidorreductasas. Implicado en el transporte de electrones.
HpxE	NAD_1	115-209	Dominio de unión a NAD ⁺ de oxidorreductasas. Este dominio no guarda similitud con XDH, las cuales también unen FAD/NAD ⁺ . Implicado en el transporte de electrones.
	Fer2	246-323	Dominio de unión a centros de hierro y azufre [2Fe-2S]. Implicado en el transporte de electrones.

4.3.1.3. Análisis de la actividad XDH de HpxD y HpxE

Los resultados presentados hasta el momento indican que las proteínas codificadas por los genes *hpxD* y *hpxE*, a pesar de que no se asemejan a XDH, están implicadas en la oxidación de hipoxantina hasta ácido úrico.

Para profundizar en su caracterización funcional nos propusimos clonar el operón *hpxDE* con la finalidad de determinar actividad XDH de su producto de expresión. Para ello se amplificó mediante PCR a partir de la cepa KC2653 un fragmento de 2.198pb correspondiente al operón *hpxDE*, con los cebadores especificados en ANEXO 1, que fue clonado en el vector pUC19. De todos los clones obtenidos se seleccionó uno para su posterior análisis que fue denominado pLE9.

Para la determinación de la actividad XDH se procedió a obtener extractos celulares, de la cepa XL1-Blue transformada con el plásmido recombinante pLE9 o con el vector pUC19, a partir de cultivos crecidos en LB suplementado con Ap y Tc. La actividad XDH se determinó según los dos métodos descritos en MÉTODOS 3.3.6.1.1. y 3.3.6.1.2. Se utilizaron cantidades variables de los extractos celulares y diferentes concentraciones del sustrato (hipoxantina), pero en ningún caso se detectó actividad enzimática.

La similitud de HpxD y HpxE con enzimas que oxidan compuestos aromáticos, en vez de con XDH, y la ausencia de una subunidad que una el MoCo sugieren que en *K. pneumoniae* la enzima capaz de oxidar hipoxantina a ácido úrico presenta características diferentes a las XDH típicas. La ausencia de actividad XDH en los extractos celulares

ensayados puede deberse a que esta enzima requiera otros elementos o cofactores para ser funcional.

4.3.2. FUNCIÓN DE LOS GENES *hpxO*, *hpxQ* Y *hpxT*

Los resultados presentados hasta el momento indican que los productos génicos de *hpxD* y *hpxE* son los responsables de la oxidación de hipoxantina hasta ácido úrico. En base a la similitud de los productos del resto de genes estructurales con proteínas caracterizadas, propusimos que *hpxP* estaría implicado en el transporte de purinas, *hpxO* codificaría la actividad uricasa y *hpxQ* y *hpxT* participarían en la transformación de los intermediarios de la reacción de oxidación de ácido úrico hasta alantoína.

4.3.2.1. Función de *hpxO* en la oxidación de ácido úrico a alantoína

4.3.2.1.1. Análisis computacional de la secuencia de aminoácidos de HpxO

La secuencia de aminoácidos de HpxO se obtuvo con el programa Omega v2.0 a partir de la secuencia del gen *hpxO* y se utilizó para buscar proteínas similares mediante el programa Blast-p y dominios funcionales mediante comparación con los dominios de la base de datos Pfam. Los resultados del análisis se muestran en la TABLA 4.7.

TABLA 4.7. Proteínas que presentan similitud con HpxO y dominios funcionales encontrados en su secuencia . La secuencia aminoacídica de HpxO se analizó mediante el programa Blast-p y se comparó con la base de datos Pfam para encontrar dominios funcionales.

PROTEÍNA	IDENTIDAD (%)	PROTEÍNA SIMILAR	MICROORGANISMO	
HpxO	99	FAD monooxigenasa (KPN_01663)	<i>K. pneumoniae</i> MGH78578	
	32-70	FAD monooxigenasas de compuestos aromáticos	<i>Marinimonas</i> sp. MWYL1, <i>Serratia proteamaculans</i> , especies del género <i>Acinetobacter</i> , <i>Mycobacterium</i> PYR-1, <i>Burkholderia</i> , etc...	
	27-33	Salicilato hidroxilasa	<i>Sccharopolyspora erythraea</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i> , especies del género <i>Pseudomonas</i> , <i>Bordetella avium</i> , etc...	
	29-30	Salicilato monooxigenasa	<i>Burkholderia</i> , <i>Frankia</i> sp., <i>Pseudomonas</i> , etc...	
	20-30	Ceaxantina epoxidasa	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i> , <i>Ostreococcus lucimarinus</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Vitis vinifera</i> , etc...	
		DOMINIO	POSICIONES (aa)	CARACTERÍSTICAS
		FAD_3	1-340	Dominio de unión a FAD típico de monooxigenasas. Implicado en el transporte de electrones y en el metabolismo de compuestos aromáticos

Las proteínas que muestran mayor similitud con HpxO son monooxigenasas dependientes de FAD (*Flavin containing MonoOxygenases*, FMO) implicadas en la oxidación

de compuestos aromáticos (TABLA 4.8.). En menor grado, otro tipo de enzimas implicadas en los mismos procesos o en la modificación de la estructura de pigmentos fotosintéticos. Como en el caso de HpxD y HpxE, en relación a las XDH típicas, HpxO no se parece a las uricasas descritas hasta el momento. En segundo lugar, la secuencia de HpxO se comparó con cada una de las secuencias de las uricasas de *Bacillus subtilis* (NP_391125), *Aspergillus nidulans* (XP_868852), *Drosophila melanogaster* (NP_476779) y *Streptomyces coelicolor* (NP_733692) mediante el programa bl2seq-p. En ningún caso el programa detectó similitud entre HpxO y las uricasas analizadas.

Con el objetivo de comprobar si en otro locus distinto a *hpx* del genoma de *K. pneumoniae* se podría localizar algún gen que codificase una uricasa, se aplicó el programa t-Blast-n para comparar la secuencia de las uricasas anteriormente mencionadas con el genoma de la cepa MGH78578. Siguiendo esta metodología tampoco se identificó gen alguno en el genoma de *K. pneumoniae* MGH78578 que pudiese codificar una uricasa, pero se halló que el extremo amino de la uricasa de *B. subtilis* se parece a HpxQ. Este resultado se comentará en RESULTADOS 4.3.2.2.1.

HpxO contendría un dominio funcional de unión a FAD, cofactor que estaría implicado en el transporte de electrones. En ninguna de las uricasas de *B. subtilis*, *A. nidulans*, *D. melanogaster* o *S. coelicolor* se distingue un dominio de este tipo, pero la presencia de este cofactor en la proteína HpxO estaría de acuerdo con la hipótesis de una enzima que cataliza una reacción de oxidoreducción.

Para analizar la función de la proteína codificada por *hpxO*, procedimos a obtener un mutante en dicho gen y analizar su fenotipo.

4.3.2.1.2. Mutagénesis dirigida de *hpxO* por inserción del gen *kan*

El gen *hpxO* de la cepa KC2653 fue mutado mediante inserción del gen *kan*, de resistencia a Km, siguiendo la metodología descrita en MÉTODOS 3.1.6.2. Todo los cebadores utilizados se detallan en ANEXO 1.

En primer lugar, un fragmento de 2.297pb que contiene el gen *hpxO*, fue obtenido mediante PCR y clonado en el vector pKAS32. A continuación, se llevó a cabo el clonaje del gen *kan* a 365pb del codon de inicio de la traducción de *hpxO*, utilizando la diana de la enzima de restricción *MluI* localizada en dicha posición. De todos los clones obtenidos se seleccionó el clon pLOK, en el que el gen *kan* se había insertado en el mismo sentido que *hpxO*.

Seguidamente, la cepa de *E. coli* S17-1 λ *pir* fue transformada con pLOK para utilizarla como donadora en un proceso de conjugación con la cepa receptora KC2653. Al final del proceso, detallado en MÉTODOS 3.1.6.2., se seleccionaron los transconjugantes LCO2 y LCO20, los cuales mostraron un fenotipo Km^r Sm^r Ap^s. La recombinación de *hpxO* con el casete KAN-O se comprobó mediante PCR y Southern Blot.

Se realizaron dos reacciones de PCR, a partir de colonia de las cepas LCO2 y LCO20, que se diferenciaban en la pareja de cebadores utilizada. Uno de los dos cebadores en cada pareja era interno al gen *kan* del casete KAN-O (oligonucleótidos K1 y K2). En cambio, el otro cebador era externo al casete KAN-O (oligonucleótidos OM2 y OM1, respectivamente). De esta manera, solamente se obtienen productos de PCR en el caso en el que la recombinación homóloga entre *hpxO* y el casete KAN-O haya tenido lugar (FIGURA 4.4.).

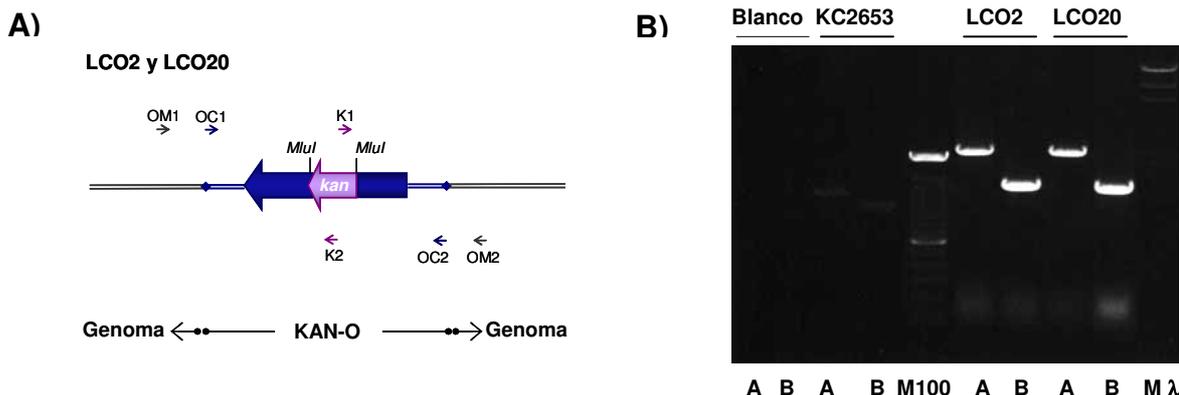


FIGURA 4.4.: Comprobación de la mutación *hpxO::kan* en los mutantes LCO2 y LCO20 mediante PCR. Panel A: Esquema que representa la localización de los oligonucleótidos utilizados. *hpxO* fue interrumpido con el gen de resistencia a kanamicina, *kan*, mediante recombinación homóloga entre *hpxO* y el casete KAN-O. OC1 y OC2 representan los cebadores utilizados para amplificar el fragmento que contiene *hpxO* y que fue clonado en pKAS32. Una diana de la endonucleasa *MluI*, localizada en *hpxO*, se utilizó para insertar el gen *kan*. OM1 y OM2 son los oligonucleótidos externos al casete KAN-O en los mutantes LCO2 y LCO20. K1 y K2: oligonucleótido internos a *kan*. Se indica la localización de las dianas *MluI*. Panel B: Comprobación por PCR de la correcta recombinación entre el gen *hpxO* y el casete KAN-O. Productos de PCR amplificados con las parejas de oligonucleótidos OM1 y K2 (carriles A), y K1 y OM2 (carriles B), con las que se amplifican fragmentos de 2.297pb y 1430pb en los mutantes LCO2 y LCO20. Se realizó un control negativo consistente en reacciones de PCR utilizando los mismos cebadores y, como molde, la cepa parental KC2653. BI: Blancos de PCR. M100: Marcador de 100pb. Mλ: Marcador λ HindIII.

En el caso de los mutantes LCO2 y LCO20 se amplificaron fragmentos específicos y únicos utilizando ambas parejas de cebadores OM1/K2 y K1/OM2. Se obtuvieron bandas inespecíficas en el control negativo, cuya amplificación se pudo deber a interacciones inespecíficas entre los oligonucleótidos y otras regiones del genoma. La correcta inserción del gen *kan* en el gen *hpxO* se confirmaría a continuación mediante Southern Blot.

El DNA genómico de las cepas KC2653 y LCO20 se sometió a digestiones simples con las endonucleasas de restricción *PvuII*, *BamHI* y *Agel* ya que la localización de las dianas de estas enzimas en el sistema génico *hpx* y en el casete KAN-O permite la obtención de fragmentos de DNA fácilmente detectables mediante Southern Blot. La detección se realizó por hibridación con una sonda de 469pb, correspondiente al extremo 5' de *hpxO*.

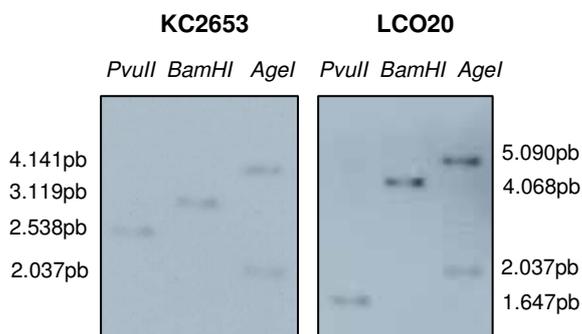


FIGURA 4.5.: Southern Blot realizado para comprobar la mutación *hpxO::kan* en la cepa LCO20. Los productos de la digestión simple del DNA genómico de las cepas KC2653 y LCA20 con las endonucleasas de restricción *PvuII*, *BamHI* y *Agel* fueron separados electroforéticamente en gel de agarosa al 1% p/v, transferidos a una membrana de nailon e hibridados con una sonda de 469pb (SO; ANEXO 1.), correspondiente al extremo 5' del gen *hpxO*, marcada con DIG-dUTP (MÉTODOS 3.3.8.). A ambos lados se especifica el tamaño de los fragmentos.

En el caso de los productos de la digestión del DNA genómico con *PvuII*, debido a que el fragmento *kan* contiene dos dianas *PvuII*, la diferencia entre el patrón de las cepas KC2653 y LCO20 reside en que el fragmento detectable del mutante es de un tamaño menor que el de KC2653. Respecto al resto de digestiones, la diferencia entre KC2653 y LCO20 radica en que los productos de las digestiones son 949pb mayores en el caso del mutante debido a la inserción del gen *kan* (FIGURA 4.5.).

4.3.2.1.3. Caracterización fenotípica del mutante *hpxO::kan*

Con el objetivo de averiguar si las cepas LCO2 y LCO20 eran, en efecto, incapaces de utilizar ácido úrico como fuente de nitrógeno, se realizaron crecimientos de las cepas KC2653, LCO2 y LCO20 en placas de medio mínimo con ácido úrico o alantoína como fuentes de nitrógeno. La cepa KC2653 mostró un fenotipo ácido úrico positivo/alantoína positivo, mientras que los mutantes LCO2 y LCO20 mostraron un fenotipo ácido úrico negativo/alantoína positivo. Este hecho confirma que la función uricasa en LCO2 y LCO20, a diferencia de lo que ocurre en la cepa parental KC2653, se encuentra alterada.

A pesar de que HpxO no muestra similitud con uricasas conocidas, la mutación en *hpxO* por inserción del gen de resistencia a kanamicina demuestra que, efectivamente, *hpxO* está implicado en la transformación de ácido úrico a alantoína. Por esta razón nos planteamos determinar la actividad uricasa del producto del gen *hpxO*.

4.3.2.1.4. Análisis de la actividad uricasa de HpxO

Para determinar la actividad uricasa de HpxO, nos propusimos clonar el gen *hpxO* y determinar la actividad uricasa de su producto de expresión. Para ello se amplificó mediante PCR a partir de la cepa KC2653 un fragmento de 1.386pb correspondiente al gen *hpxO* que fue clonado en el vector pUC19. Los cebadores empleados se detallan en ANEXO 1. De todos los clones obtenidos se escogió un clon denominado pLE12 para su posterior análisis.

Para la determinación de la actividad uricasa se procedió a obtener extractos celulares de la cepa XL1-Blue transformada con pUC19 y con el clon pLE12 a partir de cultivos crecidos en de LB suplementado con Ap y Tc. La actividad uricasa se determinó según el procedimiento detallado en MÉTODOS 3.3.6.1.3. Se utilizaron cantidades variables de los extractos celulares y diferentes concentraciones del sustrato ácido úrico, pero en ningún caso se detectó actividad enzimática.

Como en el caso de los productos génicos de *hpxD* y *hpxE*, la proteína codificada por *hpxO* no se parece a las uricasas que típicamente catalizan la reacción en la que hemos demostrado que este gen está implicado. Este hecho sugiere que HpxO podría necesitar algún requerimiento para llevar a cabo su función que no se encontraba en las muestras de reacción ensayadas.

4.3.2.2. Función de *hpxQ* y *hpxT* en la oxidación de 5-hidroxiisourato (HIU) a alantoína

4.3.2.2.1. Análisis computacional de la secuencia de aminoácidos de HpxQ y HpxT

Los resultados obtenidos muestran que el gen *hpxO* está implicado en la oxidación de ácido úrico. Es posible que HpxO catalice concretamente la transformación de ácido úrico al intermediario 5-hidroxisourato (HIU). Esta hipótesis se basa en la existencia de los genes *hpxQ* y *hpxT*, cuyo caracterización en este trabajo se ha realizado de un modo preliminar mediante análisis *in silico*.

La secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas por *hpxQ* y *hpxT* se obtuvo gracias al programa Omiga v2.0. Estas secuencias se compararon con las de proteínas conocidas mediante el programa Blast-p (RESULTADOS 4.2.2.2.). Los resultados (FIGURA 4.2.) muestran que HpxQ se asemeja a 2-oxo-4-hidroxi-4-carboxi-5-ureidoimidazolina (OHCU) descarboxilasas y HpxT a proteínas de la familia de las transtiretinas implicadas en la hidrólisis de HIU. Cuando se buscaron genes codificadores de uricasas, mediante comparación de la secuencia de aminoácidos de uricasas conocidas con todos los posibles ORFs del genoma de MGH78578, se halló que el extremo amino de PucL de *B. subtilis* es similar a HpxQ (RESULTADOS 4.3.2.1.1.). Esa región de PucL no está implicada en la catálisis de la oxidación de ácido úrico y también es similar a OHCU descarboxilasas.

La proteína HpxT de la cepa KC2653 es idéntica a la proteína equivalente de la cepa MGH78578 (codificada por el gen KPN_01666). En cambio, HpxQ de la cepa KC2653 mantiene una identidad del 96% con respecto a la equivalente en la cepa MGH78578 (codificada por el gen KPN_01665).

Basados en este análisis, proponemos que HpxO cataliza la transformación de ácido úrico a 5-hidroxiisourato, HpxT hidroliza este intermediario generando 2-oxo-4-hidroxi-4-carboxi-5-ureidoimidazolina (OHCU), el cual es transformado a alantoína gracias a la actividad OHCU descarboxilasa de HpxQ.

4.3.3. FUNCIÓN DE *hpxP* EN EL TRANSPORTE DE PURINAS

Hasta el momento hemos realizado estudios preliminares en la caracterización de los genes estructurales del sistema *hpx* implicados en la oxidación de hipoxantina hasta ácido úrico (operón *hpxDE*) y de este último compuesto a alantoína (genes *hpxO*, *hpxQ* y *hpxT*). Para continuar con el proceso de asignación de función a este sistema génico, nos propusimos caracterizar la función de *hpxP*, gen que podría estar implicado en el transporte de purinas al interior celular.

4.3.3.1. Análisis computacional de la secuencia de aminoácidos de HpxP

El análisis computacional de la proteína HpxP reveló una similitud muy elevada con transportadores de nucleobases (FIGURA 4.2.). El porcentaje de identidad entre la proteína de la cepa KC2653 y de la cepa MGH78578 es del 99%. Según los datos disponibles en GenBank, la proteína de la cepa MGH78578 estaría codificada por el gen KPN_01664 y estaría implicada en el transporte de las purinas xantina y guanina. En cambio, HpxP mantiene alrededor de un 50% de identidad con transportadores de xantina y ácido úrico de diversos organismos. Al comparar la secuencia de aminoácidos del producto génico de *hpxP* con los dominios de la base de datos Pfam, se identificó un dominio implicado en el transporte de xantina y uracilo (Xan_ur_permease), que estaría comprendido entre los aminoácidos 20 a 409. Este dominio también se encuentra en transportadores característicos de la familia NAT (Nucleobase-Ascorbate Transporter; de Koning y Diallinas, 2000), por lo que HpxP también podría pertenecer a esta familia.

El resto de genes estructurales del sistema *hpx* están implicados en la oxidación de hipoxantina a alantoína. En concreto los genes *hpxQ* y *hpxT*, que forman parte del operón *hpxPQT*, estarían implicados en la oxidación del intermediario hidroxisourato a alantoína. Por ello nos planteamos la hipótesis de que *hpxP* codifique un transportador de xantina y ácido úrico. Para confirmar el papel de la proteína codificada por *hpxP* en el transporte de purinas, procedimos a obtener un mutante en dicho gen.

4.3.3.2. Mutagénesis dirigida de *hpxP* por inserción del gen *kan*

En una primera etapa en el proceso de construcción del casete KAN-P, el gen *hpxP* fue clonado en el vector pUC18Not y subclonado posteriormente en el plásmido pKAS32 como un fragmento *NotI*. Todos los cebadores empleados se detallan en ANEXO 1.

En otros procedimientos experimentales llevados a cabo en nuestro laboratorio se había obtenido un clon del gen *hpxP* en el vector pBR322. El fragmento *hpxP* utilizado para construir el casete KAN-P en pUC18Not se obtuvo a partir de dicho clon mediante digestión con las enzimas apropiadas. Para interrumpir el gen *hpxP* con el gen *kan*, se utilizó la diana *SphI*, localizada a 255pb a 3' del inicio de traducción de *hpxP*. En el clon seleccionado, el gen *kan* se había inertado siguiendo la misma orientación que *hpxP*. A continuación, el casete KAN-P se obtuvo mediante digestión con *NotI* del vector recombinante pUC18Not KAN-P y fue clonado en el plásmido pKAS32. Tras las comprobaciones pertinentes se seleccionó el clon pLPK.

Una vez obtenido el plásmido pLPK, se procedió de la misma manera que en la mutagénesis dirigida de *hpxO* (RESULTADOS 4.3.2.1.2.). Se seleccionaron los transconjugantes Km^rSm^rAp^s LCP6 y LCP8. La mutagénesis de *hpxP* se comprobó tal y como se describe a continuación.

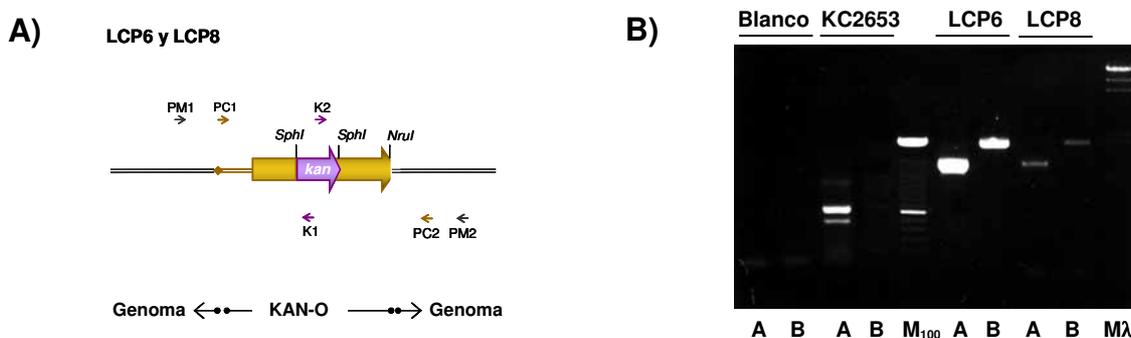


FIGURA 4.6.: Comprobación de la mutación *hpxP::kan* en los mutantes LCP6 y LCP8 mediante PCR. Panel A: Esquema que representa la localización de los oligonucleótidos utilizados. El gen *hpxP* fue interrumpido con el gen de resistencia a kanamicina, *kan*, mediante recombinación homóloga entre *hpxP* y el casete KAN-P. PC1 y PC2 representan los cebadores utilizados para amplificar el fragmento que contiene *hpxP* y que fue clonado en el vector pBR322. El fragmento *hpxP* se obtuvo mediante digestión con *EcoRI* y *NruI* del clon pBR322 *hpxP* para subclonarlo en el vector auxiliar pUC18Not. Una diana de la endonucleasa *SphI* localizada en *hpxP* se utilizó para insertar el gen *kan* con el objetivo de construir el casete KAN-P. El casete KAN-P se subclonó en pKAS32 utilizando las dianas *NotI* de los vectores pUC18Not y pKAS32. PM1 y PM2 son los oligonucleótidos externos al casete KAN-P en los mutantes LCP6 y LCP8. K1 y K2: oligonucleótido internos a *kan*. Se indica la localización de las dianas *SphI* y *NruI*. **Panel B: Comprobación por PCR de la correcta recombinación entre el gen *hpxP* y el casete KAN-P.** Productos de PCR amplificados con las parejas de oligonucleótidos PM1 y K1 (carriles A), y K2 y PM2 (carriles B), con las que se amplifican fragmentos de 1.455pb y 2.018pb en el caso de los mutantes LCP6 y LCP8. Se realizó un control negativo consistente en la cepa parental KC2653. BI: Blancos de PCR. M₁₀₀: Marcador de 100pb. Mλ: Marcador λ HindIII.

La interrupción de *hpxP* por el gen *kan* en los transconjugantes LCP6 y LCP8 se comprobó en primer lugar mediante PCR siguiendo el mismo esquema aplicado para la comprobación de la mutación *hpxO::kan* (RESULTADOS 4.3.2.1.2.). En este caso, los cebadores externos al casete KAN-P fueron PM1 y PM2 (FIGURA 4.6.). Con las parejas de cebadores utilizadas, solamente se amplificaron fragmentos específicos y únicos en el caso de los mutantes LCP6 y LCP8. En el caso de la cepa KC2653, usada como control negativo, se detectaron fragmentos inespecíficos. Para confirmar la inserción correcta del gen *kan* en el gen *hpxP*, se realizó además un Southern Blot.

El DNA genómico de las cepas KC2653 y LCP6 fue digerido con las endonucleasas de restricción *PvuII*, *BamHI* o *AgeI*. El tamaño de los productos de estas digestiones, detectables mediante hibridación con la sonda utilizada, varía de la cepa KC2653 a LCP6 tal

y como se muestra en la FIGURA 4.7. El fragmento *PvuII* correspondiente al mutante LCP6 es de menor tamaño que el de la cepa KC2653 debido a la existencia de dianas de esta enzima en el gen *kan*. En el caso de los productos de la digestión con *BamHI*, el correspondiente a un longitud menor aumenta de tamaño en LCP6 debido a que incluye el gen *kan*. Lo mismo ocurre con el único fragmento detectable en el caso de la digestión con la enzima *AgeI*.

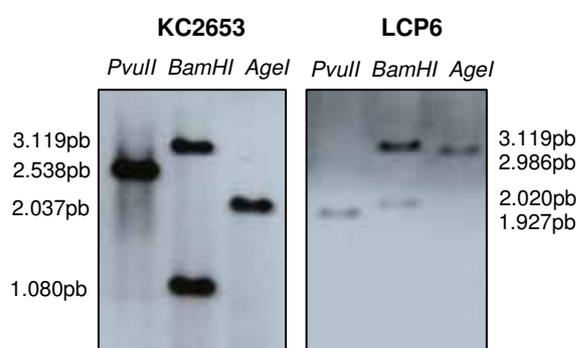


FIGURA 4.7.: Southern Blot realizado para comprobar la mutación *hpxP::kan* en la cepa LCP6. Los productos de la digestión simple del DNA genómico de las cepas KC2653 y LCP6 con las endonucleasas de restricción *PvuII*, *BamHI* y *AgeI* fueron separados electroforéticamente en gel de agarosa al 1% p/v, transferidos a una membrana de nailon e hibridados con una sonda de 465pb (SP; ANEXO 1.), correspondiente al extremo 5' del gen *hpxP*, marcada con DIG-dUTP (MÉTODOS 3.3.8.). A ambos lados se especifica el tamaño de los fragmentos.

4.3.3.2.1. Caracterización fenotípica del mutante *hpxP::kan*

Una vez confirmada la interrupción de *hpxP* por el gen *kan* en el mutante LCP6, nos propusimos comprobar cómo afectaba dicha mutación a la capacidad de utilización de purinas como fuentes de nitrógeno. Para ello analizamos los rendimientos celulares de cultivos de KC2653 y LCP6 en fase estacionaria realizados en medio mínimo con NH_4Cl , adenina, hipoxantina, ácido úrico o alantoína como fuentes de nitrógeno (TABLA 4.8.). Los resultados muestran que la carencia en LCP6 del transportador codificado por *hpxP* no afecta al transporte de los compuestos analizados, ya que los rendimientos celulares del mutante LCP6 con cualquiera de éstos son iguales que los de la cepa parental.

TABLA 4.8.: Rendimientos celulares de cultivos de las cepas KC2653 y LCP6 en los que las fuentes de nitrógeno se utilizaron a una concentración equimolecular de 0,6mM.

CEPA	DO ₆₀₀ de cultivos con diferentes fuentes de nitrógeno				
	NH ₄ Cl	Adenina	Hipoxantina	Ácido Úrico	Alantoína
KC2653	0,227	0,859	0,813	0,863	0,983
LCP6	0,245	0,833	0,903	0,83	0,8

Para profundizar en el análisis del fenotipo del mutante LCP6, nos preguntamos si la mutación *hpxP::kan* podría tener un efecto cuantificable en la fase inicial del crecimiento con hipoxantina como fuente de nitrógeno. Para ello se realizaron cultivos del mutante LCP6 y de la cepa KC2653 en medio mínimo con hipoxantina 0,1% como fuente de nitrógeno y se realizaron medidas de la DO a 600nm en las primeras fases del crecimiento. En este caso tampoco se apreciaron diferencias entre el mutante y la cepa parental. Estos resultados sugieren que el transporte de purinas llevado a cabo por otras permeasas celulares en el mutante LCP6, es suficiente como para permitir su crecimiento en un medio con purinas como únicas fuentes de nitrógeno.

4.3.3.3. Función de HpxP en el transporte de hipoxantina

Varios trabajos describen cómo el transporte de purinas está inducido en células que han crecido en condiciones limitantes de nitrógeno (Schultz *et al.*, 2001; Gorfinkiel *et al.*, 1993). Por esta razón nos propusimos analizar tal proceso en cultivos de la cepa KC2653 crecidos en GGln (limitación de nitrógeno) y, a efectos comparativos, en GNGln (exceso de nitrógeno) aplicando la metodología descrita en MÉTODOS 3.2.5. Debido a que en el momento en el que se estaba llevando a cabo la caracterización funcional del gen *hpxP* no se encontraban en el mercado ni xantina ni ácido urico marcados radioactivamente, el sustrato utilizado fue [³H]-hipoxantina. Como muestran los resultados presentados en la FIGURA 4.8.A., el transporte de hipoxantina era superior en las células que habían crecido bajo limitación de nitrógeno. En células que habían crecido con un exceso de nitrógeno, el transporte de hipoxantina era menor y, además, se saturaba antes.

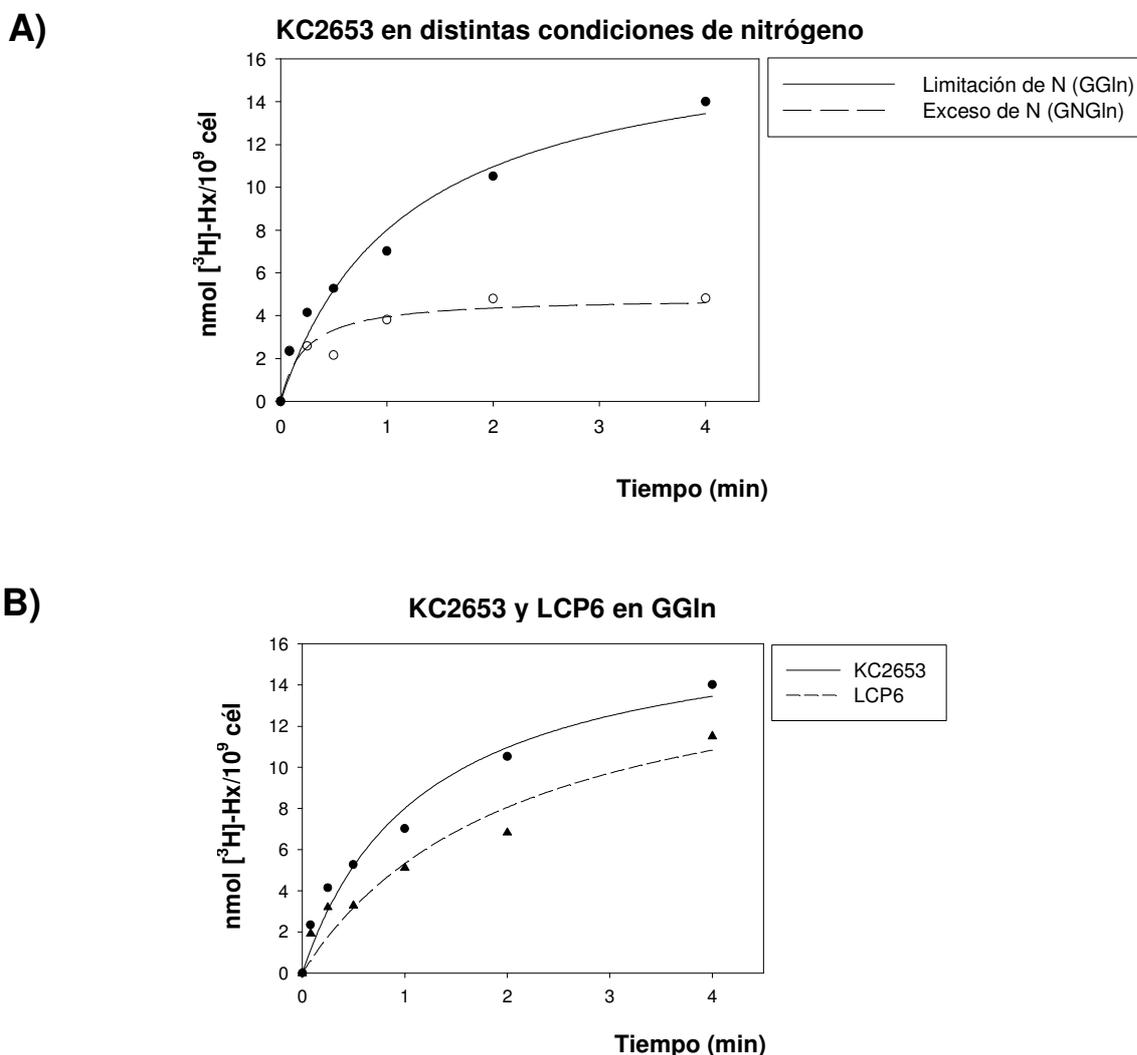


FIGURA 4.8.: Transporte de [³H]-Hipoxantina. Panel A: Cepa KC2653 crecida en GGln y GNGln. Panel B: Cepas KC2653 y LCP6 crecidas en GGln. La cinética de tiempo del transporte de [³H]-hipoxantina (20 μM) se realizó a 30°C con células recogidas al final de la fase exponencial de crecimiento. Los resultados están expresados como nanomoles de [³H]-hipoxantina retenidos por 10⁹ células.

Para analizar el efecto de la mutación *hpxP::kan* de la cepa LCP6 sobre el transporte de hipoxantina, se realizaron ensayos de transporte de [³H]-hipoxantina a partir de cultivos de ambas cepas crecidos en GGln (FIGURA 4.8.B.). El transporte de hipoxantina en el mutante LCP6 era ligeramente menor que en la cepa parental KC2653. Así pues, la mutación en el gen *hpxP* no impide la utilización de hipoxantina como fuente de nitrógeno ni anula el transporte de este compuesto al interior celular. Estos resultados indican que el transporte de hipoxantina en el mutante LCP6 podría estar mediado por otras permeasas celulares.

4.3.4. FUNCIÓN DE *hpxR* EN LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE HIPOXANTINA COMO FUENTE DE NITRÓGENO

Hasta el momento se han presentado los resultados que han permitido la caracterización inicial de los genes estructurales del sistema *hpx*. Nos queda por asignar función al gen *hpxR*, cuyo producto génico es un regulador de la familia LysR que podría estar implicado en la regulación de este sistema génico.

4.3.4.1. Análisis computacional de la secuencia de aminoácidos de HpxR

La secuencia de aminoácidos del producto del gen *hpxR* de la cepa KC653 es idéntica a la del producto del ortólogo (KPN_01662) de la cepa MGH78578 (posible regulador LysR). Al comparar dicha secuencia con la base de datos de dominios funcionales Pfam, se hallaron 2 posibles dominios funcionales. El primero (HTH_1) se localiza en el extremo amino terminal (posiciones 5–64) y consiste en un motivo hélice-giro-hélice de unión al DNA típico de numerosos reguladores transcripcionales. El segundo (LysR_substrato), correspondiente a las posiciones 88–297 estaría implicado en la unión de posibles ligandos que modularían su actividad.

4.3.4.2. Mutagénesis dirigida de *hpxR* por inserción del gen *kan*

Como en el caso de la mutagénesis de *hpxP*, el casete KAN-R fue construido en el plásmido pUC18Not y subclonado, como un fragmento *NotI*, en el vector pKAS32. Todos los oligonucleótidos empleados se detallan en ANEXO 1.

Un fragmento de 1.127pb que contenía al gen *hpxR* fue clonado en el vector pUC18Not mediante clonaje dirigido. Para la construcción del casete KAN-R, el gen *hpxR* fue interrumpido con el gen *kan* mediante clonaje utilizando la diana de la enzima de restricción *Ascl*. Esta diana está localizada a 591pb a 3' del codon de inicio de la traducción de *hpxR*. En el clon seleccionado, el gen *kan* se había clonado en sentido opuesto al del gen *hpxR*. El casete KAN-R se obtuvo mediante digestión de pUC18Not *hpxR::kan* con *NotI* y fue clonado en el vector suicida pKAS32. Tras la comprobación del clonaje, se seleccionó el clon recombinante pLRK.

Para la transferencia de la mutación *hpxR::kan*, contenida en el casete KAN-R, al genoma de la cepa KC2653, la cepa de *E. coli* S17-1 λ pir fue transformada con pLRK y utilizada como donadora en la conjugación con KC2653. Se seleccionaron dos transconjugantes Km^rSm^rAp^s denominados LCR1 y LCR3. La correcta inserción del gen *kan* en el gen *hpxR* mediante recombinación homóloga entre *hpxR* y el casete KAN-R se comprobó nuevamente mediante PCR y Southern Blot.

Para comprobar la inserción del gen *kan* en el gen *hpxR* mediante PCR se utilizaron dos parejas de cebadores siguiendo el mismo esquema aplicado en la mutagénesis dirigida

de los genes *hpxO* y *hpxP*. Un cebador de cada pareja era complementario al gen *kan* (cebadores K2 y K1) y el otro era externo al casete KAN-R (cebadores RM1 y RM2). Los resultados se muestran en la FIGURA 4.9. En el caso de los mutantes LCP6 y LCP8 se obtienen bandas únicas y específicas. Las reacciones de PCR generaron bandas inespecíficas a partir de la cepa parental, pero la correcta inserción del gen *kan* en el gen *hpxR* se confirmaría posteriormente mediante Southern Blot.

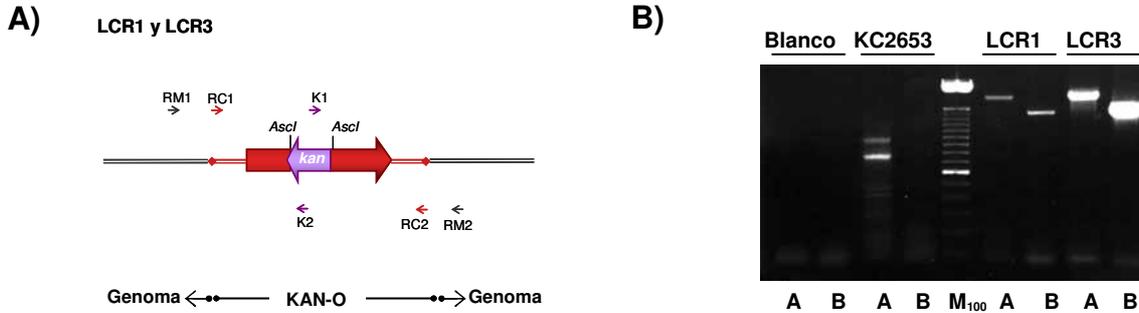


FIGURA 4.9.: Comprobación de la mutación *hpxR::kan* en los mutantes LCR1 y LCR3 mediante PCR. Panel A: Esquema que representa la localización de los oligonucleótidos utilizados. El gen *hpxR* fue interrumpido con el gen de resistencia a kanamicina, *kan*, mediante recombinación homóloga entre *hpxR* y el casete KAN-R. RC1 y RC2 representan los cebadores utilizados para amplificar el fragmento que contiene *hpxR* y que fue clonado en el vector pUC18Not. Una diana de la endonucleasa *Ascl* localizada en *hpxR* se utilizó para insertar el gen *kan* con el objetivo de construir el casete KAN-R. El casete KAN-R se subclonó en pKAS32 utilizando las dianas *NotI* de los vectores pUC18Not y pKAS32. RM1 y RM2 representan los oligonucleótidos externos al casete KAN-R en los mutantes LCR1 y LCR3. K1 y K2: oligonucleótidos internos a *kan*. Se indica la localización de las dianas *Ascl*. **Panel B: Comprobación por PCR de la correcta recombinación entre el gen *hpxR* y el casete KAN-R.** Productos de PCR amplificados con las parejas de oligonucleótidos RM1 y K2 (carriles A), y K1 y RM2 (carriles B) con las que se amplifican fragmentos 1.730pb y 1.386pb en los mutantes LCR1 y LCR3. Se realizó un control negativo consistente en la cepa parental KC2653 . BI: Blancos de PCR. M100: Marcador de 100pb.

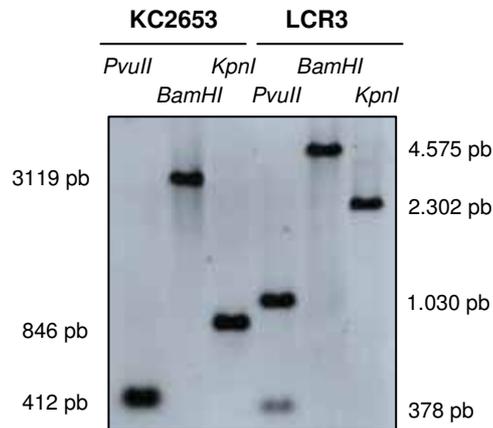


FIGURA 4.10.: Southern Blot realizado para comprobar la mutación *hpxR::kan*. Los productos de la digestión simple del DNA genómico de las cepas KC2653 y LCR3 con las endonucleasas de restricción *PvuII*, *BamHI* y *KpnI* fueron separados electroforéticamente en gel de agarosa al 1% p/v, transferidos a una membrana de nailon e hibridados con una sonda de 396pb (SR, ANEXO 1.) correspondiente con la región central de *hpxR*, marcada con DIG-dUTP (MÉTODOS 3.3.8.). A ambos lados se especifica el tamaño de los fragmentos.

El DNA genómico de las cepas KC2653 y LCR3 fue digerido con las enzimas de restricción *PvuII*, *BamHI* o *KpnI*. El tamaño de los productos de las digestiones complementarios a la sonda utilizada variaba entre una y otra cepa según muestra la FIGURA 4.9. En el caso de los fragmentos provenientes de las digestiones con *BamHI* o *KpnI*, se

observa que aquellos obtenidos a partir del DNA genómico de LCR3 son 1.456pb mayores que los obtenidos a partir del DNA genómico de KC2653. Esta longitud es la equivalente al fragmento que contiene el gen *kan*. La digestión con la endonucleasa *PvuII* genera en el mutante LCR3 dos fragmentos detectables, ya que el gen *kan* contiene dianas de esta enzima de restricción, diferentes del único fragmento *PvuII* generado a partir de KC2653.

Una vez confirmada la interrupción de *hpxR* por el gen *kan* en el mutante LCR3, nos propusimos comprobar el efecto de esta mutación en la capacidad de utilización de purinas como fuentes de nitrógeno.

4.3.4.2.1. Caracterización fenotípica del mutante *hpxR::kan*

Para comprobar el efecto de la mutación en el gen *hpxR* sobre la capacidad de utilización de purinas como fuentes de nitrógeno, se realizaron cultivos de la cepa KC2653 y el mutante LCR3 con NH_4Cl , adenina, hipoxantina, ácido úrico o alantoína como fuentes de nitrógeno, y se determinó el rendimiento celular en fase estacionaria. Los resultados se muestran en la TABLA 4.9.

El mutante LCR3 sólo es capaz de asimilar uno de los nitrógenos de la adenina y no puede utilizar hipoxantina como fuentes de nitrógeno. Sin embargo, este mutante sí puede metabolizar ácido úrico y alantoína, lo que implica una alteración de la reacción catalizada por los productos de los genes *hpxDE*. Puesto que HpxR es muy similar a reguladores de la familia LysR, estos resultados sugieren que la proteína HpxR puede actuar como regulador específico de la expresión del operón *hpxDE*. Para comprobarlo procedimos tal y como se expone en RESULTADOS 4.4.3.2.

TABLA 4.9.: Rendimientos celulares de cultivos de las cepas KC2653 y LCR3 en los que las fuentes de nitrógeno se utilizaron a una concentración equimolecular de 0,6mM. NC: No crecimiento.

CEPA	DO ₆₀₀ de cultivos con diferentes fuentes de nitrógeno				
	NH ₄ Cl	Adenina	Hipoxantina	Ácido Úrico	Alantoína
KC2653	0,226	0,859	0,813	0,863	0,983
LCR3	0,235	0,1973	NC	0,8608	0,8052

4.4. REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE HIPOXANTINA COMO FUENTE DE NITRÓGENO EN *K. pneumoniae*

Además de interesarnos en la caracterización funcional del sistema *hpx*, lo hicimos en la regulación de este sistema génico. En la bibliografía existen trabajos que describen cómo el metabolismo de determinados compuestos como fuentes de nitrógeno está sometido a una doble regulación, la llevada a cabo por el regulador del propio metabolismo y la ejercida por el sistema global del nitrógeno (García González *et al.*, 2005). Hasta el momento todos los genes descritos de *K. pneumoniae* que responden a niveles de nitrógeno requieren el sistema NTR (*NiTrogen Regulatory system*) para dicha regulación. Por ello nos planteamos estudiar si el sistema génico *hpx* está regulado por limitación de nitrógeno en *K. pneumoniae*, y si esta regulación está ejercida por el sistema NTR. Cabe destacar que mediante mutagénesis al azar por inserción de mini-Tn5 Km se obtuvieron mutantes hipoantina negativos en genes relacionados con el sistema NTR.

Por lo que respecta al sistema específico de regulación, cabe destacar que el gen *hpxR* codifica un regulador de la familia LysR. Muchos reguladores de esta familia activan la expresión del gen que se transcribe de manera divergente al gen que los codifica, el cual es reprimido por el propio regulador (Schell, 1993). De esta manera, HpxR podría activar la expresión del operón *hpxDE* y reprimir la del gen *hpxR*. En este sentido nos propusimos analizar el papel de HpxR en la regulación de las diferentes unidades transcripcionales del sistema génico *hpx*.

4.4.1. EL SISTEMA GÉNICO *hpx* ESTÁ SUJETO A UNA DOBLE REGULACIÓN

4.4.1.1. Análisis computacional de los promotores P_{hpxD} , P_{hpxR} , P_{hpxO} y P_{hpxP}

En base a las secuencias reguladoras identificadas para los inicios de transcripción de las cuatro unidades transcripcionales *hpxDE*, *hpxR*, *hpxO* y *hpxPQT*, determinados experimentalmente en RESULTADOS 4.2.3., propusimos que los promotores P_{hpxD} , P_{hpxR} y P_{hpxO} son reconocidos por la subunidad σ^{70} de la RNA polimerasa. Sin embargo, los datos obtenidos en el análisis del promotor P_{hpxP} no eran suficientes como para proponer qué factor, σ^{70} o σ^{54} , reconoce dicho promotor, ya que en él se identificaron secuencias de unión de ambos factores.

El estudio inicial de la regulación del sistema *hpx* consistió en la identificación, en las regiones promotoras P_{hpxD-R} y P_{hpxO-P} , de secuencias de unión de posibles reguladores, mediante los programas Omega v2.0, Promscan y Virtual Footprint. En base a una posible regulación del operón *hpxPQT* mediada por el sistema NTR, se buscaron secuencias de unión de NtrC (*NiTrogen Regulatory protein C*) y de la proteína NAC (*Nitrogen Assimilation Control protein*), cuya expresión es activada por el sistema NTR. Ya que la región promotora P_{hpxO-P} tiene un tamaño de 348pb, postulamos que factores que curvan el DNA podrían intervenir en la regulación de la expresión de *hpxO* o *hpxPQT*. Como mencionamos en INTRODUCCIÓN 1.2.1.1., IHF suele facilitar el contacto entre NtrC y σ^{54} (Carmona *et al.*, 1997). Por ello, se buscaron posibles secuencias de unión de este factor.

Además, ya que HpxR parece ser un regulador de la familia LysR implicado en la regulación del operón *hpxDE*, propusimos que probablemente esta proteína activa la expresión del operón *hpxDE* y reprime la expresión de su propio gen. En base a esta hipótesis, también se buscaron posibles secuencias de unión de reguladores del tipo LysR (T-N₁₁-A), correspondientes a la caja RBS (*Repressor Binding Site*), en el promotor P_{hpxD} . Los resultados de este análisis concordantes con las secuencias reguladoras identificadas en RESULTADOS 4.2.3., se muestran en la FIGURA 4.11.

Región promotora P_{hpxD-R}



Región promotora P_{hpxO-P}

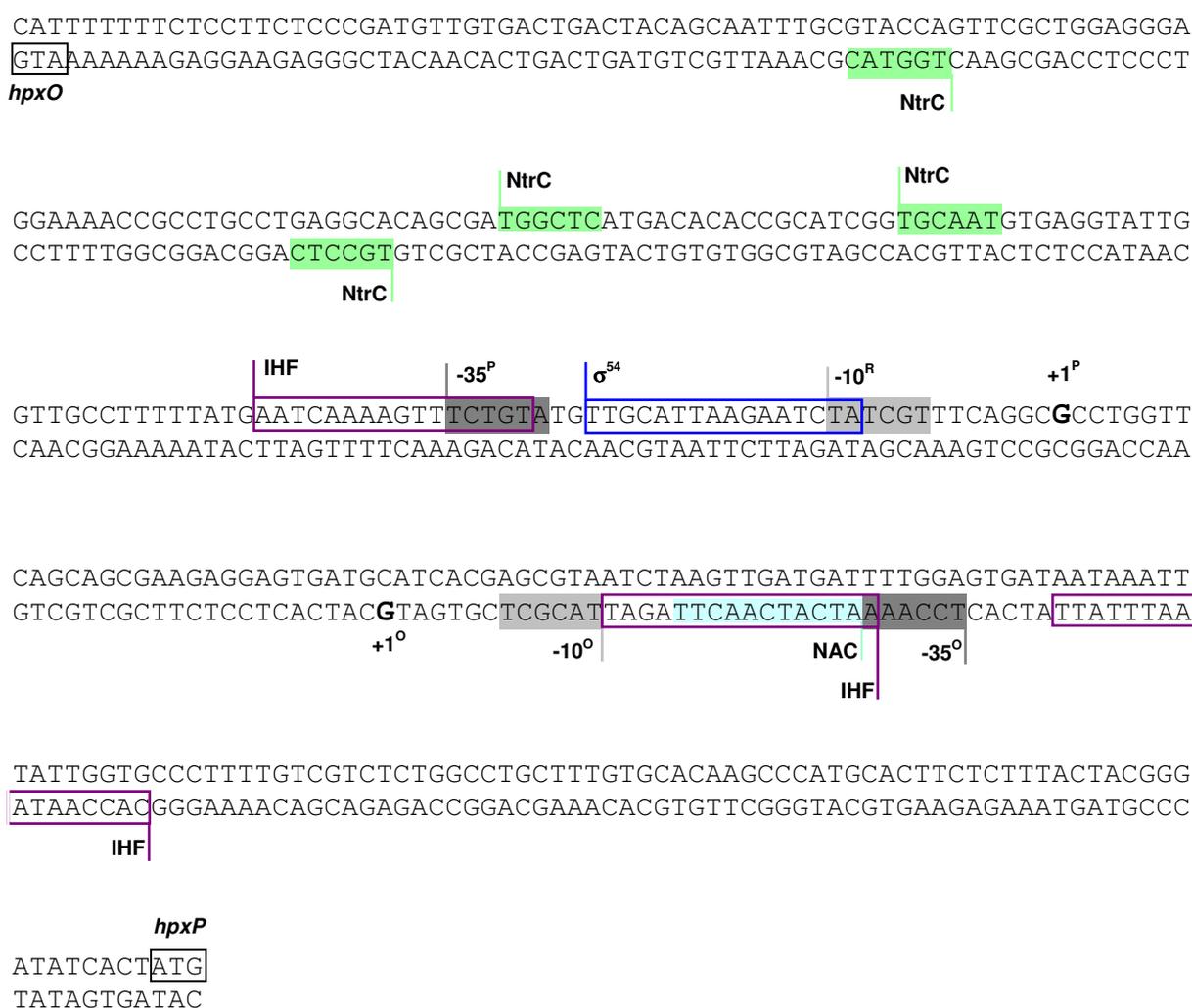


FIGURA 4.11: Identificación de las posibles secuencias de unión de NtrC, NAC e IHF en las regiones promotoras P_{hpxD-R} y P_{hpxO-PT}. Se indican los inicios de transcripción determinados experimentalmente, las cajas -10 y -35 reconocidas por σ^{70} y la secuencia reconocida por σ^{54} identificadas en RESULTADOS 4.2.3. RBS: *Repressor Binding Site* (T-N₁₁-A).

En la región intergénica P_{hpxD-R} se identificaron varias secuencias de unión de reguladores LysR en el promotor P_{hpxD} localizadas a 5' del inicio de transcripción del operón

hpxDE. Esta localización concuerda con la hipótesis de que HpxR activa la transcripción de dicho operón y reprime la expresión de su propio gen (Schell, 1993).

En la región intergénica P_{hpxO-P} se identificaron varias secuencias de unión a IHF, NtrC y una secuencia de unión a NAC. Como muestra la FIGURA 4.11. la localización de las secuencias de unión de NtrC e IHF a 5' de la caja σ^{54} , en el promotor P_{hpxP} , coincide con el modelo de regulación de promotores σ^{54} mediado por NtrC descrito en la bibliografía (Reitzer y Schneider, 2001). Además, en RESULTADOS 4.3.3.3. mostramos que el transporte de hipoxantina en la cepa KC2653 se induce en condiciones de nitrógeno limitantes. Estos resultados podría indicar que la expresión del operón *hpxPQT*, donde *hpxP* codifica un transportador de purinas, efectivamente depende de σ^{54} .

En cuanto a una posible regulación por NAC, la localización de su secuencia de unión, a 3' del inicio de transcripción de P_{hpxP} y coincidiendo con las cajas -10 y -35 del promotor P_{hpxO} , plantea una posible actividad represora de alguna de las dos unidades transcripcionales.

4.4.1.2. Análisis de la expresión del operón *hpxPQT* mediante RT- PCR

El estudio *in silico* de los promotores del sistema *hpx* permitió identificar posibles dianas del activador NtrC y de la subunidad σ^{54} de la RNA polimerasa en el promotor P_{hpxP} . Adicionalmente y como se ha mencionado anteriormente, el transporte de purinas en la cepa KC2653 se induce en condiciones limitantes de nitrógeno. Por esta razón, en una primera aproximación experimental al estudio de la regulación del sistema génico *hpx*, se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR para determinar bajo qué condiciones de nitrógeno se expresa el gen *hpxP*. La síntesis de cDNA se realizó a partir de RNA total obtenido de cultivos de KC2653 crecidos bajo distintas condiciones de nitrógeno. Los cebadores utilizados (ANEXO 1.) permitían amplificar un fragmento de 918pb interno al gen *hpxP*. Como control de normalización de los niveles de RNA se utilizó el gen del RNA ribosomal 16S.

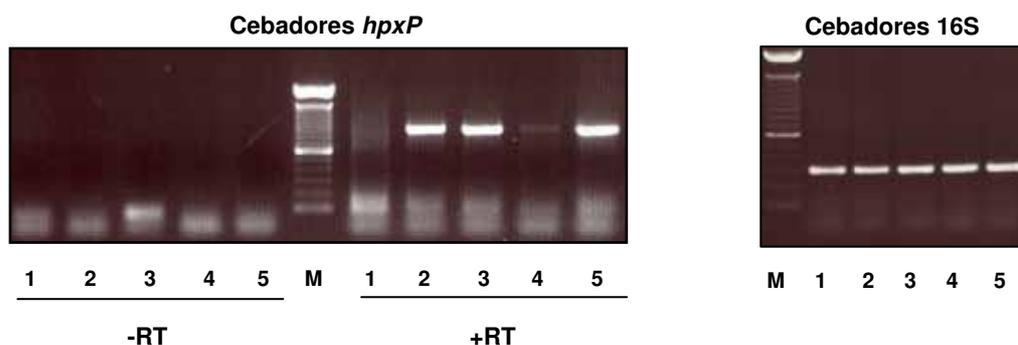


FIGURA 4.12.: Análisis de la expresión del gen *hpxP* mediante RT-PCR en distintas condiciones de nitrógeno. Se obtuvo el RNA total de cultivos de KC2653 crecidos en medios con glucosa como fuente de carbono y diferentes fuentes de nitrógeno. Como control de la contaminación por DNA genómico se procedió en paralelo con muestras a las que no se les añadió retrotranscriptasa (-RT). Como control de normalización de los niveles de RNA se utilizó el gen del RNA ribosomal 16S. M: marcador de 100pb; Carril 1: GNGln (exceso de nitrógeno); Carril 2: GAde (adenina como única fuente de nitrógeno); Carril 3: GHx (hipoxantina como única fuente de nitrógeno); Carril 4: GGln (limitación de nitrógeno); Carril 5: GGlnHx (limitación de nitrógeno en presencia de hipoxantina).

Los resultados mostrados en la FIGURA 4.12. indican que en presencia de adenina o hipoxantina, la expresión de *hpxP* está inducida (carriles 2, 3 y 5). Puesto que los genes del sistema *hpx* codifican enzimas implicadas en la oxidación de hipoxantina a ácido úrico, los inductores de este sistema podrían ser hipoxantina, xantina o ácido úrico. La asimilación de

adenina induce la expresión de *hpxP* (carril 2) probablemente a través de la formación de hipoxantina.

Se observa una clara represión en condiciones de exceso de nitrógeno (FIGURA 4.12., carril 1). En condiciones de nitrógeno limitantes y ausencia de purinas (carril 4), se observa un cierto nivel de expresión de *hpxP*, menor al obtenido cuando las purinas son la única fuente de nitrógeno (carriles 2 y 3). Estos resultados sugieren la existencia de dos tipos de regulación en la expresión de *hpxP*, uno específico por la presencia de purinas y/o metabolitos derivados, y otro mediado por niveles de nitrógeno. Estos dos niveles de regulación pueden ser seguramente extensibles a los otros genes del sistema.

4.4.2. REGULACIÓN GLOBAL POR NIVELES DE NITRÓGENO

4.4.2.1. Utilización de purinas y derivados como fuentes de nitrógeno por mutantes del sistema NTR

Puesto que los resultados preliminares obtenidos hasta el momento sugerían que el sistema génico *hpx* está regulado por niveles de nitrógeno, nos planteamos analizar si esta regulación está mediada por componentes del sistema NTR. En condiciones de nitrógeno limitantes se activa la expresión del gen *ntrC*, cuyo promotor depende de la subunidad σ^{54} (codificada por *rpoN*) de la RNA polimerasa. NtrC, a su vez, activa la expresión de genes cuyos promotores también dependen de σ^{54} , como *nac*. Por último, NAC modula la expresión de genes cuyos promotores son reconocidos por la subunidad σ^{70} de la RNA polimerasa, sirviendo como conexión entre el sistema NTR y genes dependientes de σ^{70} .

En nuestro laboratorio disponíamos de varios mutantes en el sistema global del nitrógeno procedentes del laboratorio del profesor R. Bender, en la Universidad de Michigan. En este laboratorio se realizó parte de los estudios de regulación del sistema *hpx* durante una estancia financiada por la beca BE, otorgada por la Generalitat de Catalunya. En primer lugar se analizó el efecto de mutaciones en los genes *rpoN* (cepa KC2562), *nac* (cepa KC5249) y *ntrC* (cepa KC2738) sobre la capacidad de utilizar purinas como fuentes de nitrógeno. Para ello se determinó el rendimiento celular de cultivos de estas cepas crecidos con distintas fuentes de nitrógeno (TABLA 4.10.).

TABLA 4.10.: Rendimientos celulares de cultivos de varias cepas de *K. pneumoniae*, correspondientes a mutantes en el sistema NTR, crecidos en medio mínimo con distintas fuentes de nitrógeno a una concentración equimolecular de 0,6mM. NC: No crecimiento.

CEPA	DO ₆₀₀ de cultivos con diferentes fuentes de nitrógeno		
	NH ₄ Cl	Adenina	Hipoxantina
KC2653	0,227	0,859	0,813
KC2562	NC	NC	NC
KC5249	0,2	0,636	0,86
KC2738	NC	NC	NC

Los resultados revelan que NAC no parece estar implicado en la regulación de este metabolismo, ya que la cepa KC5249 puede crecer con adenina o hipoxantina como únicas fuentes de nitrógeno, alcanzando rendimientos similares a los de la cepa parental KC2653. Sin embargo, las cepas KC2562 y KC2738 son incapaces de asimilar estos compuestos. Los genes *rpoN* y *ntrC* participan en la activación de la expresión de otros genes específicamente cuando las condiciones de nitrógeno son limitantes. Estos resultados

sugieren que σ^{54} y/o NtrC están implicados en la regulación de la asimilación de purinas como fuente de nitrógeno. Sin embargo con este tipo de estudios no es posible identificar qué genes están controlados por este tipo de regulación. Para poder definir los genes diana de este sistema de regulación se procedió a obtener fusiones transcripcionales de los diferentes promotores del sistema *hpx* y al análisis de su expresión en distintos fondos genómicos.

4.4.2.2. Actividad de los promotores del sistema génico *hpx* en distintas condiciones de nitrógeno

La implicación del sistema NTR en la regulación del sistema *hpx* se comprobó mediante el estudio de las fusiones de los promotores P_{hpxD} , P_{hpxR} , P_{hpxO} y P_{hpxP} a *lacZ*. Los cebadores que se utilizaron para amplificar mediante PCR los cuatro promotores se detallan en ANEXO 1. Las características de los fragmentos obtenidos se detallan en ANEXO 2. El análisis de la expresión de las diferentes fusiones transcripcionales se llevó a cabo en la cepa KC2653.

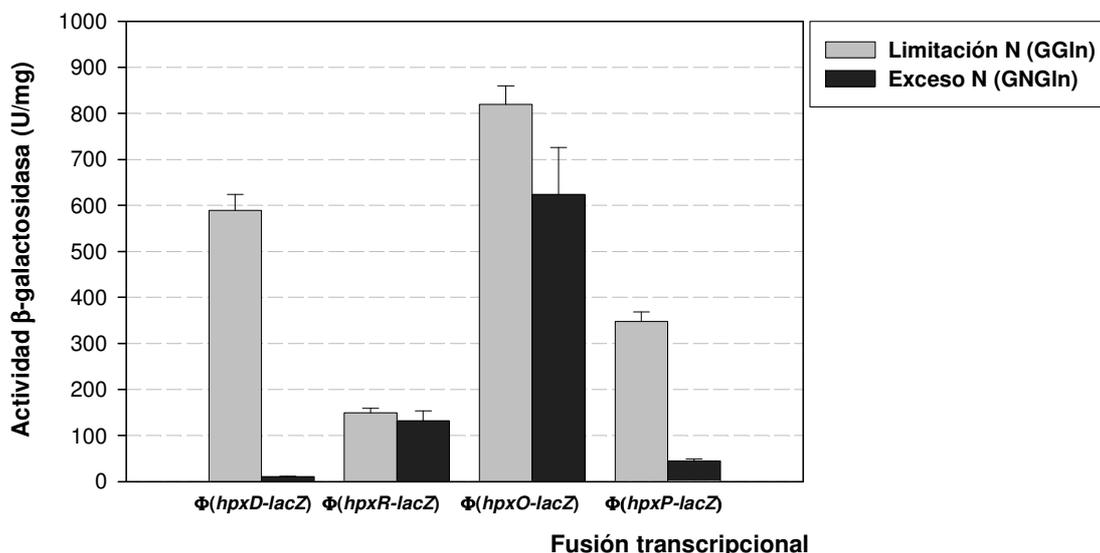


FIGURA 4.13.: Análisis de la expresión de *hpxDE*, *hpxR*, *hpxO* y *hpxPQT*, mediante fusiones transcripcionales, en condiciones de exceso o limitación de nitrógeno. Los medios de cultivo correspondientes a exceso o a limitación de nitrógeno fueron, respectivamente, GNGLn y GGln (MATERIALES 3.1.1.). Los datos de actividades β -galactosidasa se especifican en ANEXO 3.

En una primera aproximación, la actividad β -galactosidasa se determinó a partir de cultivos de KC2653 con las fusiones $\Phi(hpxD-lacZ)$, $\Phi(hpxR-lacZ)$, $\Phi(hpxO-lacZ)$ ó $\Phi(hpxP-lacZ)$ crecidos bajo un exceso (GNGLn) o limitación (GGln) de nitrógeno. La actividad β -galactosidasa en el caso de las fusiones $\Phi(hpxD-lacZ)$ y $\Phi(hpxP-lacZ)$ en GGln es 55 y 8 veces mayor, respectivamente, que en GNGLn. En cambio, los niveles de expresión de *lacZ* en GGln y GNGLn, en el caso de las fusiones $\Phi(hpxR-lacZ)$ y $\Phi(hpxO-lacZ)$, sólo mantienen pequeñas diferencias que no son significativas. Estos resultados indican claramente que la expresión de los operones *hpxD* y *hpxP* se induce en condiciones limitantes de nitrógeno.

Para comprobar si esta inducción tiene lugar a través del sistema NTR, se analizaron las fusiones $\Phi(hpxD-lacZ)$ y $\Phi(hpxP-lacZ)$ en distintos fondos genómicos correspondientes a mutantes en los genes *rpoN*, *ntrC* o *nac*.

4.4.2.3. Efecto de mutaciones en los genes *nac*, *ntrC* o *rpoN* en la actividad de los promotores del sistema génico *hpx*

Los genes *ntrC* y *nac* poseen promotores dependientes de σ^{54} . Además la proteína NtrC activa la transcripción de genes cuyos promotores también son reconocidos por esta subunidad de la RNA polimerasa. Por esta razón, en una primera aproximación se analizó el efecto de la carencia en el factor σ^{54} sobre la expresión de los operones *hpxDE* y *hpxPQT*. La cepa KC2562 contiene una mutación puntual en el gen *rpoN* (MATERIALES 2.1.). Puesto que dicha mutación no contiene ningún marcador del tipo resistencia a algún antibiótico, se descartó la posibilidad de transducir esta mutación a las cepas KC2653 $\Phi(hpxD-lacZ)$ ó KC2653 $\Phi(hpxP-lacZ)$ mediante el fago P1. La estrategia alternativa para obtener cepas con las fusiones de promotor y la mutación en el gen *rpoN* consistió en obtener un mutante espontáneo Sm^r de KC2562 para proceder a integrar en el genoma las fusiones $\Phi(hpxD-lacZ)$ ó $\Phi(hpxP-lacZ)$ siguiendo el mismo procedimiento que el descrito para la cepa KC2653 (MÉTODOS 3.4.1.2.).

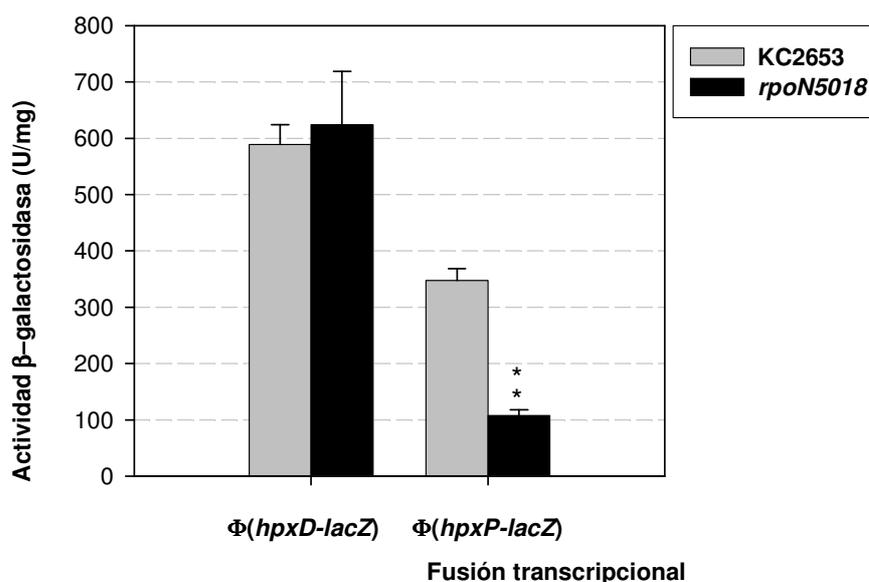


FIGURA 4.14.: Análisis de la expresión de *hpxDE* y *hpxPQT* en un mutante deficiente en la subunidad σ^{54} de la RNA polimerasa mediante fusiones transcripcionales, en condiciones limitantes de nitrógeno. Las fusiones $\Phi(hpxD-lacZ)$ y $\Phi(hpxP-lacZ)$ fueron insertadas en el genoma de la cepa KC2562 Sm^r , que contiene una mutación puntual en el gen *rpoN* (*rpoN5018*), tal y como se describe en MÉTODOS 3.4.1.2. El medio de cultivo utilizado fue GGIn. El nivel de significación para la comparación de actividades β -galactosidasa en el caso de la fusión $\Phi(hpxP-lacZ)$ es de $p < 0,001$. Los datos de actividades β -galactosidasa se especifican en ANEXO 3.

A continuación se procedió a analizar la expresión de las fusiones $\Phi(hpxD-lacZ)$ y $\Phi(hpxP-lacZ)$ en el fondo de la cepa mutante *rpoN*, a través de la determinación de la actividad β -galactosidasa de cultivos crecidos en condiciones limitantes de nitrógeno (GGIn). En este caso no se realizaron cultivos en condiciones de exceso de nitrógeno ya que, en estas condiciones, el sistema NTR se encuentra reprimido. Como control se ensayaron en paralelo las misma fusiones en el fondo de la cepa KC2653. Los resultados presentados en

la FIGURA 4.14. muestran que la mutación *rpoN* no modifica el nivel de expresión de $\Phi(hpxD-lacZ)$, lo que indica que el operón *hpxDE*, a pesar de inducirse en condiciones de nitrógeno limitantes, no se encuentra bajo el control del sistema NTR. Este resultado sugiere que otros componentes del sistema global del nitrógeno, distintos a los que forman parte del sistema NTR, participan en la activación del operón *hpxDE* cuando las condiciones de nitrógeno son limitantes.

Los niveles de actividad β -galactosidasa de la fusión $\Phi(hpxP-lacZ)$ en la cepa mutante en el gen *rpoN* son significativamente un tercio de los expresados en la cepa con el gen *rpoN* salvaje. Este dato sugiere que el promotor P_{hpxP} , o el promotor de un posible activador de la expresión de este operón, es reconocido por la subunidad σ^{54} cuando las concentraciones de nitrógeno son limitantes.

Para comprobar si NAC o NtrC están implicados en la activación dependiente de σ^{54} del operón *hpxPQT*, se procedió a analizar la fusión $\Phi(hpxP-lacZ)$ en fondos genómicos mutantes en los genes *nac* o *ntrC*. Las mutaciones *nac-2* y *ntrC2::Tn5-131* fueron transducidas desde las cepas KC5249 y KC2738, respectivamente, a la cepa KC2653 $\Phi(hpxP-lacZ)$. Para corroborar que el sistema NTR no está implicado en la regulación del operón *hpxDE*, se procedió en paralelo con la cepa que contiene la fusión $\Phi(hpxD-lacZ)$.

El operón *ure*, implicado en la utilización de urea como fuente de nitrógeno, es activado por NAC en condiciones limitantes de nitrógeno. La expresión del gen NAC, a su vez, es activada en tales condiciones por NtrC. Ya que las mutaciones en los genes *nac* o *ntrC* generan una pérdida o disminución de la actividad ureasa (Macaluso *et al.*, 1990), las mutaciones *nac-2* y *ntrC::Tn5-131* transferidas a las cepas que contenían las fusiones de promotor fueron comprobadas mediante determinación esta actividad. Se utilizaron como controles de la actividad las cepas KC2653, KC5249 y KC2738. Los resultados se muestran en la TABLA 4.11. De acuerdo con los datos existentes en la bibliografía (Liu y Bender, 2007) la actividad ureasa de los mutantes en los genes *nac* o *ntrC* es aproximadamente una décima parte de la actividad en una cepa tipo salvaje para estos genes.

TABLA 4.11.: Comprobación de la transducción de las mutaciones *nac-2* ó *ntrC2::Tn5-131* a la cepa KC2653 que contiene la fusión $\Phi(hpxD-lacZ)$ ó $\Phi(hpxP-lacZ)$, mediante determinación de la actividad ureasa. La actividad ureasa se determinó tal y como se detalla en MÉTODOS 3.2.6.3.

CEPA	ACTIVIDAD UREASA (U/mg)
KC2653	613,48
KC5249	67,4
$\Phi(hpxD-lacZ)$ <i>nac-2</i>	55,18
$\Phi(hpxP-lacZ)$ <i>nac-2</i>	40,62
KC2738	77,36
$\Phi(hpxD-lacZ)$ <i>ntrC2::Tn5-131</i>	71,18
$\Phi(hpxP-lacZ)$ <i>ntrC2::Tn5-131</i>	75,4

Una vez comprobada la correcta construcción de las cepas, la actividad β -galactosidasa de las fusiones $\Phi(hpxD-lacZ)$ y $\Phi(hpxP-lacZ)$ fue determinada en cultivos de las cepas mutantes *nac-2* ó *ntrC2::Tn5-131* crecidos en condiciones limitantes de nitrógeno (FIGURA 4.15.). Como controles se ensayaron las cepas tipo parental y las cepas mutantes *rpoN*. En el caso de la fusión $\Phi(hpxD-lacZ)$, a pesar de que las diferencias observadas entre la cepa parental y el mutante *nac* son significativas estadísticamente, los valores de actividad β -galactosidasa en los mutantes *ntrC* o *nac* confirman que los reguladores que

codifican estos genes, y por tanto el sistema NTR, no están implicados en la regulación por nitrógeno de la expresión del operón *hpxDE*.

Por lo que respecta a la fusión $\Phi(hpxP-lacZ)$, la actividad β -galactosidasa de $\Phi(hpxP-lacZ)$ en el mutante *ntrC* es significativamente una cuarta parte de la obtenida en la cepa salvaje. Este resultado sugiere que NtrC participa en la activación de la expresión del operón *hpxPQT*. Estos resultados confirman que NtrC y σ^{54} están implicados en el control de la expresión de *hpxPQT*.

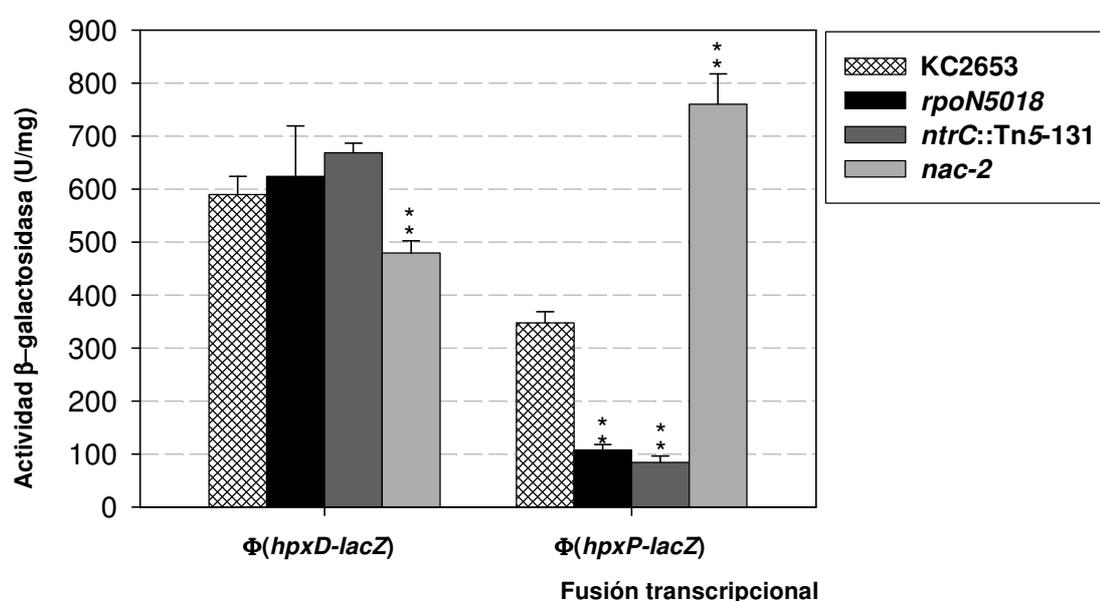


FIGURA 4.15.: Estudio de la expresión de los operones *hpxDE* y *hpxPQT* en distintos fondos genómicos, mediante fusiones transcripcionales. El medio de cultivo utilizado fue GGln, correspondiente a limitación de nitrógeno. El nivel de significación para la comparación de las actividades entre el mutante *nac-2* y la cepa KC2653 en el caso de la fusión $\Phi(hpxD-lacZ)$, es de $p < 0,001$. Los niveles de significación para las comparaciones de las actividades entre los mutantes y la cepa KC2653 en el caso de la fusión $\Phi(hpxP-lacZ)$, son de $p < 0,001$ en todos los casos. Los datos de actividades β -galactosidasa se especifican en ANEXO 3.

En cuanto a la participación de NAC en el control del operon *hpxPQT*, la actividad β -galactosidasa en el mutante *nac* es significativamente el doble que la correspondiente a la cepa KC2653 $\Phi(hpxP-lacZ)$, lo que sugeriría una actividad represora por parte de este regulador. Es posible que la carencia de NAC provoque una alteración de otras vías metabólicas que pueda tener un efecto mínimo e indirecto sobre el metabolismo de hipoxantina como fuente de nitrógeno.

4.4.3. REGULACIÓN ESPECÍFICA MEDIADA POR HIPOXANTINA O ÁCIDO ÚRICO

4.4.3.1. Identificación de los inductores de la expresión de los operones *hpxDE* y *hpxPQT*

Los resultados preliminares obtenidos del estudio de la expresión del gen *hpxP* mediante RT-PCR indicaban que la presencia de purinas podría inducir la expresión del sistema. Este hecho es indicativo de la existencia de un sistema específico de regulación para este regulón. En este sentido nos propusimos identificar los inductores (hipoxantina y/o

ácido úrico) de la expresión del sistema génico *hpx*, así como estudiar la función de la proteína HpxR en esta regulación.

Como primera aproximación a la identificación de la(s) molécula(s) inductora(s) del sistema *hpx* nos propusimos analizar el efecto de la disponibilidad de hipoxantina o ácido úrico sobre la expresión de las fusiones de promotor correspondientes a las cuatro unidades transcripcionales de este sistema génico. Las fusiones transcripcionales fueron analizadas en el fondo genómico de la cepa KC2653. La actividad β -galactosidasa fue determinada a partir de células provenientes de cultivos de las cepas que contienen las fusiones $\Phi(hpxD-lacZ)$, $\Phi(hpxR-lacZ)$, $\Phi(hpxO-lacZ)$ ó $\Phi(hpxP-lacZ)$, crecidos en los medios que se detallan en MÉTODOS 3.1.1. La adición de hipoxantina o ácido úrico a cultivos del tipo GNGln (exceso de nitrógeno) o GGln (limitación de nitrógeno) se llevó a cabo para analizar el efecto de estos compuestos sobre la regulación llevada a cabo por el sistema global del nitrógeno, en el caso del operón *hpxDE*, o por el sistema NTR, en el caso del operón *hpxPQT*.

Como muestra la FIGURA 4.16., el operón *hpxDE* está reprimido en condiciones de exceso de nitrógeno, y en estas condiciones la presencia de purinas no tiene ningún efecto sobre la represión llevada a cabo por el exceso de nitrógeno. La adición de hipoxantina al medio con nitrógeno limitante (GGlnHx) provoca un incremento de la actividad β -galactosidasa de 40 veces. La inducción por hipoxantina es aún mas acusada cuando este compuesto es la única fuente de nitrógeno (GHx). En este caso, los niveles de actividad β -galactosidasa son 56 veces superiores a los obtenidos en condiciones limitantes de nitrógeno (GGln). Estos resultados indican que la expresión del operón *hpxDE* está sujeta a una doble regulación, por disponibilidad de nitrógeno y otra específica por hipoxantina, que solo es operativa cuando el nitrógeno es limitante.

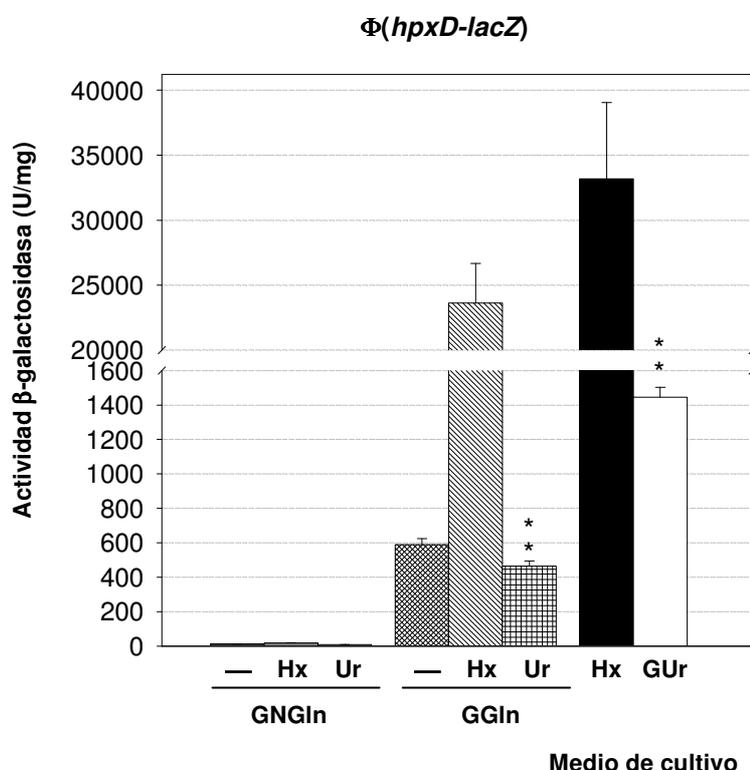


FIGURA 4.16.: Estudio de la expresión de *hpxDE* en presencia de hipoxantina o ácido úrico, mediante la fusión $\Phi(hpxD-lacZ)$. Los medios de cultivo utilizados fueron GNGln, GNGlnHx, GNGlnUr, GGln, GGlnHx, GGlnUr, GHx y GUr (MÉTODOS 3.1.1.). El nivel de significación para la comparación tanto de la actividad entre GGlnUr y GGln como de la actividad entre GUr y GGln es de $p < 0,001$. Los datos de actividades β -galactosidasa se especifican en ANEXO 3.

En relación al ácido úrico, este compuesto no tiene un efecto inductor tan claro sobre el promotor P_{hpxD} . Las diferencias entre la actividad β -galactosidasa en GGInUr o GUr con respecto a GGIn son significativas estadísticamente. Sin embargo, la presencia de ácido úrico en un medio con nitrógeno limitante (GGInUr) no tiene ningún efecto ya que los niveles de expresión alcanzados en GGIn y GGInUr son del mismo orden. Además, la actividad β -galactosidasa en GUr tan sólo es el doble con respecto a GGIn. El hecho de que la expresión del operón $hpxDE$ se induzca acusadamente cuando las células disponen de hipoxantina como fuente de nitrógeno pero no de un intermediario posterior en la vía de degradación como el ácido úrico, sugiere que el inductor del operón $hpxDE$ podría ser hipoxantina.

Respecto a la expresión del gen $hpxR$, los resultados obtenidos con la fusión $\Phi(hpxR-lacZ)$ se deduce que la expresión del gen regulador $hpxR$ es constitutiva, no estando sujeta a regulación por nitrógeno, ni por presencia de purinas. Los niveles de actividad β -galactosidasa obtenidos oscilan entre 116,68U/mg y 149,54U/mg (ANEXO 2.) en todas las condiciones ensayadas y las pequeñas variaciones no son significativas en ninguno de los casos (FIGURA 4.17.).

En relación al gen $hpxO$ los resultados podrían sugerir una ligera inducción en GGIn, GHx o GUr con respecto a GNGIn (FIGURA 4.18.). La inducción en GGIn con respecto a GNGIn no es significativa ($p < 0,1$). En cambio, el leve incremento de actividad β -galactosidasa en GHx o GUr con respecto a GNGIn sí es significativo. Además, parecería que hipoxantina y ácido úrico tienen un efecto represor cuando se añaden a GNGIn o GGIn. Las diferencias entre las actividades β -galactosidasa en GNGInHx y GNGInUr con respecto a GNGIn no son significativas ($p < 1$ y $p < 0,1$, respectivamente). En cambio, la leve disminución de actividad β -galactosidasa en GGInHx o GGInUr con respecto a GGIn sí es significativa. En definitiva, los resultados obtenidos muestran una mínima inducción de la actividad del promotor P_{hpxO} en condiciones limitantes de nitrógeno (GGIn) y en presencia de purinas como únicas fuentes de nitrógeno (GHx o GUr), sin embargo, debido a que las diferencias entre las actividades β -galactosidasa en ningún caso superan una magnitud de 2, proponemos que el gen $hpxO$ no está sometido a una fuerte regulación.

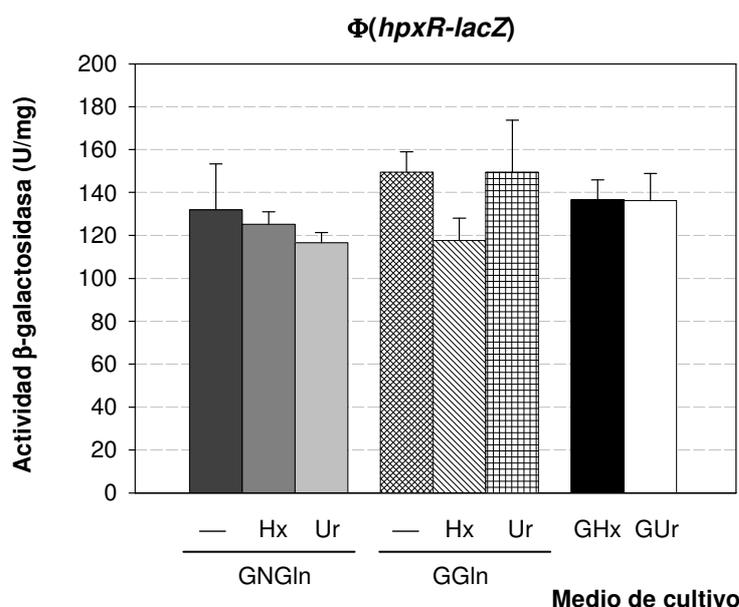


FIGURA 4.17.: Estudio de la expresión de $hpxR$ en presencia de hipoxantina o ácido úrico, mediante la fusión $\Phi(hpxR-lacZ)$. Los medios de cultivo utilizados fueron GNGIn, GNGInHx, GNGInUr, GGIn, GGInHx, GGInUr, GHx y GUr (MÉTODOS 3.1.1.). Los datos de actividades β -galactosidasa se especifican en ANEXO 3.

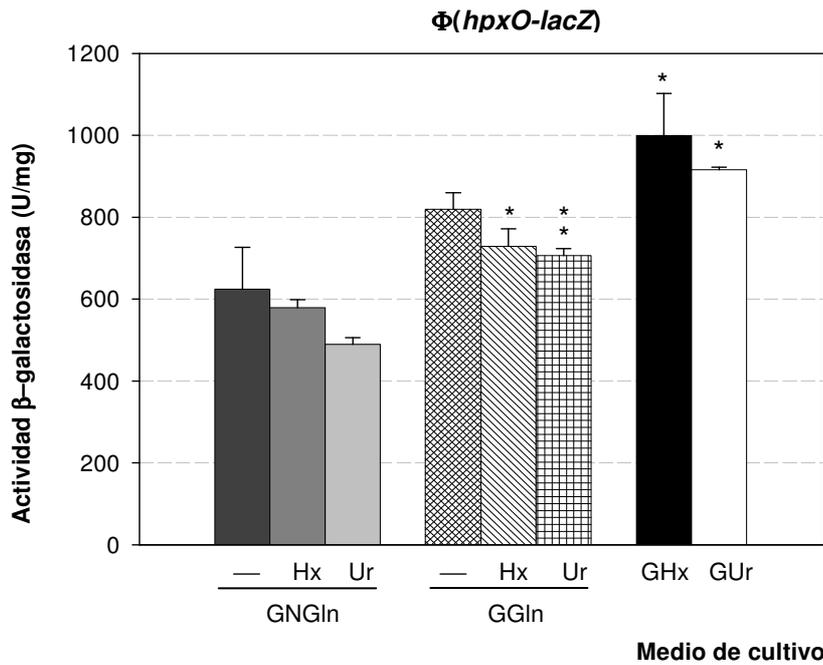


FIGURA 4.18.: Estudio de la expresión de *hpxO* en presencia de hipoxantina o ácido úrico, mediante la fusión $\Phi(hpxO-lacZ)$. Los medios de cultivo utilizados fueron GNGln, GNGlnHx, GNGlnUr, GGln, GGlnHx, GGlnUr, GHx y GUr (MÉTODOS 3.1.1.). El nivel de significación para la comparación de las actividades entre GGlnHx y GGln es de $p < 0,01$. El obtenido para la comparación de las actividades entre GGlnUr y GGln es de $p < 0,001$. Los niveles de significación para las comparaciones de las actividades entre GHx o GUr y GNGln es en ambos casos de $p < 0,01$. Los datos de actividades β -galactosidasa se especifican en ANEXO 3.

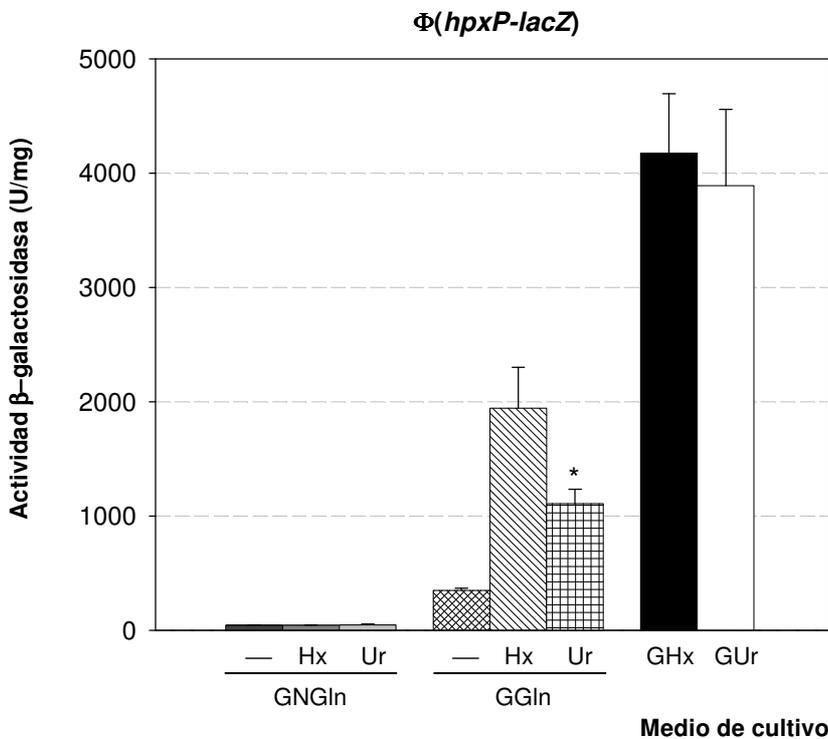


FIGURA 4.19.: Estudio de la expresión de *hpxPQT* en presencia de hipoxantina o ácido úrico, mediante la fusión $\Phi(hpxP-lacZ)$. Los medios de cultivo utilizados fueron GNGln, GNGlnHx, GNGlnUr, GGln, GGlnHx, GGlnUr, GHx y GUr (MÉTODOS 3.1.1.). El nivel de significación para la comparación de la actividad entre GGlnUr y GGln es de $p < 0,01$. Los datos de actividades β -galactosidasa se especifican en ANEXO 3.

En el caso del operón *hpxPQT* (FIGURA 4.19.), también se observa la doble regulación, lo que está de acuerdo con los resultados del análisis de expresión del gen *hpxP* mediante RT-PCR. La expresión de este operón también está reprimida por exceso de nitrógeno, y la presencia de hipoxantina o ácido úrico tampoco tiene ningún efecto sobre la represión ejercida en estas condiciones. A diferencia de lo que ocurre con el promotor P_{hpxD} , la presencia de hipoxantina o ácido úrico en el medio de cultivo tiene consecuencias muy parecidas. La actividad β -galactosidasa en hipoxantina o ácido úrico como fuente de nitrógeno es 12 y 11 veces superior, respectivamente, a la obtenida bajo una limitación de nitrógeno. La inducción llevada a cabo en un medio que contiene, además de nitrógeno limitante, hipoxantina o ácido úrico es 6 y significativamente 3 veces superior a la que tiene lugar en ausencia de estas purinas. Ya que tanto hipoxantina como ácido úrico actúan como inductores de la expresión de la fusión del operón *hpxPQT* y que éste último es generado a partir de hipoxantina, los resultados podrían sugerir que el inductor del promotor P_{hpxP} es ácido úrico.

Con la finalidad de identificar cuál de los dos compuestos nitrogenados, hipoxantina o ácido úrico (o ambos), es el inductor directo de la expresión de los operones *hpxDE* y *hpxPQT*, se analizó la expresión de las fusiones $\Phi(hpxD-lacZ)$ y $\Phi(hpxP-lacZ)$ en el fondo genómico de mutantes en los genes *hpxD* o *hpxO*. Los mutantes en el gen *hpxD* son incapaces de metabolizar hipoxantina, por lo que en medios de cultivo en presencia de esta purina, la acumulan y no generan metabolitos derivados. En cambio, los mutantes en el gen *hpxO* acumulan ácido úrico dado su deficiencia en actividad uricasa.

Las mutaciones *hpxD::mini-Tn5 Km* y *hpxO::kan* fueron transducidas de las cepas donadoras LC1 y LCO20 a las cepas receptoras KC2653 $\Phi(hpxD-lacZ)$ y KC2653 $\Phi(hpxP-lacZ)$ a través del fago P1. Después de comprobar los marcadores de la transducción, se comprobó el fenotipo de las colonias seleccionadas en cuanto a su capacidad de utilizar hipoxantina o ácido úrico como fuentes de nitrógeno. Como era de esperar, las cepas KC2653 *hpxD::mini-Tn5 Km* $\Phi(hpxD-lacZ)$ y KC2653 *hpxD::mini-Tn5 Km* $\Phi(hpxP-lacZ)$ mostraron un fenotipo hipoxantina negativo/ácido úrico positivo, mientras que las cepas KC2653 *hpxO::kan* $\Phi(hpxD-lacZ)$ y KC2653 *hpxO::kan* $\Phi(hpxP-lacZ)$ mostraron un fenotipo negativo para ambas fuentes de nitrógeno.

La actividad β -galactosidasa se determinó a partir de células provenientes de cultivos de las cepas obtenidas crecidas en medios con limitación de nitrógeno en presencia de hipoxantina o ácido úrico. Como control se ensayó la expresión de las fusiones $\Phi(hpxD-lacZ)$ y $\Phi(hpxP-lacZ)$ en el fondo parental KC2653. Ya que los mutantes en los genes *hpxD* o *hpxO* no pueden crecer con hipoxantina como única fuente de nitrógeno, y tampoco los mutantes en el gen *hpxO* pueden crecer con ácido úrico como fuente de nitrógeno, los medios de cultivos utilizados fueron GGlnHx y GGlnUr.

Los resultados de la FIGURA 4.20. muestran que la actividad β -galactosidasa obtenida en presencia de hipoxantina (GGlnHx) a partir de la fusión $\Phi(hpxD-lacZ)$ en un mutante en el gen *hpxD* (32.274U/mg) es ligeramente superior, con significancia estadística, a la generada por la cepa no mutante (23.609 U/mg). Este nivel de expresión, además, es similar al de la cepa no mutante en hipoxantina como única fuente de nitrógeno (33.183U/mg). En un mutante en el gen *hpxD*, no se puede generar el resto de intermediarios de la vía de oxidación de hipoxantina, al carecer de la primera enzima oxidativa. Ésto indica que hipoxantina es el inductor del operón *hpxDE*. El efecto de la mutación en el gen *hpxO* en presencia de ácido úrico, a pesar de ser significativo, no es tan claro (FIGURA 4.21.).

Respecto a la fusión $\Phi(hpxP-lacZ)$, la actividad β -galactosidasa alcanzada en presencia de hipoxantina (GGlnHx) por el mutante en el gen *hpxD* es una séptima parte de la determinada en la cepa KC2653 (FIGURA 4.20.). Así pues, la mutación en *hpxD* impide la inducción por hipoxantina del operón *hpxPQT*. Este mutante es incapaz de oxidar hipoxantina a ácido úrico, lo que indica que el inductor del operón *hpxPQT* es el ácido úrico.

Consistente con esta observación son los resultados obtenidos en el fondo del mutante en el gen *hpxO* cuando la fuente de nitrógeno es el ácido úrico (FIGURA 4.21.). Los niveles de actividad β-galactosidasa (919,11U/mg) son similares a los alcanzados en la cepa que no contiene dicha mutación (1.109U/mg), y la diferencia entre ellos no es significativa ($p < 0,1$).

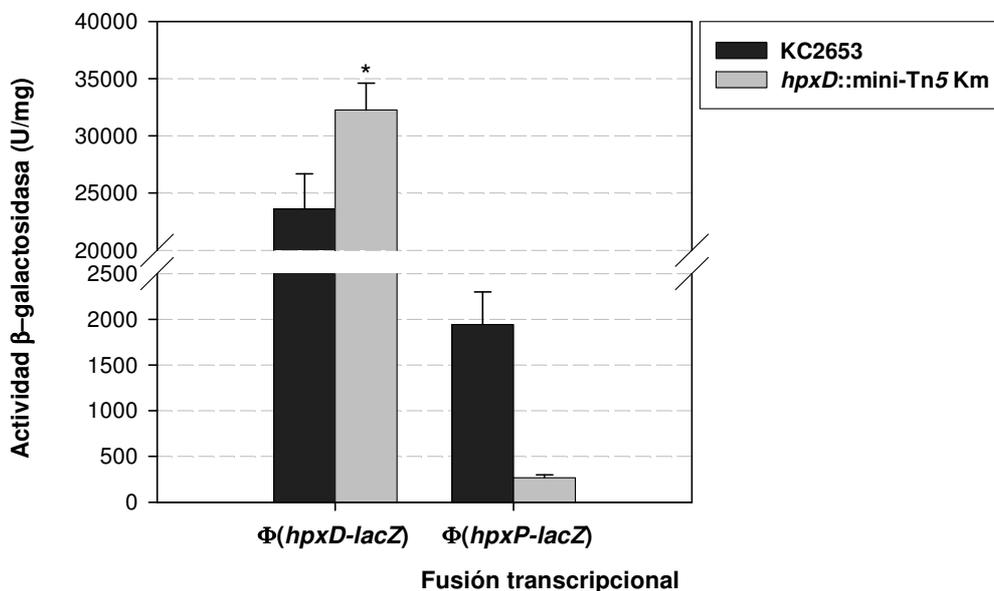


FIGURA 4.20.: Efecto de la deficiencia en HpxD en la expresión de *hpxDE* y *hpxPQT* analizado mediante fusiones transcripcionales. El medio de cultivo utilizado fue GGInHx. El nivel de significación para la comparación de actividades a partir de la fusión $\Phi(hpxD-lacZ)$ entre los fondos genómicos KC2653 y *hpxD::mini-Tn5 Km* es de $p < 0,01$. Los datos de actividades β-galactosidasa se especifican en ANEXO 3.

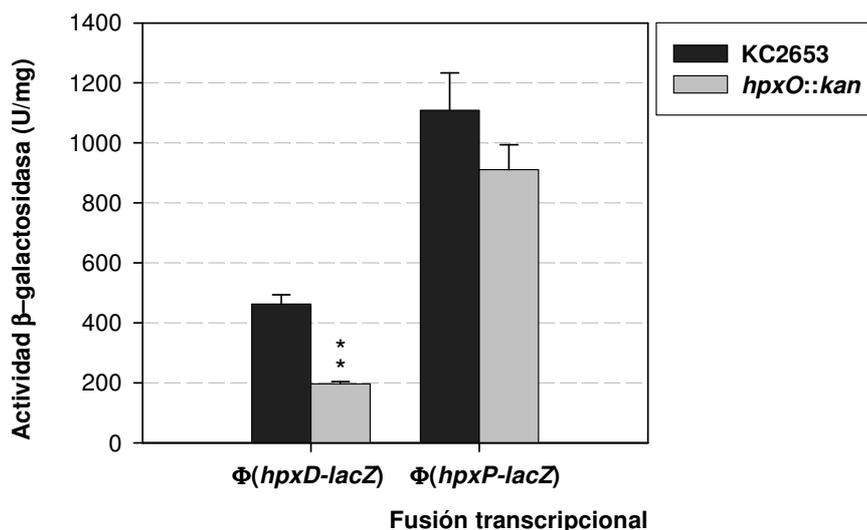


FIGURA 4.21.: Efecto de la deficiencia en HpxO en la expresión de *hpxDE* y *hpxPQT*, analizado mediante fusiones transcripcionales. El medio de cultivo utilizado fue GGInUr. El nivel de significación para la comparación de actividades a partir de la fusión $\Phi(hpxD-lacZ)$ entre los fondos genómicos KC2653 y *hpxO::kan* es de $p < 0,001$. Los datos de actividades β-galactosidasa se especifican en ANEXO 3.

4.4.3.2. Función de HpxR en la regulación de la expresión del sistema *hpx*

Los resultados presentados hasta el momento sugieren que el gen *hpxR* codifica un regulador de la familia LysR, probablemente de tipo activador, implicado en la regulación de la asimilación de hipoxantina como fuente de nitrógeno. El siguiente paso era estudiar el papel de esta proteína en el control de las diferentes unidades transcripcionales de este sistema génico. Como primera aproximación a este estudio se llevaron a cabo ensayos de retardación de la movilidad electroforética (EMSA) con la finalidad de detectar los centros de unión de esta proteína en los diferentes promotores.

4.4.3.2.1. Estudio de la unión de HpxR a las regiones promotoras P_{hpxD-R} y P_{hpxO-P}

Para llevar a cabo estos estudios, en primer lugar se purificó la proteína HpxR mediante su fusión a la proteína de unión a maltosa (MBP; MÉTODOS 3.2.3.). Los oligonucleótidos empleados, para amplificar por PCR el fragmento que fue clonado en el vector pc2x, se detallan en ANEXO 1.

La preparación de la proteína de fusión MBP-HpxR obtenida después de la digestión con Factor Xa presentaba de manera habitual un muy bajo nivel de proteína de fusión. Sin embargo, esta no interferiría en los EMSAs llevados a cabo y que se presentan a continuación. Por último, se observan bandas adicionales que podrían ser atribuidas a productos de la digestión llevada a cabo por proteasas celulares.

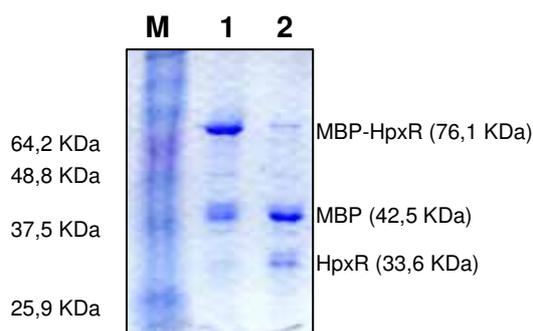


FIGURA 4.22.: SDS-PAGE de muestras correspondientes al proceso de purificación de HpxR. Se indican los tamaños correspondientes a las bandas del marcador de peso molecular (carril M). Carril 1: proteína de fusión eluida de la columna. Carril 2, productos de la digestión llevada a cabo por FactorXa.

La proteína HpxR obtenida en este proceso fue utilizada en estudios de regulación llevados a cabo mediante EMSAs. La caracterización fenotípica de un mutante en el gen *hpxR* mostró que éste no puede utilizar hipoxantina como fuente de nitrógeno pero sí ácido úrico, lo que sugiere que HpxR sería un regulador tipo activador de los genes *hpxDE* (RESULTADOS 4.3.4.2.1.).

La unión de HpxR a las regiones intergénicas del regulon *hpx* se analizó mediante EMSAs. Las sondas utilizadas abarcaban diferentes zonas de las regiones P_{hpxD-R} y P_{hpxO-P} (ANEXOS 1. y 2.). Una vez purificadas, fueron marcadas radiactivamente con ^{32}P . En primer lugar se analizó la capacidad de unión de HpxR a las regiones correspondientes a los promotores divergentes P_{hpxD-R} o P_{hpxO-P} . Para ello se utilizaron sondas correspondientes a dos regiones diferentes y solapadas 27pb de la región P_{hpxD-R} , y una tercera sonda correspondiente a la región completa P_{hpxO-P} . Los resultados se muestran en la FIGURA 4.23. HpxR presente en la muestra forma un complejo de retardación (C1A) tan sólo con la sonda Sder2. Ésto indica que esta proteína reguladora no se une, al menos *in vitro*, a la región P_{hpxO-P} .

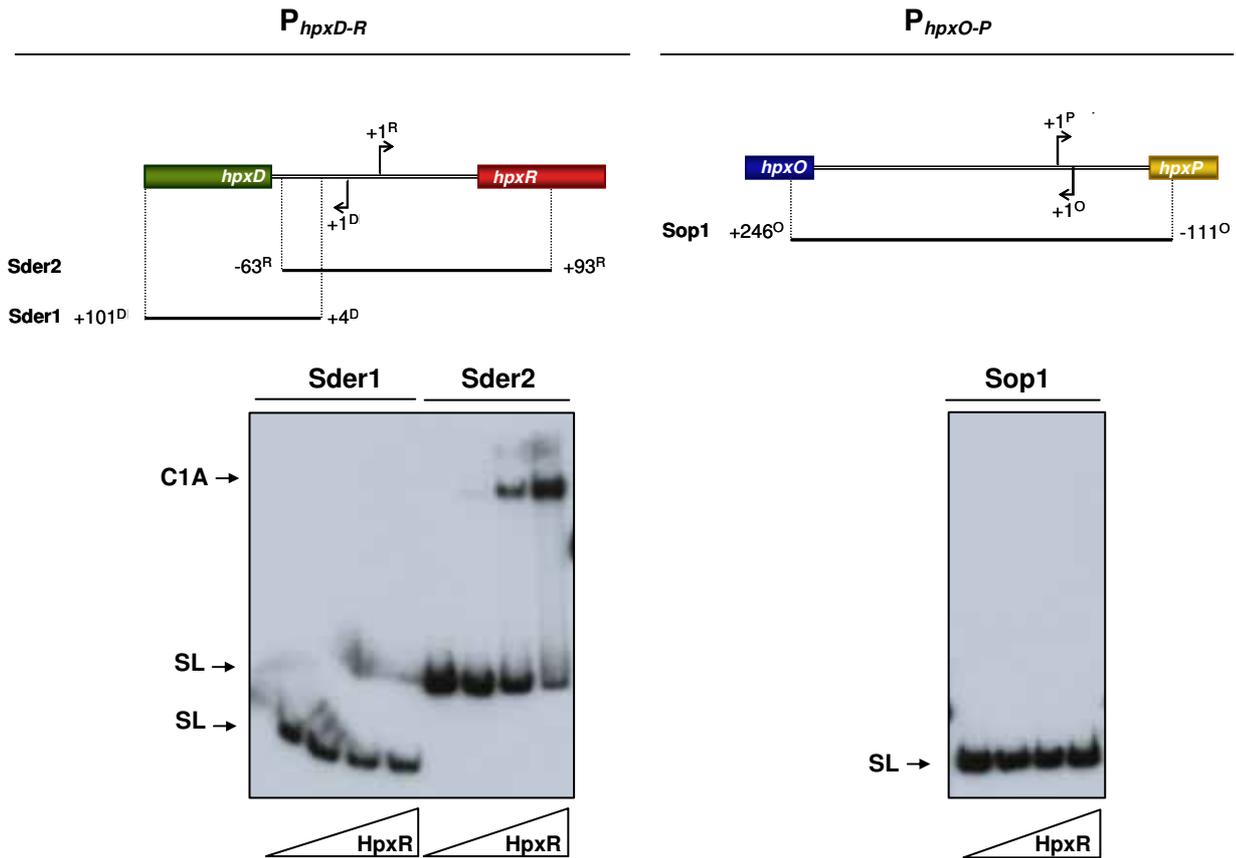


FIGURA 4.23.: Estudios de la retardación de la movilidad electroforética (EMSA) utilizando proteína HpxR y las sondas Sder1, Sder2 y Sop1. En la parte superior se muestra un esquema de las sondas utilizadas especificando las posiciones de los nucleótidos situados a ambos extremos de cada sonda con respecto al inicio de transcripción del operón *hpxDE* (^D), *hpxR* (^R) o *hpxO* (^O). La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida al 5%. Todas las mezclas de reacción contenían un exceso de 500mM de poli(dI-dC). La mezcla de reacción contenía 25nm de sonda y 0,2, 0,4 ó 0,9µg de la proteína HpxR purificada (representado mediante el triángulo rectángulo). SL: Sonda libre. C1A: Complejo de retardación C1A.

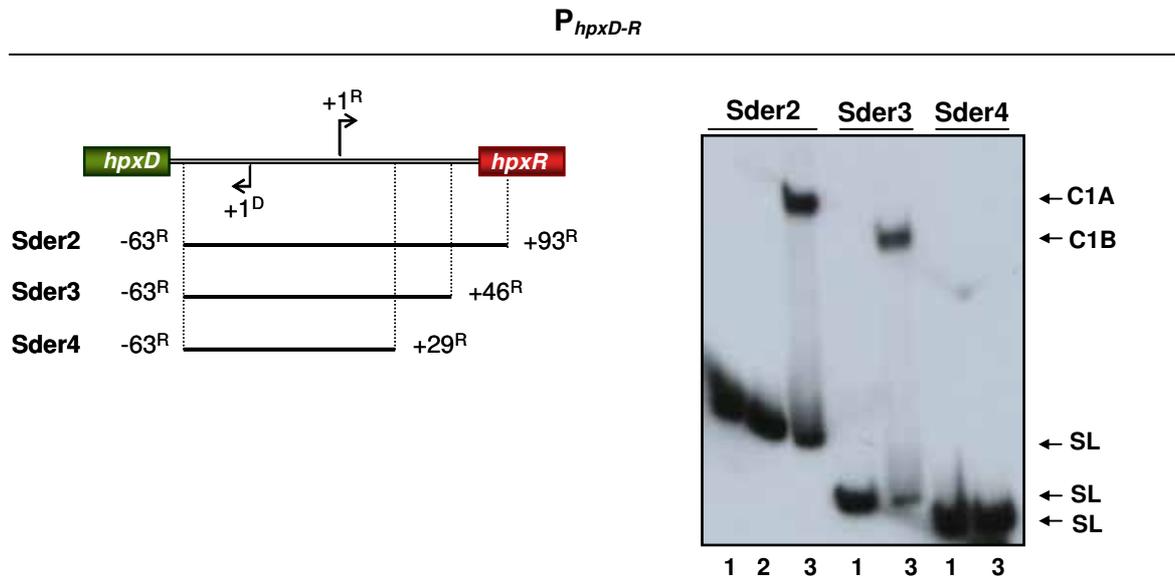


FIGURA 4.24.: Estudios de la retardación de la movilidad electroforética (EMSA) de las sondas Sder2, Sder3 y Sder4, utilizando MBP y proteína HpxR. En la parte izquierda se muestra un esquema de las sondas utilizadas, especificando las posiciones de los nucleótidos situados a ambos extremos de cada sonda con respecto al inicio de transcripción del gen *hpxR* (^R). La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida al 5%. Todas las mezclas de reacción contenían un exceso de 500mM de poli(dI-dC). La mezcla de reacción contenía 25nm de sonda y 1µg de MBP, ó 0,4µg de la proteína HpxR. 1: Sonda libre. 2: MBP. 3: HpxR. SL: Sonda libre. C1A: Complejo de retardación C1A. C1B: Complejo de retardación C1B.

Puesto que la muestra proteica utilizada proviene de la digestión de la proteína de fusión MBP-HpxR con Factor Xa, se analizó la unión de MBP a la sonda Sder2. MBP había sido purificada a partir de *E. coli* XL1-Blue transformada con el vector pc2x. Además, para acotar la secuencia de unión de HpxR a la región P_{hpxD-R} , se analizó la unión de HpxR a dos sondas consistentes en fragmentos de Sder2 (sondas Sder3 y Sder4). La localización de las sondas y los resultados obtenidos se muestran en la FIGURA 4.24.

Como muestra la FIGURA 4.24, MBP no forma ningún complejo de retardación con la sonda Sder2, lo que indica que los complejos C1A, formado con la sonda Sder2, y C1B, formado con la sonda Sder4, se deben específicamente a la unión de HpxR. HpxR no se unió a la sonda Sder4, más corta que Sder3. Este resultado indica que en los 17pb que diferencian a las sondas Sder3 y Sder4 existe algún elemento fundamental para la unión de HpxR.

Como se ha comentado anteriormente, HpxR pertenece a la familia de reguladores LysR. Los reguladores de este tipo suelen actuar como represores de la transcripción de su propio gen (*hpxR* en nuestro caso), el cual típicamente se transcribe de manera divergente al gen cuya transcripción activan (probablemente *hpxDE*). Las proteínas de esta familia reconocen dos secuencias en el promotor activado, el ABS (*Activator Binding Site*) y el RBS (*Repressor Binding Site*). El ABS suele encontrarse solapado con la caja -35, mientras que el RBS suele localizarse en torno a la posición -65. No se ha asociado ninguna secuencia concreta al ABS, pero el RBS contiene la secuencia consenso T-N₁₁-A. Anteriormente se identificaron varias dianas de este tipo en el promotor P_{hpxD} (RESULTADOS 4.4.1.1.). Dos de ellas están localizadas parcialmente dentro del fragmento de 17pb que diferencia a las sondas Sder3 y Sder4, y en torno a la posición -65 respecto al inicio de transcripción de *hpxDE* (FIGURA 4.25.). La localización de estos posibles RBS concuerda con la hipótesis de la pérdida, en la sonda Sder4, de algún elemento fundamental para la unión de HpxR a la región P_{hpxD-R} .

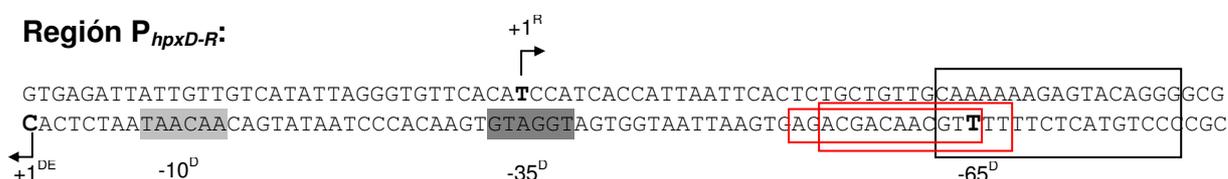


FIGURA 4.25.: Localización de las posibles secuencias de unión de HpxR en la región intergénica P_{hpxD-R} . Se indican las cajas -10 y -35 del promotor P_{hpxD} y, en negrita, posiciones relativas al inicio de transcripción de P_{hpxR} (^R) o P_{hpxD} (^D). Las flechas indican el sentido de la transcripción. En rojo se muestran los dos posibles RBS (T-N₁₁-A) en el promotor P_{hpxD} . Dentro del recuadro negro se muestran los 17pb que contiene Sder3 adicionales respecto a Sder4.

4.4.3.2.2. Efecto de la mutación *hpxR::kan* en la actividad de los promotores del sistema génico *hpx*

Para analizar la función de HpxR en la regulación de la expresión del operón *hpxDE* y del gen *hpxR* y además confirmar que este regulador no participa *in vivo* en la regulación de *hpxO* ni de *hpxPQT*, se analizaron las fusiones transcripcionales de estos genes en un fondo genómico mutante en el gen *hpxR*.

La mutación *hpxR::kan* fue transducida de la cepa LCR3 (RESULTADOS 4.3.4.2.) a las cepas que contienen las fusiones $\Phi(hpxD-lacZ)$, $\Phi(hpxR-lacZ)$, $\Phi(hpxO-lacZ)$ o $\Phi(hpxP-lacZ)$ a través del bacteriófago P1. Se seleccionaron colonias provenientes de cada transducción que contenían las fusiones de promotor y que mostraron un fenotipo Km^r. En

los transductantes se comprobó además el fenotipo asociado a la mutación en *hpxR* (hipoxantina negativo/ácido úrico positivo).

Las fusiones $\Phi(hpxD-lacZ)$ y $\Phi(hpxR-lacZ)$ se estudiaron en condiciones de nitrógeno limitante y de exceso de nitrógeno en ausencia (GGln y GNGln) y presencia del inductor de P_{hpxD} hipoxantina (GGlnHx y GNGlnHx).

Respecto a la regulación de *hpxDE* por HpxR se aprecian varios efectos (FIGURA 4.26.). En primer lugar, en la cepa mutante en el gen *hpxR* la actividad β -galactosidasa es 8 y 377 veces menor, según se trate de GGln o GGlnHx, que en la cepa tipo salvaje. Ésto indica que HpxR es un activador del operón *hpxDE*. En segundo lugar, los niveles de expresión del operón *hpxDE* en el mutante *hpxR* en un medio con nitrógeno limitante en ausencia (GGln; 76,89U/mg) y presencia de hipoxantina (GGlnHx; 62,57U/mg) son del mismo orden, lo que indica la pérdida total de la inducción por hipoxantina en el mutante. En tercer lugar, los niveles de actividad β -galactosidasa en GNGln y GNGlnHx en ambas cepas son del mismo orden, lo que indica que bajo un exceso de nitrógeno no tiene lugar la regulación por HpxR. Por último, en el mutante *hpxR* y en condiciones limitantes de nitrógeno se detecta una inducción con respecto a un exceso de nitrógeno. Este efecto podría deberse a la regulación de la expresión del operón *hpxDE* llevada a cabo por el sistema global del nitrógeno.

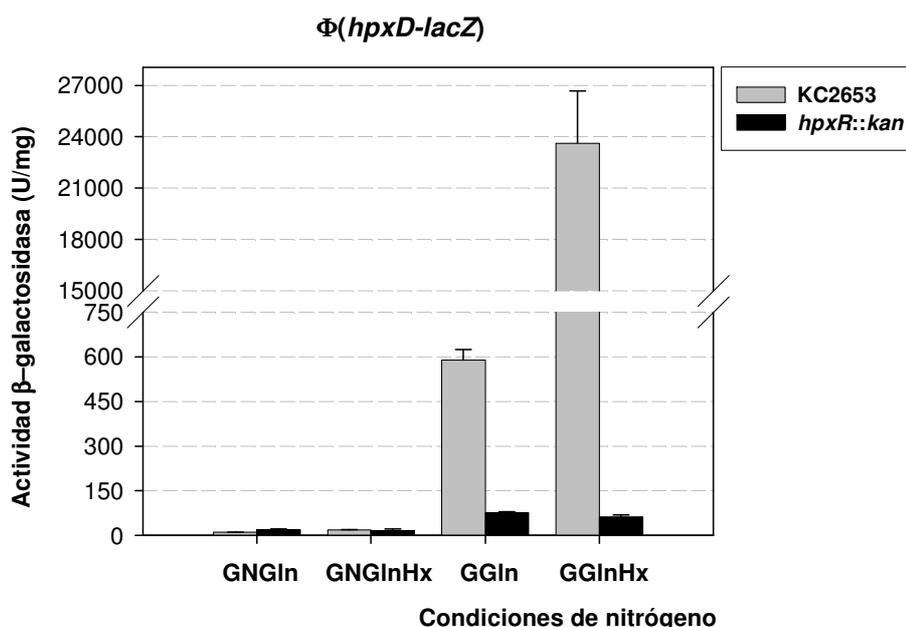


FIGURA 4.26.: Estudio de la expresión de *hpxDE* en un mutante en el gen *hpxR*, mediante fusiones transcripcionales. Las condiciones de nitrógeno se detallan en MÉTODOS 3.1.1. Los datos de actividades β -galactosidasa se especifican en ANEXO 3.

En cuanto a la regulación de *hpxR* por su producto génico HpxR los resultados indican que HpxR, efectivamente, reprime la expresión de su propio gen (FIGURA 4.27.). En el mutante en el gen *hpxR* los niveles de actividad β -galactosidasa son significativamente superiores, entre 4 y 5 veces, en GGln o GlnHx con respecto a la cepa tipo salvaje. Incluso en condiciones de exceso de nitrógeno (GNGln y GNGlnHx) la expresión de *hpxR* es superior en el mutante *hpxR* que en la cepa parental KC2653, aunque en estas condiciones los incrementos son de 2 y 3 veces. Ésto sugiere la implicación de otro(s) factor(es) en condiciones de exceso de nitrógeno.

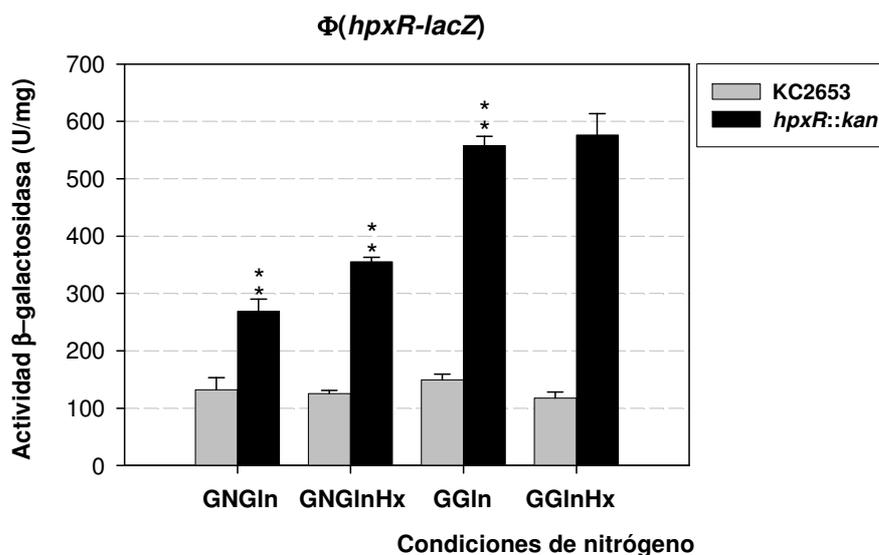


FIGURA 4.27.: Estudio de la expresión de *hpxR* en un mutante en el gen *hpxR*, mediante fusiones transcripcionales. Las condiciones de nitrógeno se detallan en MÉTODOS 3.1.1. El nivel de significación de las comparaciones de las actividades en GNGln, GNGlnHx y GGln, entre KC2653 y el mutante en el gen *hpxR* es en todos los casos de $p < 0,01$. Los datos de actividades β -galactosidasa se especifican en ANEXO 3.

En cuanto al efecto de la mutación en el gen *hpxR* sobre la expresión del gen *hpxO*, la fusión $\Phi(hpxO-lacZ)$ se analizó en condiciones de nitrógeno limitante en ausencia (GGln) o presencia de hipoxantina (FIGURA 4.28.). Los resultados muestran que no hay cambios significativos en los niveles de actividad β -galactosidasa en la cepa mutante con respecto a la cepa tipo salvaje, lo que indica que HpxR no participa en la regulación de *hpxO*.

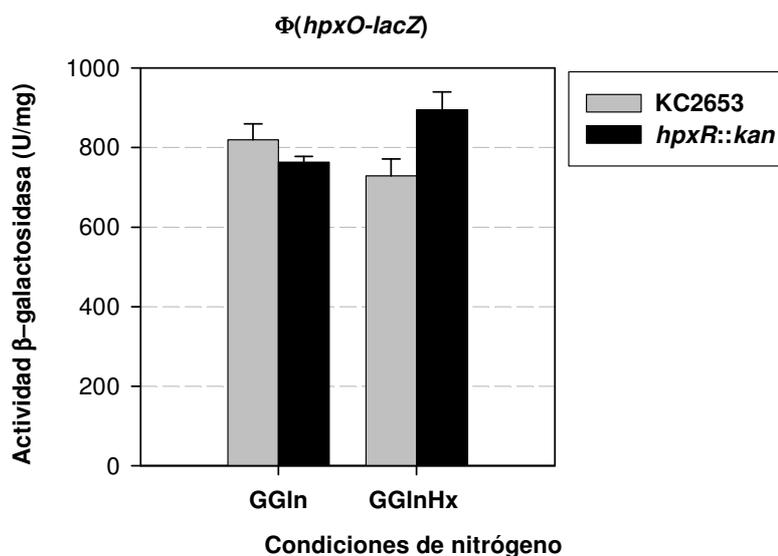


FIGURA 4.28.: Estudio de la expresión de *hpxO* en un mutante en el gen *hpxR*, mediante fusiones transcripcionales. Las condiciones de nitrógeno se detallan en MÉTODOS 3.1.1. Los datos de actividades β -galactosidasa se especifican en ANEXO 3.

Por último se analizó la fusión $\Phi(hpxP-lacZ)$ en condiciones de nitrógeno limitantes en ausencia de purinas (GGIn), en presencia del precursor de ácido úrico hipoxantina (GGInHx) y en presencia del inductor ácido úrico (GGInUr) (FIGURA 4.29.). Las actividades β -galactosidasa del mutante *hpxR* y la cepa tipo salvaje en GGIn o GGInUr son del mismo orden. La diferencia observada entre las actividades β -galactosidasa de ambas cepas en GGInUr no es significativa ($p < 0,1$). El mutante *hpxR* es deficiente en la actividad catalizada por los productos génicos del operón *hpxDE*, implicados en la oxidación de hipoxantina a ácido úrico. En GGInHx, la actividad β -galactosidasa del mutante es una séptima parte de la obtenida en la cepa tipo salvaje debido a que en estas condiciones no se genera el inductor ácido úrico a partir de hipoxantina. Estos resultados indican que HpxR tampoco participa en la regulación de *hpxPQT*, lo que confirma los resultados obtenidos en los estudios de EMSA que sugerían que el regulador HpxR no se une a la región $P_{hpxO-hpxP}$ (RESULTADOS 4.4.3.2.2.).

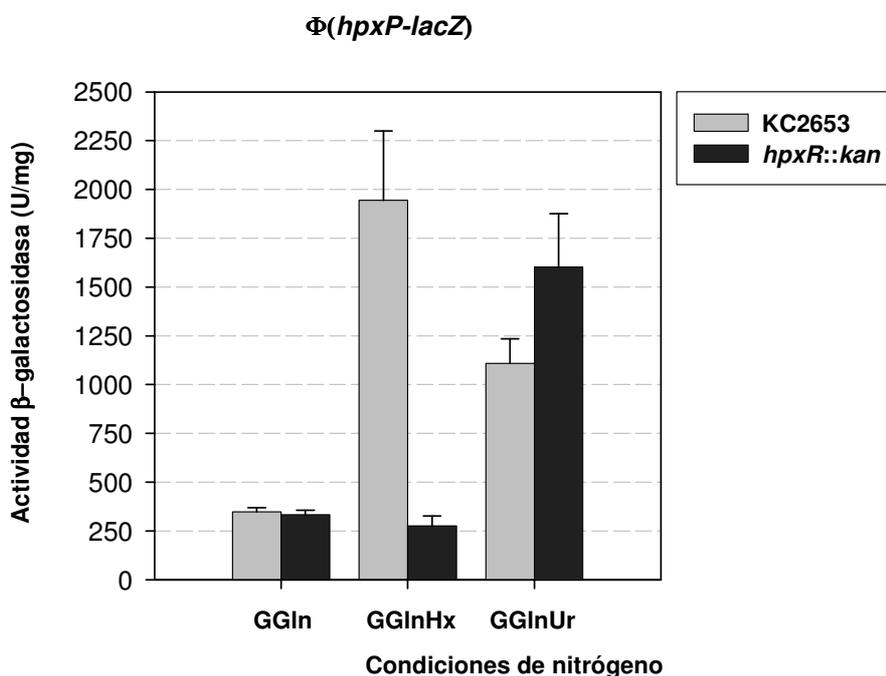


FIGURA 4.29.: Estudio de la expresión de *hpxPQT* en un mutante en el gen *hpxR*, mediante fusiones transcripcionales. Las condiciones de nitrógeno se detallan en MÉTODOS 3.1.1. Los datos de actividades β -galactosidasa se especifican en ANEXO 3.

El estudio llevado a cabo mediante fusiones transcripcionales confirmó el papel regulador de la proteína HpxR en el caso de las unidades transcripcionales *hpxDE* y *hpxR*. De esta manera se comprobó que la inducción del operón *hpxDE* que tiene lugar en presencia de hipoxantina está asociada al regulador HpxR. Por ello se analizó el efecto de la hipoxantina sobre la unión de HpxR a la región promotora $P_{hpxD-hpxR}$. Para ello se incubaron la sonda Sder3 y el regulador en presencia de diferentes concentraciones de hipoxantina. Los resultados mostrados en la FIGURA 4.30. muestran que la presencia de esta purina no altera el número de complejos de retardación, lo que sugiere la hipoxantina podría provocar un cambio conformacional de HpxR.

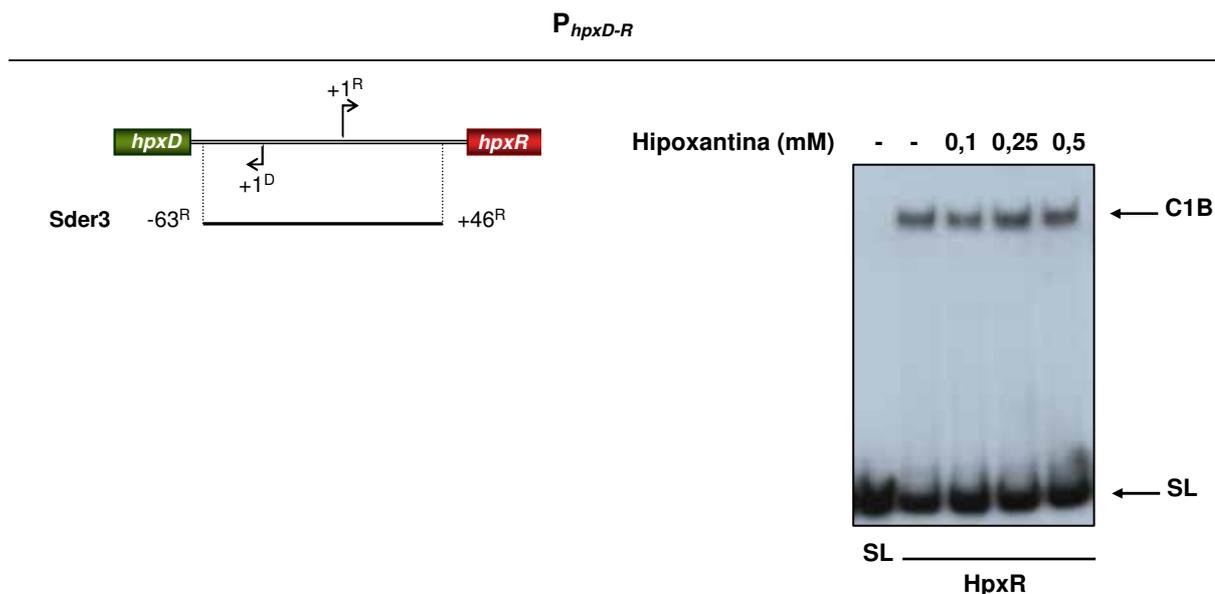


FIGURA 4.30.: Estudios de la retardación de la movilidad electroforética (EMSA) de la sonda Sder3 en presencia de hipoxantina utilizando proteína HpxR. En la parte izquierda se muestra un esquema de la sonda utilizada, especificando las posiciones de los nucleótidos situados a ambos extremos con respecto al inicio de transcripción del gen *hpxR* (^R). La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida al 5%. Todas las mezclas de reacción contenían un exceso de 500mM de poli(dI-dC). La mezcla de reacción contenía 25nm de sonda, 0,4 μ g de la proteína HpxR y concentraciones variables de hipoxantina (0,1mM, 0,25mM y 0,5mM). SL: Sonda libre. C1B: Complejo de retardación C1B.

4.4.4. ESTUDIOS DE RETARDACIÓN DE LA MOVILIDAD ELECTOFORÉTICA (EMSA) LLEVADOS A CABO CON EXTRACTOS CELULARES DE CULTIVOS CRECIDOS CON DISTINTAS FUENTES DE NITRÓGENO

Los resultados expuestos evidencian que *hpxDE* y *hpxPQT* se inducen en condiciones limitantes de nitrógeno y en presencia de purinas. La regulación por niveles de nitrógeno depende del sistema NTR en el caso del operón *hpxPQT*, mientras que en el caso del operón *hpxDE* tiene lugar mediante otro sistema no descrito hasta el presente. En cuanto a la regulación mediada por presencia de purinas, la molécula inductora es hipoxantina en el caso del operón *hpxDE* y ácido úrico en el caso del operón *hpxPQT*. Además, hemos comprobado que la proteína HpxR actúa como represora de su propio gen y como activadora del operón *hpxDE* en condiciones limitantes de nitrógeno y presencia de hipoxantina. A continuación, nos planteamos llevar a cabo EMSAs con sondas correspondientes a las regiones promotoras del sistema *hpx* y extractos celulares, obtenidos a partir de células crecidas con distintas fuentes de nitrógeno, con la finalidad de evidenciar la formación de determinados complejos DNA-proteína implicados en los diferentes tipos de regulación descritos.

4.4.4.1. Estudios de retardación de la movilidad electroforética de sondas correspondientes a P_{hpxD}

En primer lugar se obtuvieron extractos celulares de cultivos de la cepa KC2653, crecidos en GNGln, GNGlnHx, GGln, GGlnHx y GHx, que se utilizaron en EMSAs llevados a cabo con la sonda Sder3 correspondiente a la región promotora P_{hpxD-R} . Como muestra la FIGURA 4.31. en los carriles correspondientes a extractos provenientes de cultivos crecidos con hipoxantina (carril 9), especialmente, o ácido úrico (carril 10) como únicas fuentes de

nitrógeno aparece un complejo que retarda a la sonda Sder3 de la misma manera que el complejo C1B (RESULTADOS 4.4.3.2.2.). Por tanto, dicho complejo se asocia a la unión de HpxR. La banda de retardación correspondiente al complejo C1B se detecta levemente en el carril correspondiente a condiciones limitantes de nitrógeno (carril 6). En cambio, cuando las células han crecido con un exceso de nitrógeno (carriles 3, 4, 5) se distingue un complejo diferente que presenta menor movilidad electroforética (complejo 2). La detección de este complejo sugiere la existencia de otra proteína reguladora que se une a P_{hpxD-R} cuando hay un exceso de nitrógeno. En base a los datos de actividad β -galactosidasa que evidencian que en esas condiciones se encuentra reprimida la expresión de *hpxDE*, el complejo C2 podría estar constituido por un represor asociado al control global por nitrógeno. Este complejo también se detecta levemente en condiciones de nitrógeno limitante en ausencia o presencia de purinas (carriles 6,7 y 8).

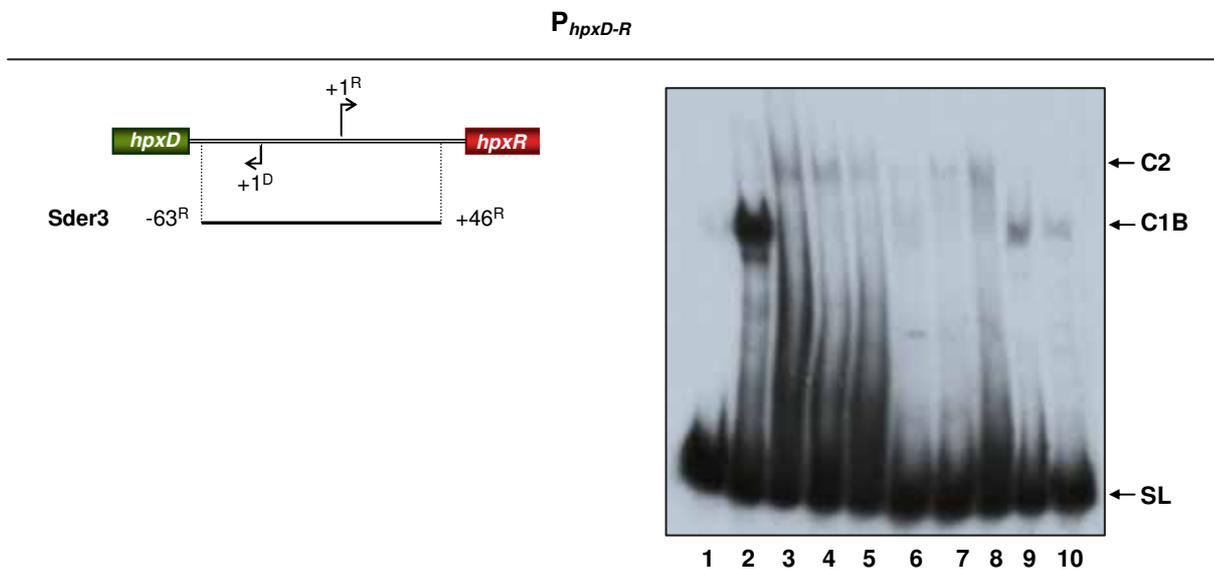


FIGURA 4.31.: Estudio de retardación de la movilidad electroforética (EMSA) de la sonda Sder3, correspondiente a la región intergénica P_{hpxD-R} , llevado a cabo con extractos celulares. En la parte izquierda se muestra un esquema de la sonda utilizada, especificando las posiciones de los nucleótidos situados a ambos extremos de la sonda con respecto al inicio de transcripción del gen *hpxR* (^R). La electroforesis se realizó en un gel de poli(acrilamida) al 5%. Todas las mezclas de reacción contenían un exceso de 500mM de poli(dI-dC). La mezcla de reacción contenía 25nm de sonda y 0,4 μ g de la proteína HpxR (carril 2) o 5 μ g de extracto celular (carriles 3-10) obtenidos a partir de cultivos crecidos en los medios que se indican a continuación. 1: Sonda libre. 2: HpxR. 3: GNGln. 4: GNGlnHx. 5: GNGlnUr. 6: GGln. 7: GGlnHx. 8: GGlnUr. 9: GHx. 10: GUr. SL: Sonda libre. C1B: Complejo de retardación C1B. C2: Complejo de retardación C2.

4.4.4.2. Estudios de retardación de la movilidad electroforética de sondas correspondientes a P_{hpxO-P}

Estudios previos de retardación (RESULTADOS 4.4.3.2.2.) y de fusiones de promotor a *lacZ* (RESULTADOS 4.4.3.2.3.) han demostrado que HpxR no regula la expresión de *hpxO* ni de *hpxPQT*. Un mutante en el gen *hpxR* muestra niveles más bajos de expresión del operón *hpxPQT* que la cepa parental, en un medio que contiene hipoxantina (GGlnHx), debido a que dicho mutante no puede oxidar esta purina y, por tanto, generar el inductor de tal operón ácido úrico. Para comprobar la implicación de otros factores en la regulación de estas unidades transcripcionales, se realizaron EMSAs de fragmentos correspondientes a la región P_{hpxO-P} utilizando extractos celulares de la cepa KC2653.

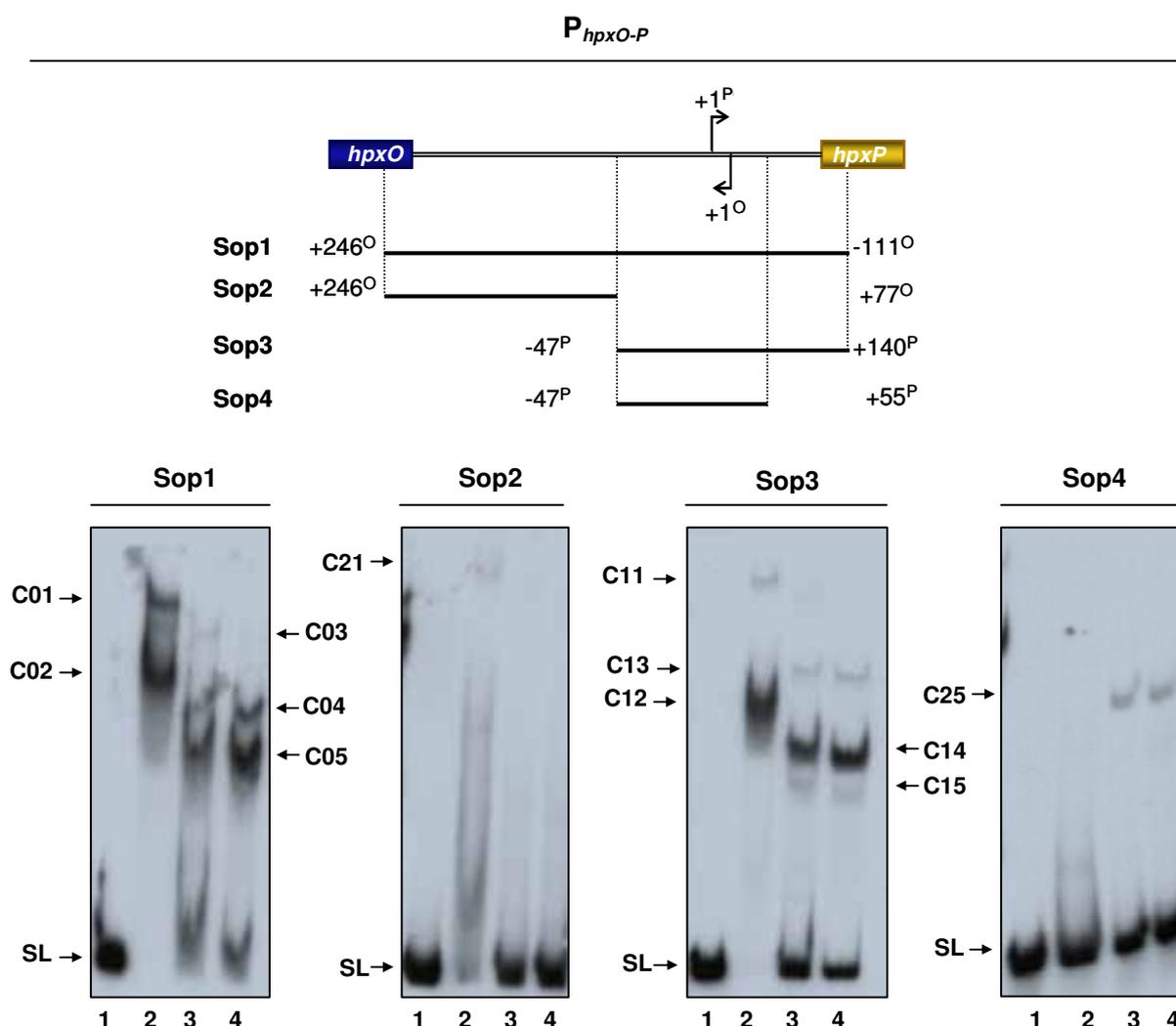


FIGURA 4.32.: Estudios de retardación de la movilidad electroforética (EMSA) de las sondas Sop1, Sop2, Sop3 y Sop4, correspondientes a distintos fragmentos de la región intergénica *hpxP-hpxP* llevados a cabo con extractos celulares. En la parte superior se muestra un esquema de las sondas utilizadas, especificando las posiciones de los nucleótidos situados a ambos extremos de cada sonda con respecto al inicio de transcripción del gen *hpxO* ($^{\circ}$) o el operón *hpxPQT* (P). La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida al 5%. Todas las mezclas de reacción contenían un exceso de 500mM de poli(dI-dC). La mezcla de reacción contenía 25nm de sonda y 5 μ g de extracto celular obtenido a partir de cultivos crecidos en los medios que se indican a continuación. 1: Sonda libre. 2: GNGln. 3: GGln. 4: GHx. SL: Sonda libre. C01: Complejo de retardación C01. C02: Complejo de retardación C02. C03: Complejo de retardación C03. C04: Complejo de retardación C04. C05: Complejo de retardación C05. C11: Complejo de retardación C11. C12: Complejo de retardación C12. C13: Complejo de retardación C13. C14: Complejo de retardación C14. C15: Complejo de retardación C15. C21: Complejo de retardación C21. C25: Complejo de retardación C25.

Las sondas utilizadas abarcaban diferentes zonas de la región P_{hpxO-P} (ANEXOS 1. y 2.). Se obtuvieron mediante PCR, utilizando los cebadores que se especifican en el ANEXO 1. y, una vez purificadas, fueron marcadas radiactivamente con ^{32}P . Los extractos celulares se obtuvieron a partir de cultivos de la cepa KC2653 crecidos en GNGln, GNGlnHx, GNGlnUr, GGln, GGlnHx, GGlnUr, GHx y GUr.

En primer lugar, se realizó un ensayo de retardación con extractos de cultivos crecidos en GNGln (exceso de nitrógeno), GGln (limitación de nitrógeno) y GHx (hipoxantina como única fuente de nitrógeno) y las sondas Sop1, Sop2, Sop3 y Sop4 (FIGURA 4.32.) para identificar los posibles complejos de retardación que se forman en cada medio de cultivo y acotar la región que da lugar a la formación de tales complejos. Como muestra la FIGURA 4.32., con la sonda Sop2, más cercana al gen *hpxO*, se detectó un complejo de retardación

(C21) en el caso del extracto proveniente de un cultivo crecido bajo un exceso de nitrógeno (sonda Sop2, carril 2). Con la sonda Sop4 se detectó un complejo de retardación (C25) asociado a condiciones limitantes de nitrógeno e hipoxantina como única fuente de nitrógeno (sonda Sop4, carriles 3 y 4). Con las sondas Sop1 y Sop3 se distinguen 5 complejos de retardación, lo que significa que la mayoría de factores se unen a la región más cercana al operón *hpxPQT*. Por el patrón que muestran estos complejos de retardación es muy probable que los complejos C01-C05 (Sop1) estén formados por las mismas proteínas que forman parte de los complejos C11-C15 (Sop3), respectivamente. Los complejos C01/C11 y C02/C12 aparecen cuando se utilizan extractos provenientes de cultivos crecidos con un exceso de nitrógeno. Los complejos C03/C13, C04/C14 y C05/C15, en cambio, se detectan cuando se utilizan extractos de cultivos crecidos con nitrógeno limitante o hipoxantina como única fuente de nitrógeno.

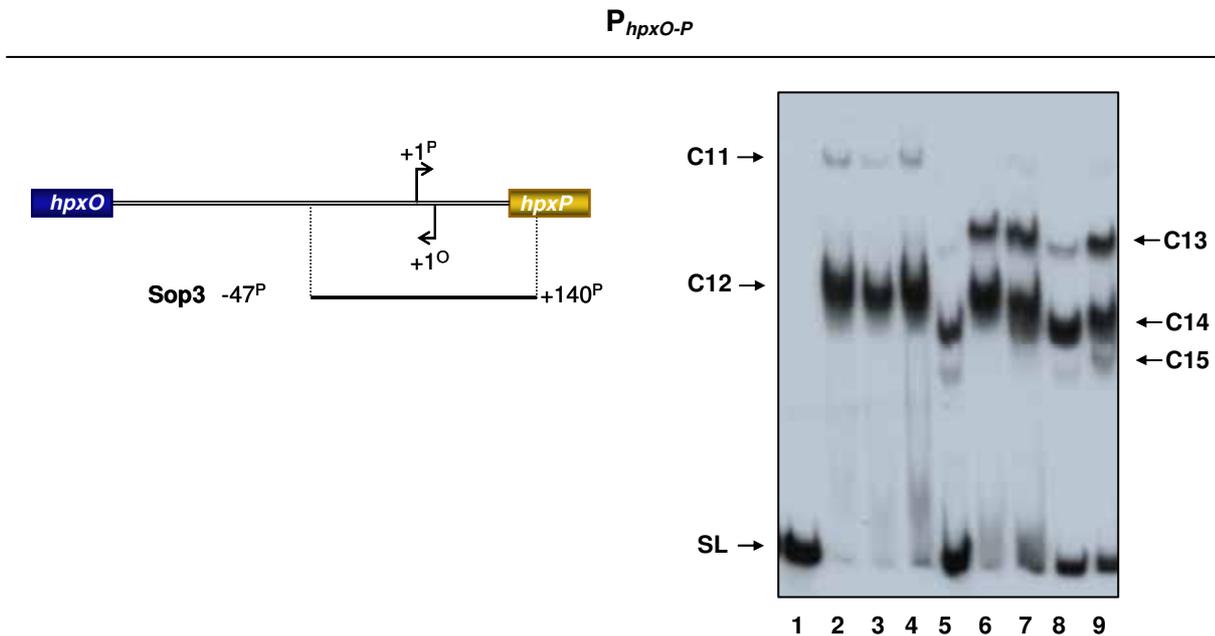


FIGURA 4.33.: Estudio de retardación de la movilidad electroforética (EMSA) de la sonda Sop3 correspondiente, a la región intergénica $P_{hpxO-hpxP}$, llevado a cabo con extractos celulares de cultivos de la cepa KC2653 crecidos bajo distintas condiciones de nitrógeno. En la parte izquierda se muestra un esquema de la sonda utilizada, especificando las posiciones de los nucleótidos situados a ambos extremos de la sonda con respecto al inicio de transcripción del operón *hpxPQT* ($^{\circ}$). La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida al 5%. Todas las mezclas de reacción contenían un exceso de 500mM de poli(dI-dC). La mezcla de reacción contenía 25nm de sonda y 5 μ g de extracto celular. 1: Sonda libre. 2: GNGln. 3: GNGlnHx. 4: GNGlnUr. 5: GGln. 6: GGlnHx. 7:GGlnUr. 8: GHx. 9: GUr. SL: Sonda libre. C11: Complejo de retardación C11. C12: Complejo de retardación C12. C13: Complejo de retardación C13. C14: Complejo de retardación C14. C15: Complejo de retardación C15.

Puesto que Sop3 es la sonda más pequeña que forma el máximo número de complejos de retardación, nos propusimos ampliar el estudio mediante EMSAs utilizando esta sonda y extractos celulares obtenidos a partir de cultivos crecidos en las mismas condiciones utilizadas en los estudios de expresión mediante fusiones de promotor a *lacZ*.

En el ensayo de retardación que se presenta en la FIGURA 4.33. se aprecian los 5 complejos de retardación identificados anteriormente (FIGURA 4.32.). La relación entre los complejos, las condiciones de crecimiento y la actividad β -galactosidasa de la fusión $\Phi(hpxP-lacZ)$, determinada con anterioridad, se detalla en la TABLA 4.12. Cuando las células crecieron con un exceso de nitrógeno, tanto en ausencia como en presencia de purinas (carriles 2, 3 y 4), se detectan los complejos de retardación C11 y C12. Algunas de las

proteínas que forman parte de estos complejos podrían estar implicadas en la represión del operón *hpxPQT* en esas condiciones.

Cuando se utilizan extractos de cultivos que han crecido en GGIn, GHx o GUR (carriles 5, 8 y 9) se detectan los complejos C13, C14 y C15. Estos complejos estarían asociados a la inducción por limitación de nitrógeno y presencia de purinas. Cuando las células crecieron en GGInHx o GGInUr (carriles 6 y 7) los complejos detectados son C13 y un complejo que presenta la misma movilidad electroforética que C12. Los resultados sugieren que el complejo C13 podría estar formado, al menos, por el regulador cuya molécula inductora es el ácido úrico.

TABLA 4.12.: Relación existente entre los complejos de retardación detectados mediante EMSAs con la sonda Sop3 y extractos celulares, las condiciones de crecimiento de los cultivos utilizados para la obtención de los extractos y la actividad β -galactosidasa, determinada previamente a partir de la fusión Φ (*hpxP-lacZ*).

CONDICIÓN DE NITRÓGENO	ACTIVIDAD β -GAL (U/mg)	COMPLEJOS DE RETARDACIÓN
GNGIn	44,19	C11, C12
GNGInHx	42,47	C11, C12
GNGInUr	47,54	C11, C12
GGIn	347,57	C13, C14, C15
GGInHx	1.944	C12, C13
GGInUr	1.109	C12, C13
GHx	4.170	C13, C14, C15
GUR	3.893	C13, C14, C15

Al inicio del estudio de la regulación del sistema *hpx* se identificaron en la región P_{hpxO-P} varias secuencias de unión de la proteína IHF (RESULTADOS 4.4.1.1.). Debido a la longitud de la región intergénica P_{hpxO-P} , parecía probable la implicación de proteínas que curvan el DNA en la regulación de la transcripción del gen *hpxO* y/o del operón *hpxPQT*. En el laboratorio disponíamos de cepas mutantes de *E. coli* en los genes *himA*, *fis* y *hns* que codifican, respectivamente, los factores que curvan el DNA IHF, FIS y HN-S. Ya que estas proteínas de *E. coli* mantienen una identidad del 98%, 100% y 94% con las proteínas ortólogas de *K. pneumoniae*, nos propusimos llevar a cabo ensayos de retardación con extractos de las cepas mutantes de *E. coli*, con el objetivo de identificar el factor que se une a la región P_{hpxO-P} .

Para ello se obtuvieron, en primer lugar, extractos celulares a partir de cultivos de las cepas de *E. coli* ECL1, HN1491 (*himA*), RJ1802 (*fis*) y BSN27 (*hns*) crecidos en GGIn. Además se sintetizó la sonda Sop5 (ANEXOS 1. y 2.), cuyo extremo 3' se localiza entre los extremos 3' de las sondas Sop3 y Sop4 (FIGURA 4.34.). La sonda se amplificó por PCR y, una vez purificada, se marcó radioactivamente con ^{32}P .

Los resultados que se muestran en la FIGURA 4.34. indican que los complejos de retardación C13, C14, C15 (sonda Sop3, carril 2) y C33 (sonda Sop5, carril2) son específicos de *K. pneumoniae*. Con respecto a la sonda Sop3, utilizando los extractos de *E. coli* se detecta el complejo C1IHF (carriles 3-5). En el caso de la sonda Sop5 se detecta un complejo con la misma movilidad electroforética tanto en el caso de *K. pneumoniae* (carril 2) como de *E. coli* (carriles 3-5) denominado C2IHF. Los complejos C1IHF y C2IHF se pueden asociar a la unión de IHF ya que no se detecta su formación en el caso de la cepa mutante

HN1491 (sonda Sop3, carril 6 y sonda Sop5, carril 6). Los resultados obtenidos, y en base a la intensidad de las bandas correspondientes a los complejos C14, C1IHF y C2IHF, sugieren que el complejo C14 formado con la sonda Sop3, de mayor longitud que la sonda Sop5, está constituido por IHF y por proteínas específicas de *K. pneumoniae*. Estas proteínas podrían unirse al DNA a través de elementos localizados en la secuencia nucleotídica que diferencia a la sonda Sop3 de la sonda Sop5. La presencia de esta secuencia en la sonda Sop3 favorece la unión de estas proteínas y por ello el complejo C14 presenta una menor movilidad electroforética que C1IHF.

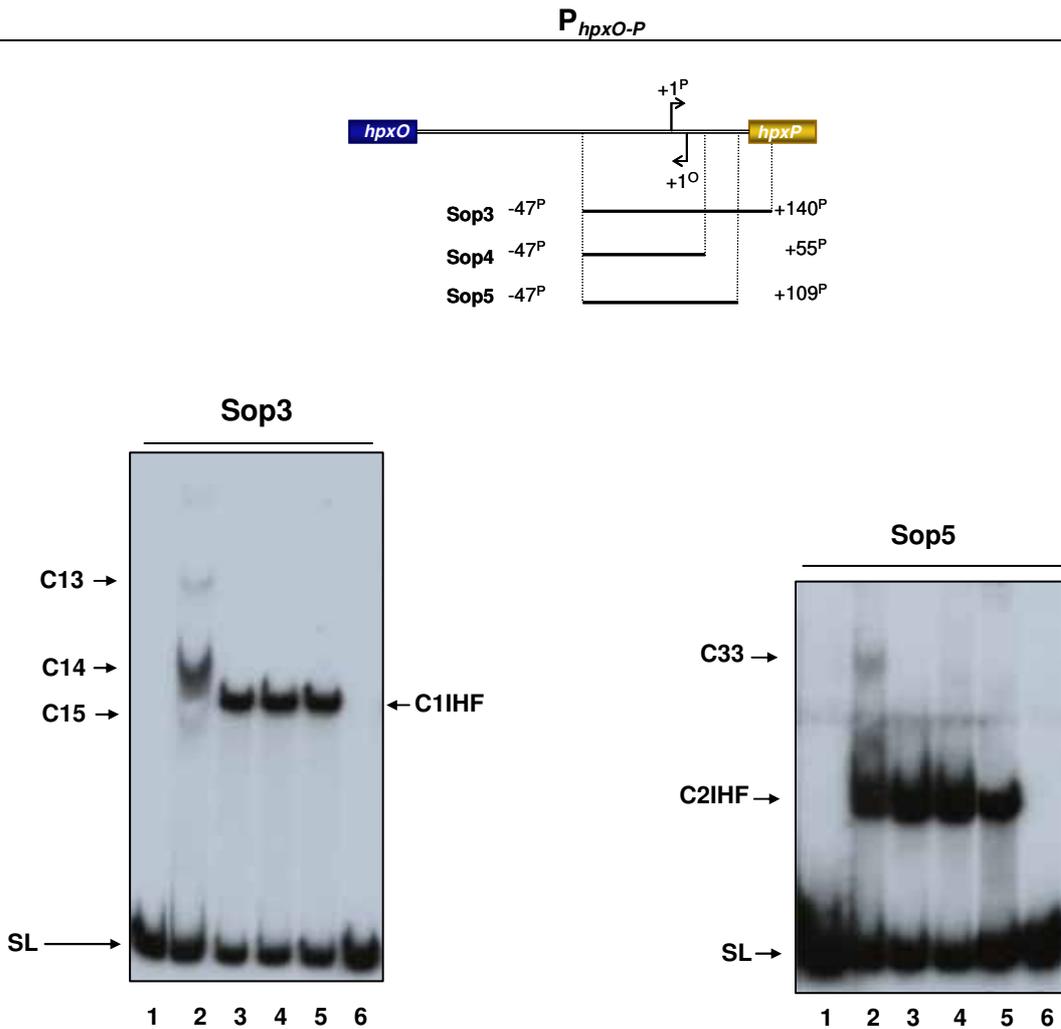


FIGURA 4.34.: Estudios de retardación de la movilidad electroforética (EMSA) de las sondas Sop3 y Sop5, correspondientes a distintos fragmentos de la región intergénica *hpxO-hpxPQT* llevados a cabo con extractos celulares. En la parte superior se muestra un esquema de las sondas utilizadas, especificando las posiciones de los nucleótidos situados a ambos extremos de cada sonda con respecto al inicio de transcripción del operón *hpxPQT* (^P). Se incluye la sonda Sop4 utilizada en el ensayo de retardación mostrado en la FIGURA 4.32. La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida al 5%. Todas las mezclas de reacción contenían un exceso de 500mM de poli(dI-dC). La mezcla de reacción contenía 25nm de sonda y 5µg de extracto celular obtenido a partir de cultivos, crecidos en GGln, de *K. pneumoniae* KC2653 (carril 2), *E. coli* ECL1 (carril 3), RJ1892 (carril 4), BSN27 (carril 5) y HN1491 (carril 6). 1: Sonda libre. C13: Complejo de retardación C13. C14: Complejo de retardación C14. C15: Complejo de retardación C15. C4: Complejo de retardación C4. C1IHF: Complejo de retardación C1IHF. C33: Complejo de retardación C33. C2IHF: Complejo de retardación C2IHF. SL: Sonda libre.

Además, ya que ninguna banda de la intensidad correspondiente a los complejos formados por IHF se detecta con la sonda Sop4 (FIGURA 4.32.), cuyo extremo 3' se encuentra más próximo al inicio de transcripción de P_{hpxP} (FIGURA 4.32. y 4.34.), IHF no se uniría a la sonda Sop4 y, por tanto, quedaría más acotada la posible región de unión de IHF (En gris, en la FIGURA 4.35.). En esta región se encuentra una de las secuencias de unión de IHF identificadas en RESULTADOS 4.4.1.1. (FIGURA 4.35.), localizada entre las posiciones +69 y +82 respecto al inicio de transcripción de P_{hpxP} , y que podría ser la diana reconocida por IHF en la cepa de *K. pneumoniae* KC2653.

A)

SONDA	LOCALIZACIÓN	COMPLEJO		
		KC2653	<i>E. coli</i> ECL1	<i>E. coli</i> HN1491
Sop3	-47/+140	C14	C1IHF	NA
Sop5	-47/+109	C2IHF	C2IHF	NA
Sop4	-47/+55	NA	ND	ND

B)

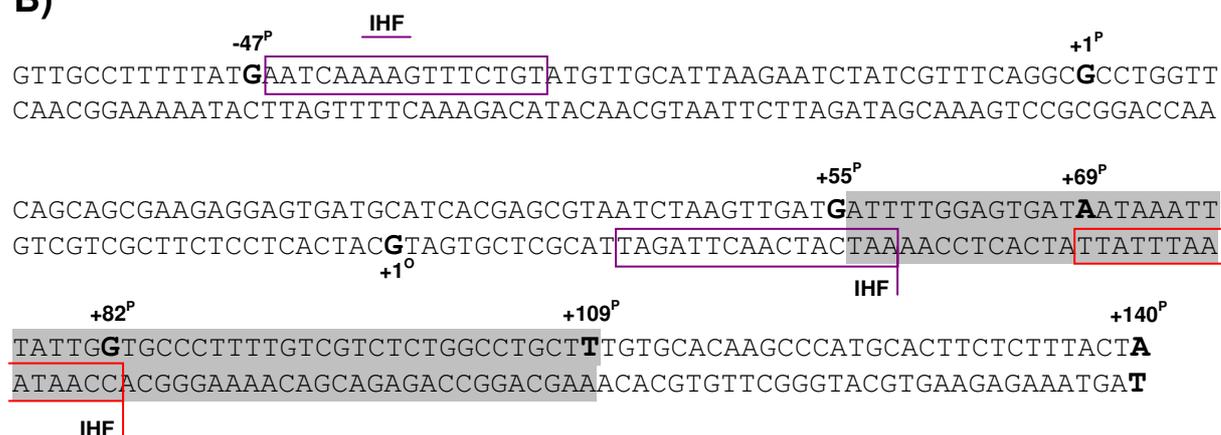


FIGURA 4.35.: Identificación de la secuencia de unión de IHF a la región P_{hpxO-P} . Panel A: Relación existente entre las sondas Sop3, Sop4 y Sop5 y los complejos de retardación asociados a IHF que se forman con los extractos obtenidos de cultivos de KC2653 y las cepas de *E. coli* ECL1 y HN1491, crecidos en GGIn. La localización de las sondas se expresa en función del inicio de transcripción de P_{hpxP} . NA: No aparece. ND: No determinado experimentalmente. Panel B: Localización de las secuencias de unión de IHF en la región P_{hpxO-P} . Se indican las posiciones relativas al inicio de transcripción del gen $hpxO$ (^O) y del operón $hpxPQT$ (^P). En gris se destaca la región de unión de IHF a la región P_{hpxO-P} , acotada mediante EMSA. En un recuadro rojo se destaca la secuencia que sería reconocida por el factor IHF asociado a los complejos C14 y C2IHF.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DE LA ASIMILACIÓN DE HIPOXANTINA EN EL HÁBITAT DE *K. pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae es una bacteria que, en el hombre, forma parte de la flora intestinal, aunque en menor número que *E. coli*. Además, esta enterobacteria puede encontrarse en los tractos respiratorio y urinario. Sin embargo, existen cepas que pueden ser patógenos oportunistas causantes de bacteriemia, neumonía e infecciones de las vías urinarias. En estos casos, la competencia por el hábitat con el resto especies microbianas que cohabitan en el huésped es fundamental para que los patógenos puedan colonizar su nicho ecológico.

En los últimos años se han descrito numerosos casos de infecciones hepáticas causadas por *K. pneumoniae*, especialmente en EEUU y Taiwan (Lederman y Crum, 2005; Yang *et al.*, 2004). La enfermedad diabetes mellitus suele ser un factor de riesgo en los pacientes con ese tipo de infecciones (Cheng *et al.*, 1991). En pacientes con diabetes mellitus, así como con otras patologías, los niveles de alantoína son más elevados que en individuos sanos (Benzie *et al.*, 1999). La producción de alantoína en el hombre, que no posee la enzima uricasa, se debe a la oxidación de ácido úrico llevada a cabo por especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas durante periodos de estrés oxidativo (Kaur y Halliwell, 1990). Cepas patógenas de *K. pneumoniae* aisladas de abscesos hepáticos se caracterizan por presentar el regulón *all*, un sistema génico implicado en la utilización, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, de alantoína como fuente de nitrógeno y de carbono (Chou *et al.*, 2004). De esta manera, la presencia del regulón *all* podría suponer una ventaja para las cepas patógenas en su competencia por el hábitat.

La cepa de laboratorio KC2653, así como otras cepas no patógenas, pueden utilizar aeróbicamente alantoína como fuente de nitrógeno. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que estas cepas también pueden metabolizar alantoína en condiciones anaeróbicas. Sin embargo, las cepas de *K. pneumoniae* analizadas en este trabajo no contienen el regulón *all* descrito por Chou *et al.* La cepa MGH78578, cuyo genoma se ha hecho público recientemente, tampoco tiene el regulón *all*, pero esta cepa no puede utilizar alantoína ni aeróbica ni anaeróbicamente (Chou *et al.*, 2004). Estos resultados apuntan a que las cepas no patógenas presentes en nuestro laboratorio contienen un sistema génico implicado en el catabolismo de alantoína distinto del regulón *all*. Ello pone de manifiesto la variabilidad existente entre las distintas cepas de *K. pneumoniae* (Martínez *et al.*, 2004; Brisse y Verhoef, 2001). De hecho, a diferencia de los aislados patógenos analizados por Chou *et al.*, la cepa KC2653 no puede metabolizar alantoína como fuente de carbono.

Ya que al inicio de este trabajo no existían publicaciones sobre la genética del metabolismo de los precursores de alantoína, creímos de interés centrar nuestro estudio en el metabolismo de hipoxantina. Esta purina se genera por desaminación de la adenina. La cepa KC2653 y el resto de cepas analizadas pueden utilizar adenina e hipoxantina como fuentes de nitrógeno en condiciones aeróbicas. La utilización de purinas como fuentes de nitrógeno requiere la formación y posterior catabolismo de alantoína. Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio sobre el crecimiento anaeróbico de *K. pneumoniae* indican que en ausencia de oxígeno las cepas analizadas no pueden metabolizar hipoxantina y sólo asimilan uno de los nitrógenos de la adenina. El hecho de que en condiciones anaeróbicas estas cepas pueden asimilar un nitrógeno de la adenina y pueden catabolizar alantoína indica que la/s reacción/es del metabolismo de purinas limitada/s por la presencia de oxígeno es/son la oxidación de hipoxantina y/o la oxidación de ácido úrico. Adicionalmente, la cepa KC2653 tampoco puede utilizar hipoxantina como fuente de carbono.

En este trabajo hemos identificado y caracterizado el sistema génico *hpx* de la cepa de *K. pneumoniae* KC2653, responsable de la oxidación de hipoxantina a alantoína en condiciones aeróbicas. Este sistema génico permite la utilización de purinas como fuentes de nitrógeno en condiciones limitantes de nitrógeno. La cepa de *K. pneumoniae* MGH78578 también posee este sistema génico. Sin embargo esta cepa no puede metabolizar alantoína, lo que limitaría la capacidad de utilizar hipoxantina como fuente de nitrógeno. La presencia del sistema *hpx* en la cepa MGH78578 podría deberse a dos motivos. O bien constituye un sistema críptico, o bien los genes *hpx* están implicados en una ruta distinta de la utilización aeróbica de purinas como fuentes de nitrógeno. Este último planteamiento se expondrá con más detalle posteriormente.

A diferencia de *K. pneumoniae*, *E. coli* sólo puede asimilar uno de los nitrógenos de la adenina en condiciones aeróbicas. En estas condiciones, *E. coli* no puede utilizar ni hipoxantina ni alantoína como fuentes de nitrógeno. Ello se debe a que el regulón *all*, implicado en la asimilación de alantoína sólo es activo en condiciones anaeróbicas (Cusa *et al.*, 1999). Una vez asimilado el nitrógeno del grupo amino de la adenina, no se liberan más moléculas de amonio hasta la reacción catalizada por la alantoato amidohidrolasa (FIGURAS 1.1. y 1.2.), cuyo gen forma parte del regulón *all*. Según describieron Xi *et al.*, 2000 aunque la adenina no puede ser asimilada completamente como fuente de nitrógeno en condiciones aeróbicas, una vez desaminada, la hipoxantina producida es oxidada hasta alantoína. Sin embargo estos autores no pudieron determinar la actividad XDH asociada a las unidades transcripcionales *xdhABC* y *xdhD* localizadas en el min 65. Ya que *E. coli* sólo puede metabolizar alantoína anaeróbicamente, se podría postular que en esas condiciones esta bacteria puede utilizar hipoxantina como fuente de nitrógeno. Sin embargo, resultados obtenidos en nuestro laboratorio, no mostrados en este trabajo, indican que en condiciones anaeróbicas *E. coli* tampoco puede utilizar hipoxantina como fuente de nitrógeno y sólo puede asimilar uno de los nitrógenos de la adenina. Todos estos datos ponen de manifiesto la carencia de una XDH y/o una uricasa funcional en condiciones anaeróbicas en *E. coli*.

Comparando las capacidades metabólicas de *K. pneumoniae* y *E. coli* nos podemos preguntar qué ventaja para la primera supone la utilización de hipoxantina y alantoína en condiciones aeróbicas, considerando que ambas especies de enterobacterias habitan normalmente en el intestino, el cual constituye un ambiente anaeróbico. Hay que tener en cuenta que *K. pneumoniae* puede habitar en el sistema respiratorio, claramente aeróbico, el cual también puede ser colonizado por cepas patógenas de esta bacteria. Peden *et al.*, 1990 mostraron que las secreciones de la mucosa de las vías respiratorias superiores, habitualmente expuestas a elevadas tensiones de oxígeno, contienen ácido úrico, el cual desempeña una función antioxidante. Esta función del ácido úrico ya era conocida, de hecho este compuesto es considerado el principal antioxidante en el plasma humano (Halliwell y Gutteridge, 1990). Ya que las secreciones de la mucosa de las vías respiratorias contienen ácido úrico, la capacidad de *K. pneumoniae* de asimilar este compuesto en condiciones aeróbicas podría constituir una ventaja en la competencia de las cepas patógenas por el hábitat.

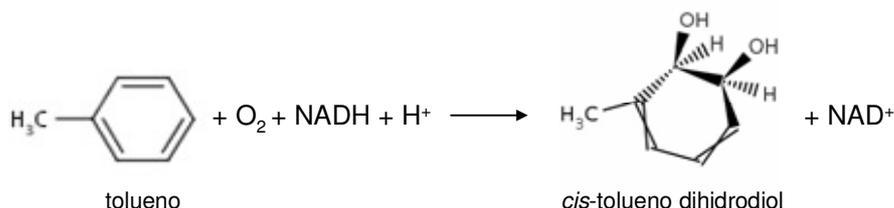
5.2. EL SISTEMA *hpx* CODIFICA PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA OXIDACIÓN DE HIPOXANTINA A ALANTOÍNA

El sistema *hpx* está compuesto por cuatro unidades transcripcionales: *hpxDE*, *hpxR*, *hpxO* y *hpxPQT*. Las unidades *hpxDE* y *hpxR* se transcriben divergentemente y sus promotores se encuentran solapados. De la misma manera, las unidades *hpxO* y *hpxPQT* también se transcriben de manera divergente y sus promotores están solapados. El gen *hpxP* codifica un transportador de purinas. El operón *hpxDE* está implicado en la oxidación de hipoxantina a ácido úrico. El gen *hpxO* está implicado en la oxidación de ácido úrico, muy

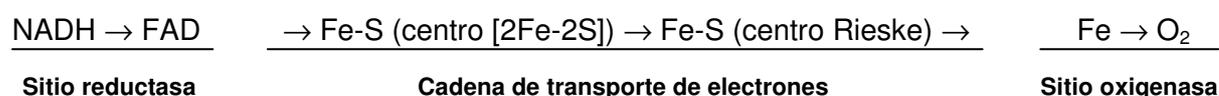
probablemente hasta el intermediario HIU, de tal manera que los productos de los genes *hpxT* y *hpxQ* podrían catalizar la oxidación de los intermediarios HIU y OHCU, respectivamente, para generar alantoína. Por último, *hpxR* codifica un regulador del tipo LysR que actúa como activador del operón *hpxDE* y como represor de su propio gen. En base a la organización génica del sistema *hpx* (FIGURA 4.2.) y a la implicación de sus genes en una misma ruta metabólica, se podría plantear que sus unidades transcripcionales constituyen un regulón. Los genes del sistema *hpx* se transcriben de manera coordinada en condiciones limitantes de nitrógeno y presencia de purinas. Sin embargo, su regulación no está mediada por las mismas proteínas reguladoras. Por ejemplo, los resultados obtenidos en este trabajo han permitido identificar la proteína HpxR como un regulador común únicamente de las unidades *hpxDE* y *hpxR*.

Puesto que mutantes en los genes *hpxD* o *hpxE* son incapaces de utilizar hipoxantina como fuente de nitrógeno, pero si pueden metabolizar ácido úrico, parece lógico pensar que estos genes codifican subunidades de la enzima XDH. Sin embargo las proteínas HpxD y HpxE no se parecen a las XDH descritas hasta el momento, sino más bien a dioxigenasas de compuestos aromáticos. Además, ha sido imposible detectar actividad XDH a partir del producto de expresión de un clon del operón *hpxDE*. Por otra parte, el sistema *hpx* no contiene ningún gen cuyo producto génico requiera la unión del MoCo. Ya en 1992, Garzón *et al.* describieron una posible ruta de utilización de hipoxantina independiente de molibdeno en *K. pneumoniae* M5a1. Estos autores obtuvieron un mutante en la vía de síntesis del MoCo que mantenía la capacidad de utilizar hipoxantina como fuente de nitrógeno. Por otra parte, tampoco se han identificado posibles subunidades de XDH en el genoma de la cepa MGH78578, que también contiene el sistema *hpx*.

Muchos microorganismos son capaces de degradar compuestos aromáticos, cuyo núcleo estructural es el anillo de benceno. Generalmente la rotura de la estructura cíclica de estos compuestos y su posterior catabolismo requiere la previa introducción de dos grupos hidroxilo (Mason y Cammack, 1992). Como ejemplo se muestra la oxidación de tolueno:



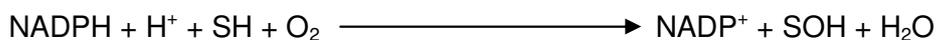
Existen varios tipos de dioxigenasas, pero todas las descritas hasta el momento tienen la característica común de preferir NADH como donador de electrones y O_2 como donador de los átomos de oxígeno (Mason y Cammack, 1992). Uno de estos tipos, las dioxigenasas de clase IB, consiste en las enzimas implicadas en la hidroxilación de anillos aromáticos, constituidas por dos componentes. Uno de estos componentes es una oxidoreductasa que contiene FAD y centros $[2\text{Fe}-2\text{S}]$. El otro es un oxigenasa que contiene el centro ferrosulfurado *Rieske* y un sitio de unión a Fe. Los centros $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ y *Rieske* se diferencian en que están coordinados a la proteína por distintos aminoácidos (Ferraro *et al.*, 2005). En este tipo de dioxigenasas, el transporte de electrones sigue el siguiente flujo:



En función del parecido de la proteína HpxD con oxigenasas de compuestos aromáticos que contienen el centro *Rieske* y de la proteína HpxE con oxidorreductasas del mismo tipo de compuestos que contienen centros [2Fe-2S] y unen FAD y NAD⁺, es muy probable que HpxD y HpxE constituyan una dioxigenasa de clase IB. Anteriormente Cultrone *et al.*, 2005 ya habían descrito la existencia de una xantina dioxigenasa (XanA) dependiente de α -cetoglutarato en *A. nidulans*. La proteína XanA no es una dioxigenasa de clase IB y tampoco se asemeja a las proteínas HpxD o HpxE. La estructura heterocíclica del ácido úrico contiene dos átomos de oxígeno adicionales con respecto a la estructura de la hipoxantina (FIGURA 1.1.) y, durante el catabolismo de las purinas, se rompe para generar la molécula lineal de alantoína. Estas características recuerdan a las reacciones que inician la degradación microbiana de compuestos aromáticos.

De manera similar a lo que ocurre con las proteínas HpxD y HpxE, el producto génico del gen *hpxO* tampoco se parece a las enzimas que típicamente catalizan la reacción en la que este gen está implicado. Un mutante en el gen *hpxO* no puede utilizar ácido úrico, pero sí alantoína, como fuente de nitrógeno. Por ello se propuso en un principio que HpxO es una uricasa. Sin embargo HpxO no se parece a las uricasas descritas, las cuales típicamente no unen cofactores, sino más bien a monooxigenasas dependientes de FAD o FMO (*Flavin containing MonoOxygenases*). Además, tampoco se pudo detectar actividad uricasa a partir del producto de expresión de un clon del gen *hpxO*.

Las FMO están implicadas en procesos de detoxificación de compuestos xenobióticos. Su principal función consiste en introducir un átomo de oxígeno en la estructura de los sustratos para aumentar su solubilidad y favorecer, de esta manera, su excreción (Eswaramoorthy *et al.*, 2006). Las FMO utilizan el NADPH para reducir uno de los átomos de O₂ a H₂O, mientras que el otro átomo de oxígeno es utilizado para oxidar el sustrato (S) (Jokanović, 2001):



La transformación de ácido úrico al intermediario HIU consiste en la introducción de un grupo hidroxilo (FIGURA 1.1.). De esta manera proponemos que HpxO podría ser una FMO que lleva a cabo esta reacción, de tal manera que el producto, HIU, sería posteriormente transformado por los productos génicos HpxT y HpxQ, similares a HIU hidrolasas y OHCU descarboxilasas respectivamente, para generar alantoína. De hecho existen FMO que oxidan cafeína, la cual tiene una estructura purínica (Lang y Rettie, 2000).

Las dioxigenasas y FMO tienen una amplia especificidad de sustrato (Morawsky *et al.*, 2000; Ziegler, 1993). Cabe señalar que la asimilación de hipoxantina como fuente de nitrógeno depende de la existencia de una vía para la degradación de alantoína. La presencia del sistema *hpx* en cepas como MGH78578, la cual es incapaz de metabolizar alantoína, sugiere funciones alternativas para este sistema génico.

La incapacidad de la cepa KC2653 de utilizar hipoxantina como fuente de nitrógeno en condiciones anaeróbicas puede explicarse en base a que la oxidación de hipoxantina, catalizada por la dioxigenasa constituida por HpxD y HpxE, y la oxidación de ácido úrico, catalizada por la FMO HpxO, son reacciones dependientes de O₂. Respecto a la determinación de actividades enzimáticas, la metodología empleada para determinar las actividades XDH y uricasa podría servir, en principio, para determinar la actividad de las proteínas HpxDE y HpxO, ya que se basa en la determinación espectrofotométrica de NADH (MÉTODOS 3.2.6.1.) y ácido úrico (MÉTODOS 3.2.6.2.), respectivamente. Sin embargo, no se pudo detectar actividad enzimática asociada a estas proteínas. Seguramente las proteínas HpxDE y HpxO requieran algún elemento o compuesto para llevar a cabo la catálisis que no se encontraba presente en la mezcla de reacción. Anteriormente Xi *et al.*, 2000 identificaron en *E. coli* un operón que codifica una XDH trimérica y un gen que codifica una XDH

monomérica. Estos autores tampoco pudieron detectar actividad XDH a partir de cepas que contenían estos sistemas clonados en un vector multicopia. De esta manera, la caracterización funcional de estos genes la llevaron a cabo mediante la cuantificación de $^{14}\text{CO}_2$ producido a partir de [^{14}C]-adenina por la cepa parental y por cepas mutantes en tales genes. Respecto a la actividad uricasa de la proteína HpxO, la posibilidad de que el gen *hpxT* codifique la HIU hidrolasa implicaría la coexistencia de HpxO y HpxT para que el ácido úrico sea oxidado. En este trabajo, la determinación de actividad uricasa se llevó a cabo en una cepa que solamente contenía el gen *hpxO* clonado en un vector multicopia.

En cuanto a la caracterización funcional del gen *hpxP*, el hecho de que no hayamos detectado diferencias fenotípicas entre el mutante en este gen y la cepa parental KC2653 se puede deber a la presencia de otros transportadores de purinas. Resultados parecidos obtuvieron Diallinas y Scazzocchio, 1989 y Karatza y Frillingos, 2005 en sus estudios sobre los transportadores de purinas de *A. nidulans* y *E. coli*, respectivamente. De hecho, en el genoma de la cepa MGH78578 existen, al menos, dos posibles genes más implicados en el transporte de purinas (nº acceso KPN_04013 y KPN_02555). Por ello, el estudio a nivel cromosómico de un gen implicado en el transporte de purinas requiere ser llevado a cabo en un fondo genómico mutante en el resto de genes con función similar (Diallinas *et al.*, 1995 y Cecchetto *et al.*, 2004). Durante el desarrollo de este trabajo se intentó proceder a la caracterización del producto génico del gen *hpxP* mediante su clonaje en el vector pBR322. Sin embargo, la expresión constitutiva de dicho gen en un vector multicopia resultó letal, por lo que no fue posible llevar a cabo los ensayos de transporte de hipoxantina planteados.

El producto génico del gen *hpxP* es similar a permeasas de xantina y uracilo. Además, el gen ortólogo en la cepa MGH78578 (nº acceso KPN_01664) codifica, según los datos de Genbank, una permeasa de guanina y xantina. En base a estas semejanzas y a que el operon *hpxPQT* se induce en presencia de ácido úrico, probablemente HpxP es un transportador de xantina y ácido úrico, como UapA de *A. nidulans* (Gorfinkiel *et al.*, 1993). El dominio xan_ur_permease identificado en la secuencia de aminoácidos de la proteína HpxP también se encuentra en transportadores de la familia NAT (Koning y Diallinas, 2000), como UapA o PbuX de *B. subtilis* (Christiansen *et al.*, 1997). Por ello proponemos que la permeasa HpxP puede pertenecer a esta familia de transportadores.

De manera similar a lo que ocurre con la mayoría de reguladores LysR, HpxR regula la expresión de su propio gen, el cual se expresa constitutivamente, y del operón divergente *hpxDE*. El fenotipo hipoxantina negativo/ácido úrico positivo de un mutante en el gen *hpxR* y los resultados obtenidos en los estudios de fusión de los promotores P_{hpxD} y P_{hpxR} llevados a cabo en el fondo genómico de la cepa tipo salvaje y de un mutante en el gen *hpxR*, mostraron que el regulador HpxR es un activador del operón *hpxDE* y un represor de su propio gen. Además, se ha demostrado que la hipoxantina es la molécula efectora de este regulador. Sin embargo, nuestros resultados indican que la interacción con hipoxantina no es indispensable para la unión de HpxR a la región intergénica P_{hpxD-R} . Por una parte, los EMSAs realizados con la proteína HpxR purificada, en los que se detectó el complejo de retardación HpxR- P_{hpxD-R} , se llevaron a cabo en ausencia de hipoxantina. Además, la adición de hipoxantina a la mezcla de reacción no provocó cambios ni en la intensidad ni en el número de complejos de retardación asociados a HpxR (FIGURA 4.30.). Por otra parte, en condiciones limitantes de nitrógeno y en ausencia de hipoxantina en el medio de cultivo (GGIn) el operón *hpxDE* es inducido, y parte de esa inducción se asocia al regulador HpxR (FIGURA 4.26.). Por último, en los estudios de EMSA llevados a cabo con extractos celulares provenientes de cultivos crecidos en el mismo medio de cultivo se detecta el complejo de retardación HpxR- P_{hpxD-R} . Probablemente la hipoxantina provoca un cambio de conformación de la proteína HpxR que favorece la formación del complejo abierto DNA-RNA polimerasa. Este caso sería entonces similar al de los reguladores CatR y NahR de *P. putida* (Parsek *et al.*, 1992; Schell *et al.*, 1989), MetR de *E. coli* y *S. typhimurium* (Urbanowsky *et al.*, 1985) y TrpI de *Pseudomonas spp.* (Gao y Gussin, 1991). Estas proteínas se pueden unir a los

promotores que regulan en ausencia de la molécula efectora y esta unión puede provocar el inicio de la transcripción del gen activado. La interacción de la molécula efectora con estos reguladores estimula o potencia la unión de la RNA polimerasa al promotor y, por tanto, la transcripción. La regulación mediada por la proteína TrpI se detalla en DISCUSIÓN 5.3.2.

La represión del gen *hpxR* por su propio producto génico tiene lugar mediante la unión de HpxR a alguno de los dos RBS (*Repressor Binding Site*) del operón *hpxDE* identificados (FIGURA 4.25), ya que estos RBS se encuentran a 3' respecto el inicio de transcripción de *hpxR*. Este mecanismo de control permite autorregular los niveles de proteína reguladora. En base a las características de los promotores dependientes de reguladores LysR, la activación del operón *hpxDE* requeriría la unión de HpxR, además, a la secuencia ABS (*Activator Binding Site*) que, se localizaría en torno a la caja -35 de la unidad *hpxDE*. Ya que *hpxDE* está sometido, además, a un control por niveles de nitrógeno, el modelo completo de regulación propuesto se explicará más adelante.

5.3. REGULACIÓN DUAL DEL SISTEMA *hpx*: POR NIVELES DE NITRÓGENO Y POR PRESENCIA DE PURINAS

El sistema génico *hpx* está sometido a una doble regulación, por niveles de nitrógeno y por presencia de los inductores hipoxantina y ácido úrico. Los operones *hpxDE* y *hpxPQT* constituyen las unidades transcripcionales regulables a ambos niveles. De esta manera, el metabolismo de hipoxantina como fuente de nitrógeno tiene dos puntos limitantes: la entrada del sustrato al interior celular (*hpxP*) y la oxidación de hipoxantina a ácido úrico (*hpxDE*). El gen regulador *hpxR* se expresa constitutivamente. Por último, los niveles de expresión del gen *hpxO* observados parecen indicar que éste se expresa de manera constitutiva o está muy poco regulado.

5.3.1. LA DOBLE REGULACIÓN DEL OPERÓN *hpxPQT* TIENE LUGAR MEDIANTE EL SISTEMA NTR, EN CONDICIONES LIMITANTES DE NITRÓGENO, Y POR PRESENCIA DE ÁCIDO ÚRICO

Los estudios de transporte de hipoxantina evidenciaron que el transporte de este compuesto es mayor en condiciones limitantes de nitrógeno que en condiciones de exceso de nitrógeno. Este resultado indicaba que la entrada de purinas al interior celular en *K. pneumoniae* podía estar regulada por los niveles de nitrógeno del medio. Resultados posteriores derivados de estudios llevados a cabo mediante RT-PCR indicaron que la expresión del gen *hpxP*, que codifica una permeasa de purinas, se encuentra reprimida en condiciones de exceso de nitrógeno y se induce en condiciones de nitrógeno limitantes y presencia de purinas.

La regulación por niveles de nitrógeno del operón *hpxPQT* tiene lugar a través del sistema NTR. La implicación de este sistema en el metabolismo de hipoxantina como fuente de nitrógeno se intuyó en primer lugar al obtener mutantes hipoxantina negativos, mediante inserción al azar de mini-Tn5 Km, en genes relacionados con NTR (*glnD* y *gltD*; TABLA 4.2.). En segundo lugar se identificaron, mediante un análisis *in silico* del promotor P_{hpxP} (TABLA 4.3. y FIGURA 4.11.), la secuencia de unión de la subunidad σ^{54} de la RNA polimerasa y dianas de los reguladores NtrC e IHF localizadas acorde con una regulación llevada a cabo por el sistema NTR, como la del operón *glnHPQ* (Claverie-Martin, 1991). Además, la hipótesis de una regulación del operón *hpxPQT* mediada por NTR concordaba con el hecho de que varios sistemas de transporte están regulados por la proteína NtrC (Reitzer y Schneider, 2001). En total se identificaron cuatro dianas de la proteína NtrC a 5' del inicio de transcripción del operón *hpxPQT*, de las cuales la más próxima a la secuencia de unión de

σ^{54} dista 47pb de la misma. El número de secuencias de unión de NtrC cumple el requisito de que la activación mediada por esta proteína requiere al menos dos de estas secuencias (Porter *et al.*, 1993). IHF facilitaría el contacto entre el oligómero de NtrC-P y la subunidad σ^{54} de la RNA polimerasa (Carmona *et al.*, 1997).

Posteriormente se obtuvieron otras evidencias de este tipo de regulación, como el hecho de que mutantes en los genes *rpoN* o *ntrC* son incapaces de utilizar hipoxantina como fuente de nitrógeno (TABLA 4.10.). La implicación del factor σ^{54} y el activador NtrC en la activación de la expresión del operón *hpxPQT* en condiciones limitantes de nitrógeno se confirmó mediante estudios de fusión de promotor (FIGURAS 4.14. y 4.15.). Los niveles de expresión alcanzados en un mutante en el gen *rpoN* y en un mutante en el gen *ntrC* son una cuarta parte de los alcanzados en la cepa tipo salvaje. Además, en estos estudios se observó que la proteína NAC podría tener un papel represor. Este planteamiento coincidiría, además, con el hecho de que un mutante en el gen *nac* puede utilizar hipoxantina como fuente de nitrógeno. Sin embargo, esta hipótesis no se corresponde con el hecho de que NAC tiene un papel activador de genes implicados en la utilización de malas fuentes de nitrógeno, como serían las purinas, ni con que los promotores de los genes estructurales regulados por NAC son dependientes de σ^{70} . Además, la localización de una única posible secuencia de unión de NAC, en torno a la posición +47 con respecto al inicio de transcripción de P_{hpxP} , identificada mediante análisis *in silico*, no coincide con el modelo de represión llevado a cabo por esta proteína, que requiere dos secuencias de unión. La represión por NAC del promotor de su propio gen, el único dependiente de σ^{54} regulado por esta proteína, tiene lugar mediante la unión, a la secuencia que separa las dianas de NtrC de la de σ^{54} , de un tetrámero que curva el DNA de manera que impide el contacto entre NtrC y σ^{54} (Feng *et al.*, 1995). La formación de este tetrámero requiere la unión de dos dímeros al DNA, cada uno de los cuales reconoce una diana de NAC (Rosario y Bender, 2005). La represión por NAC del gen *gdhA* se lleva a cabo de manera distinta pero también requiere la unión de NAC a dos dianas (Rosario y Bender, 2005; Goss *et al.*, 2002). El gen *gdhA* posee un promotor dependiente de σ^{70} . La unión de un dímero NAC en la posición -68 y de otro dímero en la posición +54 con respecto al inicio de transcripción de *gdhA*, provoca la formación del tetrámero que curva el DNA e impide la activación de la transcripción mediada por σ^{70} . Por ello, proponemos que el efecto de la mutación en el gen *nac* observado en el análisis del promotor P_{hpxP} mediante fusiones transcripcionales es una consecuencia de la alteración de otras vías metabólicas y no de una acción directa.

La regulación específica del operón *hpxPQT* tiene lugar en presencia de ácido úrico. Probablemente el ácido úrico es la molécula efectora de un activador que estaría asociado al complejo de retardación C13 que se detecta con extractos de células crecidas en presencia de ácido úrico o hipoxantina (cuya oxidación produce ácido úrico), siempre y cuando no haya un exceso de nitrógeno (FIGURA 4.33.). Este regulador no es HpxR ya que, por una parte esta proteína no se une *in vitro* a la región P_{hpxO-P} y, por otra parte, una mutación en el gen *hpxR* no tiene ningún efecto sobre la expresión de *hpxPQT* en presencia de ácido úrico. La no inducción del operón *hpxPQT* en un mutante *hpxR* en presencia de hipoxantina se debe a que dicho mutante es incapaz de formar ácido úrico a partir de hipoxantina.

De esta manera, bajo un exceso de nitrógeno el operón *hpxPQT* se encuentra reprimido debido a la inhibición del sistema NTR en tales condiciones. Esta represión no se ve afectada por la adición de ácido úrico. En condiciones limitantes de nitrógeno, la expresión de *hpxPQT* es activada por la proteína NtrC, la cual contactaría con la subunidad σ^{54} de la RNA polimerasa gracias a la curvatura del DNA producida por el factor IHF. La presencia de ácido úrico como única fuente de nitrógeno provoca, además, una inducción a través de un regulador específico que no ha sido identificado pero del que se tienen varias evidencias. Cuando las células se encuentran en un medio con nitrógeno limitante y ácido úrico (GGInUr) los niveles de expresión del operón *hpxPQT* son intermedios entre los

obtenidos con nitrógeno limitante (GGIn) y con ácido úrico como única fuente de nitrógeno (GUr; FIGURA 4.19). Además, el patrón de complejos de retardación que se detecta en EMSAs, llevados a cabo con sondas correspondientes a la región intergénica P_{hpxO-P} y extractos celulares provenientes de cultivos crecidos en GGInUr, es un híbrido entre los que aparecen con extractos de cultivos crecidos bajo un exceso de nitrógeno (NGIn o NGInUr) y los asociados a una limitación de nitrógeno (GGIn) o ácido úrico como única fuente de nitrógeno (GUr; FIGURA 4.33.). Esta situación (GGInUr) se podría corresponder con la condición de “semi-exceso de nitrógeno” mencionada por primera vez por Nygaard *et al.*, 2000 (INTRODUCCIÓN 1.2.3.1.).

A diferencia de lo que ocurre con el operón *hpxPQT*, el gen *hpxO* dependiente de σ^{70} no está regulado fuertemente. Las pequeñas diferencias entre los niveles de expresión alcanzados en las distintas condiciones analizadas, detectadas mediante estudios de fusiones de promotor (FIGURA 4.18.) y que tan sólo en algún caso alcanzan la magnitud de 2, podrían ser un efecto indirecto de la regulación del operón *hpxPQT*, cuyo promotor se encuentra solapado con el promotor P_{hpxO} . De esta manera, parece probable que el gen *hpxO* se exprese constitutivamente. Los estudios llevados a cabo mediante EMSAs permitieron confirmar una diana de unión de IHF distinta de la que intervendría en la activación del operón *hpxPQT* y localizada en la posición -39 respecto al inicio de transcripción de P_{hpxO} (FIGURA 4.35.). El factor IHF que se une a esta secuencia podría estar implicado en el mantenimiento de los niveles de expresión del gen *hpxO*. La proteína IHF pertenece a la familia de las *DNA bending protein*. Un ejemplo del mantenimiento de un nivel constante de expresión de un gen mediante la acción de una *DNA bending protein*, como es H-NS, es el del gen *ade* de *E. coli*. Este gen se describió en un principio como críptico debido a que no se había detectado actividad adenina desaminasa en células de *E. coli* (Matsui *et al.*, 2001). Posteriormente, Petersen *et al.*, 2002 mostraron que el factor H-NS lo mantiene silenciado. A pesar de que la expresión del gen *hpxO* no responde a las condiciones de nitrógeno del medio, la oxidación de ácido úrico catalizada por su producto génico está regulada indirectamente a través del control de la entrada de este compuesto al interior celular (*hpxP*) y de su producción mediante la oxidación de hipoxantina (*hpxDE*). Además, están reguladas las actividades enzimáticas asociadas con HpxO en la oxidación completa de ácido úrico a alantoína (*hpxQT*).

5.3.2. LA DOBLE REGULACIÓN DEL OPERÓN *hpxDE* TIENE LUGAR MEDIANTE UN REPRESOR, EN ALTOS NIVELES DE NITRÓGENO, Y POR HIPOXANTINA, A TRAVÉS DEL REGULADOR HpxR

La regulación por nitrógeno del operón *hpxDE* suscita especial interés ya que es la primera vez que se describe en *K. pneumoniae* un sistema inducible por limitación de nitrógeno que no está bajo el control del sistema NTR. Los resultados preliminares sobre la regulación por nitrógeno del operón *hpxDE* sugieren la existencia de un represor, que actuaría en condiciones de exceso de nitrógeno y al que proponemos denominar NR (*Nitrogen Repressor*). En primer lugar, el promotor P_{hpxD} no contiene dianas de NAC, NtrC o σ^{54} . En segundo lugar, la inducción que tiene lugar en condiciones limitantes de nitrógeno no depende del sistema NTR, ni directamente ni a través de NAC, ya que una deficiencia en el factor σ^{54} o en los reguladores NtrC y NAC no tiene ningún efecto sobre la actividad del promotor P_{hpxD} . En tercer lugar, los estudios llevados a cabo mediante EMSAs con una sonda correspondiente a la región intergénica P_{hpxD-R} detectaron un complejo de retardación en condiciones de exceso de nitrógeno distinto al correspondiente únicamente a HpxR (FIGURA 4.31). Por último, los resultados derivados del análisis llevado a cabo mediante fusiones de promotor en la cepa parental y en la cepa mutante en el gen *hpxR* también sugieren la unión de algún factor a la región promotora P_{hpxD-R} en condiciones de exceso de nitrógeno. La actividad del promotor P_{hpxD} en GGIn es 8 veces menor en un mutante en el

gen *hpxR* que en la cepa parental, pero permanece 7 veces superior con respecto a las cepas parental y mutante en GGIn, medio equivalente a un exceso de nitrógeno (FIGURA 4.26). Esa diferencia entre los niveles de actividad del promotor P_{hpxD} del mutante *hpxR* en GGIn (76,89U/mg) y los obtenidos en NGIn (en torno a 16U/mg) correspondería a la regulación llevada a cabo exclusivamente por el sistema global del nitrógeno, a través de la des-represión del operón *hpxDE*. Por otra parte, a pesar de que el gen *hpxR* se expresa constitutivamente, la actividad del propio promotor P_{hpxR} en el mutante en este gen es menor en exceso de nitrógeno que en condiciones limitantes de nitrógeno. Ésto indica la implicación de otro factor que no permite la total des-represión del gen *hpxR* en ausencia del propio regulador HpxR (FIGURA 4.27.). El mecanismo de actuación del regulador NR se asemejaría al del regulador global GlnR de *B. subtilis* (Wray *et al.*, 1997), comentado en INTRODUCCIÓN 1.2.3.1. En levaduras también existe este tipo de represión llevada a cabo en condiciones de exceso de nitrógeno por reguladores globales (Coffman *et al.*, 1997).

Los niveles de expresión de *hpxDE* alcanzados en condiciones de nitrógeno limitantes, en ausencia de hipoxantina, se deben tanto a una des-represión como a una activación parcial por HpxR. De esta manera, HpxR sería capaz de inducir la expresión del operón *hpxDE* en ausencia de hipoxantina en el medio de cultivo. Beier *et al.*, 2004 mostraron que el regulador PucR del operón *puc* de *B. subtilis*, implicado en el metabolismo de purinas como fuentes de nitrógeno, es capaz de inducir la transcripción en ausencia de purinas, si bien la inducción era mucho más efectiva cuando éstas eran añadidas al medio de cultivo. A pesar de que PucR no pertenece a la familia de reguladores LysR, su caso constituye un ejemplo de regulación mediada en ausencia de inductores. A diferencia de la mayoría de proteínas de la familia LysR, algunos de sus componentes son capaces de inducir la transcripción en ausencia de moléculas efectoras. El ejemplo más claro es el del regulador TrpI de *Pseudomonas*. Esta proteína induce la expresión del operón *trpBA*, que se transcribe de manera divergente a su propio gen, en respuesta al inductor INPG (indolglicerol fosfato). Este operón codifica la enzima triptófano sintetasa, la cual cataliza la última reacción de la síntesis de triptófano. Análisis llevados a cabo mediante ensayos de transcripción *in vitro* demostraron que altos niveles de la proteína TrpI purificada eran capaces de activar el promotor P_{trpB} y que la presencia de INPG estimulaba tal activación (Gao y Gussin, 1991). El mecanismo de regulación del operón *trpBA* por TrpI es el siguiente. TrpI se une al RBS de *trpBA* incluso en ausencia de la molécula efectora INPG, como hacen la mayoría de reguladores LysR (Schell, 1993), lo cual provoca su propia autorepresión. La presencia de INPG estimula la unión cooperativa de una segunda proteína TrpI, lo que permite contactar con el ABS, lo que aumenta la formación del complejo abierto y potencia el inicio de la transcripción del operón *trpBA* (Chang y Crawford, 1991). Los resultados obtenidos en los estudios llevados a cabo mediante EMSAs, que se comentaron anteriormente, sugieren que la hipoxantina provoca un cambio conformacional de la proteína HpxR que favorecería la formación del complejo abierto DNA-RNA polimerasa, aumentando así los niveles de transcripción del operón *hpxDE*.

En los EMSAs llevados a cabo con extractos celulares de cultivos crecidos en distintas fuentes de nitrógeno y una sonda correspondiente a la región intergénica P_{hpxD-R} , el complejo HpxR- P_{hpxD-R} se detectó como complejo único (C1B) en presencia de purinas como únicas fuentes de nitrógeno (FIGURA 4.31.), especialmente con hipoxantina. Con los extractos provenientes de cultivos crecidos en condiciones limitantes de nitrógeno en ausencia y presencia de purinas se detectaron el complejo asociado a NR (C2), aunque con menor intensidad que en un exceso de nitrógeno, y el complejo asociado a HpxR, con menor intensidad que en el caso de hipoxantina como única fuente de nitrógeno. En el caso de extractos obtenidos de cultivos crecidos con un exceso de nitrógeno, en ausencia y presencia de purinas, sólo se detecta el complejo asociado a NR. El gen *hpxR* se expresa constitutivamente, por lo que estos resultados sugieren una posible interacción entre NR y HpxR. El medio de cultivo consistente en nitrógeno limitante más purinas (GGInHx/GGInUr) constituiría la condición denominada “semi-exceso de nitrógeno” por Nygaard *et al.*, 2000. El

hecho de que en estas condiciones pudieran estar actuando los reguladores asociados tanto a un exceso como a una limitación de nitrógeno explicaría la detección de ambos complejos C1B y C2 en tales medios de cultivo. Ambos complejos también se detectan en condiciones limitantes de nitrógeno en ausencia de purinas (GGln). Sin embargo, en este caso el complejo de retardación asociado a HpxR (C1B) es mayoritario y el asociado a NR (C2) es insignificante.

En base a nuestros datos y a los mecanismos de regulación descritos en la bibliografía proponemos el siguiente modelo de regulación coordinada de las unidades transcripcionales *hpxDE* y *hpxR* (FIGURA 5.1.). Tres factores participan en este modelo: (i) el represor global del nitrógeno NR, (ii) la proteína HpxR y (iii) el complejo formado por el regulador HpxR y el inductor hipoxantina (HpxR^{HX}). HpxR se une a alguno de los dos RBS con la secuencia T-N₁₁-A identificados en RESULTADOS 4.4.3.2. Nuestra hipótesis es que NR se uniría a su diana que, probablemente, solaparía con la caja -35 del promotor P_{*hpxD*}, lo que impediría la unión de la RNA polimerasa a este promotor. En cuanto a HpxR^{HX}, proponemos que la unión de la hipoxantina a HpxR provoca un cambio conformacional que favorece la transcripción del operón *hpxDE*. Sin embargo, los datos derivados de este trabajo no son suficientes como para concretar si este complejo permanece unido al RBS o si además, y en base a las características generales de los reguladores tipo LysR (Schell, 1993), se uniría al ABS localizado próximo a la caja -35.

Bajo un exceso de nitrógeno las proteínas NR y HpxR ocupan sus secuencias específicas. La unión de HpxR es suficiente como para reprimir a su propio gen y la unión de NR impediría tanto la unión de la RNA polimerasa al promotor P_{*hpxD*} como la inducción de tal promotor por HpxR. En condiciones limitantes de nitrógeno NR abandonaría el promotor P_{*hpxD*}, lo que provocaría la activación del operón *hpxDE* resultante de la des-represión por NR y la inducción mediada por HpxR. En este caso, el gen *hpxR* mantendría el mismo nivel de expresión debido a la autorregulación por HpxR. Por último, cuando las células disponen de hipoxantina como única fuente de nitrógeno, ésta interacciona con la proteína HpxR, formando el complejo HpxR^{HX}, provocando un cambio de conformación del regulador que se traduce en una mayor capacidad para favorecer la formación del complejo abierto DNA-RNA polimerasa en el promotor P_{*hpxD*} y que da lugar a los altos niveles de expresión del operón *hpxDE* observados. En estas condiciones, el complejo HpxR^{HX} unido al promotor mencionado mantiene el mismo nivel de transcripción del gen *hpxR*.

La adición de hipoxantina a un medio con exceso de nitrógeno no tiene ningún efecto sobre la transcripción de *hpxDE*, ya que su promotor está ocupado por NR. Sin embargo, la adición de hipoxantina a un medio con nitrógeno limitante provoca la inducción mediada por HpxR^{HX}.

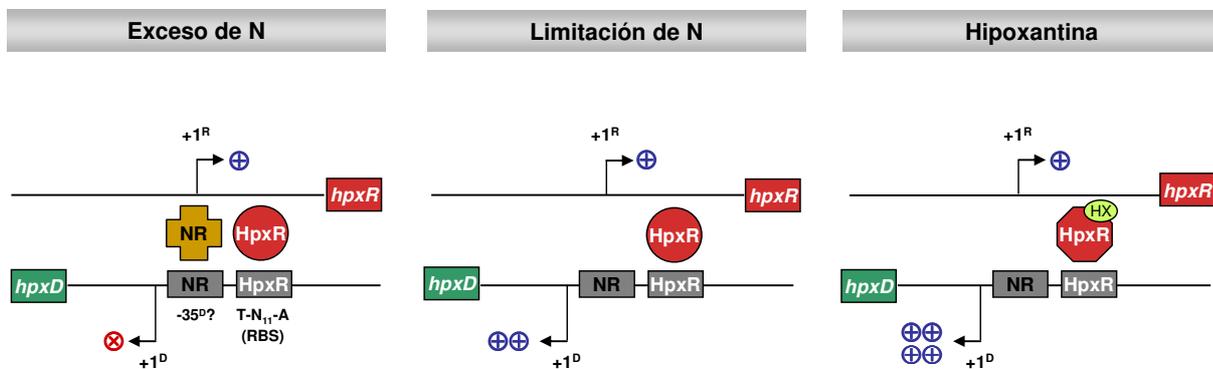


Figura 5.1.: Modelo de regulación propuesto para las unidades transcripcionales divergentes *hpxDE* y *hpxR*. NR: posible regulador global del nitrógeno. HpxR: Proteína reguladora HpxR. Los recuadros grises indican las cajas de unión de las dos proteínas reguladoras. NR podría unirse a la caja -35 del promotor P_{*hpxD*}. HX: hipoxantina. RBS: *Repressor Binding Site*.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La cepa de *K. pneumoniae* KC2653, así como otras cepas de laboratorio, puede utilizar hipoxantina como fuente de nitrógeno en condiciones aeróbicas.
2. El sistema génico *hpx*, localizado entre los genes KPN_01660 e *hipB* del cromosoma de *K. pneumoniae*, está implicado en la utilización de hipoxantina como fuente de nitrógeno.
3. El sistema *hpx* se compone de cuatro unidades transcripcionales: *hpxDE*, *hpxR*, *hpxO* y *hpxPQT*. Las unidades *hpxDE*, *hpxR* y *hpxO* se transcriben a partir de promotores σ^{70} , mientras que *hpxPQT* presenta un promotor dependiente de σ^{54} .
4. El gen *hpxP* codifica un transportador de purinas. El sustrato específico de este transportador podría ser ácido úrico, ya que el operón *hpxPQT* se induce en presencia de este compuesto.
5. El operón *hpxDE* está implicado en la oxidación de hipoxantina a ácido úrico, pero sus productos génicos no constituyen una xantina deshidrogenasa típica. Las proteínas HpxD y HpxE formarían una dioxigenasa de clase IB.
6. El gen *hpxO* está implicado en la oxidación de ácido úrico a alantoína. Sin embargo, su producto génico no muestra similitud a uricasas. La proteína HpxO sería una monooxigenasa dependiente de FAD.
7. El análisis *in silico* de los genes *hpxT* y *hpxQ* sugiere que estos genes están implicados en la transformación de los intermediarios de la oxidación de ácido úrico a alantoína. De esta manera, la oxidación de ácido úrico se llevaría a cabo mediante la acción secuencial de las enzimas HpxO, HpxT y HpxQ.
8. El gen *hpxR* codifica un regulador tipo LysR que activa la transcripción del operón *hpxDE* y reprime la expresión de su propio gen. La molécula efectora de este regulador es hipoxantina.
9. El sistema *hpx* está sometido a una doble regulación: por niveles de nitrógeno y por presencia de purinas. Las unidades transcripcionales regulables a ambos niveles son los operones *hpxDE* y *hpxPQT*.
10. La expresión del operón *hpxPQT* se induce en condiciones de nitrógeno limitantes a través del sistema NTR. Este operón depende de la subunidad σ^{54} de la RNA polimerasa y es activado por la proteína NtrC. Adicionalmente el ácido úrico actúa como molécula inductora mediante un regulador específico que todavía no ha sido caracterizado.
11. El operón *hpxDE* se encuentra reprimido en condiciones de exceso de nitrógeno. Resultados preliminares sugieren que tal regulación está llevada a cabo por una proteína tipo represor a la que hemos denominado NR. Este represor formaría parte de un sistema de regulación por nitrógeno diferente de NTR. Además, el operón *hpxDE* se induce en presencia de hipoxantina, la cual es reconocida por la proteína HpxR.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

A

Allende JL, Gibello A, Fortún A, Sánchez M, Martín M. 4-Hydroxybenzoate uptake in *Klebsiella planticola* strain DSZ1 is driven by Δ pH. *Curr. Microbiol.* 2002. 44: 31-37.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997. 25: 3389-3402.

Arnheim N, Erlich N. Polymerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.* 1992. 62:131-156.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Strulb K. *Current protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons, 1991.

B

Baldauf SL, Cardani MA, Bender RA. Regulation of the galactose-inducible *lac* operon and the histidine utilization operons in *pts* mutants of *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* 1988. 170(12): 5588-5593.

Ball CA, Osuna R, Ferguson KN, Johnson RC. Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1992. 174(24): 8043-8056.

Barker HA, Beck JV. *Clostridium acidi-urici* and *Clostridium cylindrosporum*, organisms fermenting uric acid and some other purines. *J. Bacteriol.* 1942. 43:291-304.

Barrios H, Valderrama B, Morett E. Compilation analysis of σ^{54} -dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 1999. 27(22): 4305-4313.

Beier L, Nygaard P, Jarmer H, Saxild HH. Transcription analysis of the *Bacillus subtilis* PucR regulon and identification of a cis-acting sequence required for PucR-regulated expression of genes involved in purine catabolism. *J. Bacteriol.* 2002. 184(12): 3232-3241.

Bender RA. The role of the NAC protein in the nitrogen regulation of *Klebsiella aerogenes*. *Mol. Microbiol.* 1991. 5(11): 2575-2580.

Bender RA, Friederich B. Regulation of assimilatory nitrate reductase formation in *Klebsiella aerogenes* W70. *J. Bacteriol.* 1990. 172(12): 7256-9.

Bender RA, Janssen KA, Resnick AD, Blumenberg M, Foor F, Magasanik B. Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* 1977. 129 (2): 1001-1009.

Bender RA, Snyder PM, Bueno R, Quinto M, Magasanik B. Nitrogen regulation system of *Klebsiella aerogenes*: the *nac* gene. *J. Bacteriol.* 1983. 156 (1): 444-446.

Benzie IFF, Chung WY, Tomlinson B. Simultaneous measurement of allantoin and urate in plasma: analytical evaluation and potential clinical application in oxidant-antioxidant balance studies. *Clin. Chem.* 1999. 45: 901-904.

Bertani G. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J. Bacteriol.* 2004. 186 (3): 595-600.

Bolívar F, Rodríguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene.* 1977. 2(2):95-113.

Boronat A, Aguilar J. Rhamnose-induced propanediol oxidoreductase in *Escherichia coli*: Purification, properties, and comparison with the fucose-induced enzyme. *J. Bacteriol.* 1979. 140:320-326.

Bouza E, Cercenado E. *Klebsiella* and *Enterobacter*: antibiotic resistance and treatment implications. *Semin. Respir. Infect.* 2002. 17(3): 215-230.

Brisse S, Verhoef J. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001. 51: 915-924.

Buck M, Gallegos MT, Studholme DJ, Guo Y, Gralla JD. The bacterial enhancer-dependent (σ^{54}) ($\sigma(N)$) transcriptional factor. *J. Bacteriol.* 2000. 182: 4129-4136.

C

Carmona M, Calverie-Martín F, Magasanik B. DNA bending and the initiation of transcription at sigma54-dependent bacterial promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997. 94: 9568-9572.

Cecchetto G, Amillis S, Diallinas G, Scazzocchio C, Drevet C. The AzgA purine transporter of *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* 2004. 279(5): 3132-3141.

Cendron L, Berni R, Folli C, Ramazzina I, Percudani R, Zanotti G. The structure of 2-oxo-4-hydroxy-4-carboxy-5-ureidoimidazole decarboxylase provides insights into the mechanism of uric acid degradation. *J. Biol. Chem.* 2007. 282(25): 18182-18189.

Chang M, Crawford IP. *In vitro* determination of the effect of indoleglycerol phosphate on the interaction of purified TrpI with its DNA binding sites. *J. Bacteriol.* 1991. 173: 1590-1597.

Cheng DL, Liu YC, Yen MY, Liu CY, Wang RS. Septic metastatic lesions of pyogenic liver abscess: association with *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in diabetic patients. 1991. *Arch. Intern. Med.* 1991. 151: 1557-1559.

Chirgwin JM, Prybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem.* 1979. 18:5294-5299.

Chou HC, Lee CZ, Ma LC, Fang CT, Chang SC, Wang JT. Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection. *Infec. Immun.* 2004. 72(7): 3783-3792.

Christen P, Peacock WC, Christen AE, Wacker WEC. Urate oxidase in primate phylogenesis. *Eur. J. Biochem.* 1970. 12:3-5.

Christiansen LC, Schou S, Nygaard P, Saxild HH. Xanthine metabolism in *Bacillus subtilis*: characterization of the *xpt-pbuX* operon and evidence for purine- and nitrogen-controlled expression of genes involved in xanthine salvage and catabolism. *J. Bacteriol.* 1997. 179: 2540-2550.

Claverie-Martin F, Magasanik B. Role of integration host factor in the regulation of the *glnHp2* promoter of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 1991. 88: 1631-1635.

Coffman JA, Rai R, Loprete DM, Cunningham T, Svetlov V, Cooper TG. Cross regulation of four GATA factors that control nitrogen catabolic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 1997. 179: 3416-3429.

Conley TG, Priest DG. Thermodynamics and stoichiometry of the binding of substrate analogues to uricase. *Biochem. J.* 1980. 187(3): 727-732.

Cultrone A, Scazzocchio C, Rochet M, Montero-Morán G, Drevet Christine, Fernández-Martín R. Convergent evolution of hydroxylation mechanisms in the fungal kingdom: molybdenum cofactor-independent hydroxylation of xanthine via α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Mol. Microbiol.* 2005. 57(1): 276-290.

Cusa E, Obradors N, Baldomà L, Badía J, Aguilar J. Genetic analysis of a chromosomal region containing genes required for assimilation of allantoin nitrogen and linked glyoxylate metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1999. 181(24): 7479-7484.

D

de Konig H, Diallinas G. Nucleobase transporters. *Mol. Membr. Biol.* 2000. 75: 75-94.

- di Guana C**, Lib P, Riggs PD, Inouyeb H. Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene*. 1988. 67(1): 21-30.
- Datsenko KA**, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000. 97(12): 6640-6645.
- Davis RW**, Botstein D, Roth JR. *A manual for genetic engineering. Advanced bacterial genetics*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1980.
- De Haseth PL**, Zupancic MI, Record MT Jr. RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* 1998. 180(): 3019-3025.
- De Lorenzo V**, Herrero M, Jazubzik U, Timmis KN. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative Eubacteria. *J. Bacteriol.* 1990. 172(11): 6568-6572.
- Diallinas G**, Gorfinkiel L, Arst HN, Cecchetto G, Scazzocchio C. Genetic and molecular characterization of a gene encoding a wide specificity purine permease of *Aspergillus nidulans* reveals a novel family of transporters conserved in prokaryotes and eukaryotes. *J. Biol. Chem.* 1995. 270(15): 8610-8622.
- Diallinas G**, Scazzocchio C. A gene coding for the uric acid-xanthine permease of *Aspergillus nidulans*: inactivational cloning, characterization and sequence of a *cis*-acting mutation. *Genetics*. 1989. 122: 341-350.
- Dower WJ**, Miller JF, Ragsdale CW. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 1988. 16(13): 6127- 6145.

E

- Ehretsmann CP**, Carpousis AJ, Krisch HM. mRNA degradation in prokaryotes. *FASEB J.* 1992. 6:3186-3192.
- Eswaramoorthy S**, Bonanno JB, Burley SK, Swaminathan S. Mechanism of action of flavin-containing monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006. 103(26): 9832-9837.

F

- Feng J**, Goss TJ, Bender RA, Ninfa AJ. Repression of the *Klebsiella aerogenes nac* promoter. *J. Bacteriol.* 1995. 177: 5535–5538.
- Ferraro DJ**, Gakhar L, Ramaswamy S. Riseke business: structure-function of Rieske non-heme oxygenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. 338: 175-190.
- Finn RD**, Mistry J, Schuster-Böckler B, Griffiths-Jones S, Hollich V, Lassmann T, Moxon S, Marshall M, Khanna A, Durbin R, Eddy SR, Sonnhammer ELL, Bateman A. Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res.* 2006. 34(Database Issue): D247-51.
- Fisher SH**. Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la différence! *Mol. Microbiol.* 1999. 32(2): 223-232.

G

- Gao J**, Gussin GN. Activation of the *trpBA* promoter of *Pseudomonas aeruginosa* by TrpI protein in vitro. *J. Bacteriol.* 1991. 173: 3763-3769.
- Garaizar J**, Porwollik S, Echeita A, Rementeria A, Herrera S, Wong RM, Frye J, Usera MA, McClelland M. DNA microarray-based typing of an atypical monophasic *Salmonella enterica* serovar. *J. Clin. Microbiol.* 2002. 40(6): 2074-2078.

- Garzón A**, Li J, Flores A, Casadesús J, Stewart V. Molybdenum cofactor (chlorat resistant) mutants of *Klebsiella pneumoniae* M5a1 can use hypoxanthine as the sole nitrogen source. *J. Bacteriol.* 1992. 174(19): 6298-6302.
- Geren W**, Bendich A, Bodanski O, Brown GB. The fate of uric acid in man. *J. Biol. Chem.* 1950. 183: 21-31.
- Gish W**, States DJ. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat. Genet.* 1993. 3:266-272.
- Goldberg RB**, Bender RA, Streicher SL. Direct Selection for P1-sensitive mutants of enteric bacteria. *J. Bacteriol.* 1974. 118 (3): 814-810.
- Goodman SD**, Velten NJ, Gao Q, Robinson S, Segall AM. *In vitro* selection of integration host factor binding sites. *J. Bacteriol.* 1999. 181: 3246-3255.
- Gorfinkiel L**, Diallinas G, Scazzochio C. Sequence and regulation of the *uapA* gene encoding a uric acid-xanthine permease in the fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* 1993. 268: 23376-23381.
- Goss TJ**, Janes BK, Bender RA. Repression of glutamate dehydrogenase formation in *Klebsiella aerogenes* requires two binding sites for the Nitrogen Assimilation Control protein, NAC. *J. Bacteriol.* 2002. 184(24): 6966-6975.
- Goudela S**, Karatza P, Koukaki M, Frillingos S, Diallinas G. Comparative substrate recognition by bacterial and fungal purine transporter of the NAT/NCS2 family. *Mol. Membr. Biol.* 2005. 22(3): 263-275.
- Granston BE**, Nash HA. Characterization of a set of integration host factor mutants deficient for DNA binding. *J. Mol. Biol.* 1993. 234:45-59.
- Grootveld M**, Hallwell B. Measurement of allantoin and uric acid in human body fluids: a potential index of free-radical reactions *in vivo*? *J. Biochem.* 1987. 243: 803-808.
- Guan C**, Lib P, Riggsa PD, Inouyeb H. Vectors that facilitate expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene.* 1987. 67:21-30.

H

- Hacking AJ**, Lin ECC. Disruption of the fucose pathway as a consequence of a genetic adaptation to propanediol as a carbon source in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1976. 126:1166-1172.
- Halliwell B**, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* 1990. 280: 1-8.
- Hannahan D**. "Techniques for transformation of *Escherichia coli*". En: Glover DM, Hames BD. *DNA cloning: a practical approach*. 2ª ed. Oxford: IRL Press, 1995, 1, p. 1-35.
- Hartstein AI**, Morthland VH, Rourke JW, Renee Sykes, Rashad AL. Plasmid DNA analysis, biotyping, and antimicrobial susceptibility as subtyping tests for *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1993. 16: 35-41.
- Hensel M**, Tang CM, Arst HN, Holden DW. Regulation of fungal extracellular proteases and their role in mammalian pathogenesis. *Can. J. Bot.* 1995. 73(1): S1065-S1070.
- Herrero M**, de Lorenzo V, Timmis KN. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 1990. 172(11): 6557-6567.
- Hille R**. Molybdenum-containing hydroxylases. *Arch. Biochem. Biophys.* 2005. 433:107-116.
- Hoffmeyer J**, Neuhard J. Metabolism of exogenous purine bases and nucleosides by *Salmonella typhimurium*. 1971. *J. Bacteriol.* 106(1): 14-24.
- Huang SH**, Wu TK. Modified colorimetric assay for uricase activity and a screen for mutant *Bacillus subtilis* uricase genes following StEP mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* 2004. 271: 517-523.

I

Imhoff RD, Power NP, Borrok MJ, Tipton PA. General base catalysis in the urate oxidase reaction: evidence for a novel Thr-Lys catalytic diad. *Biochem.* 2003. 42(14): 4094-4100.

J

Janes BK, Bender RA. Alanine catabolism in *Klebsiella aerogenes*: Molecular characterization of the *dadAB* operon and its regulation by the Nitrogen Assimilation Control protein. *J. Bacteriol.* 1998. 180(3): 563-570.

Johnson J, Dagberg B, Richet E, Uhlin BE. H-NS and StpA proteins stimulate expression of maltose regulon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1998. 180: 6117-6125.

Jokanović M. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicol.* 2001. 166: 139-160.

K

Kahn K, Tipton PA. Kinetic mechanism and cofactor content of soybean root nodule urate oxidase. *Biochem.* 1997. 36(16): 4731-4738.

Karatza P, Frillingos S. Cloning and functional characterization of two bacterial members of the NAT/NCS2 family of *Escherichia coli*. *Mol. Membr. Biol.* 2005. 22(3): 251-261.

Kastenbauer S, Koedel Y, Becker BF, Pfister HW. Oxidative stress in bacterial meningitis un humans. *Neurology.* 2002. 58: 186-191.

Kaur H, Halliwell B. Action of biologically-relevant oxidizing species upon uric acid. Identification of uric acid oxidation products. *Chem. Biol. Interact.* 1990. 73: 235-247.

Kisher C, Schindelin H, Baas D, Rétey J, Meckenstock RU, Kroneck PMH. A structural comparison of molybdenum cofactor-containing enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* 1999. 22: 503-521.

Koning H, Diallinas G. Nucleobase transporter. *Mol. Membr. Biol.* 2000. 75:75-94.

Kudla B, Caddick MX, Langdon T, Martínez-Rossi NM, Bennett CF, Sibley S, Davis RW, Arst HN. The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of putative zinc finger. *EMBO J.* 1990. 9: 1355-1364.

L

Laemli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* 1970. 227:680-685.

Lai YC, Peng HL, Chang HY. RmpA2, an activator of capsule biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43, regulates K2 *cps* gene expression at the transcriptional level. *J. Bacteriol.* 2003. 185(3): 788-800.

Lane D, Prentki P, Chandler M. Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. *Microbiol. Rev.* 1992. 56:509-528.

Lang DH, Rettie A. *In vitro* evaluation of potential *in vivo* probes for human flavin-containing monooxygenase (FMO): metabolism of benzydamine and caffeine by FMO and P450 isoforms. *J. Clin. Pharmacol.* 2000. 50: 311-314.

Lederberg J. Streptomycin resistance: a genetically recessive mutation. *J. Bacteriol.* 1951. 61: 549-550.

Lederman ER, Crum NF. Pyogenic liver abscess with a focus on *Klebsiella pneumoniae* as a primary pathogen: an emerging disease with unique clinical characteristics. *Am. J. Gastroenterol.* 2005. 100: 322-331.

Lee Y, Lee DH, Kho CW, Lee AY, Jang M, Cho S, Lee CH, Lee JS, Myung PK, Park BC, Park SG. Transthyretin-related proteins functions to facilitate the hydrolysis of 5-hydroxyisourate, the end product of the uricase reaction. *FEBS Lett.* 2005. 579(21): 4769-74.

Leimkühler S, Kern M, Solomon PS, McEwan AG, Schwarz G, Mendel RR, Klipp W. Xanthine dehydrogenase from the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* is more similar to its eukaryotic counterparts than to prokaryotic molybdenum enzymes. *Mol. Microbiol.* 1998. 27(4): 853-869.

Lin ECC. Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 1976. 30:535-579.

Liu Q, Bender RA. Complex regulation of urease formation from the two promoters of the *ure* operon of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 2007. 189(21): 7593-7599.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951. 193: 265-275.

M

Macaluso A, Best EA, Bender RA. Role of the *nac* gene product in the nitrogen regulation of some NTR-regulated operons of *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* 1990. 172(12): 7249-55.

Magasanik B. En: Miller JH, Reznikoff WS. *The operon*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1978, p. 373-387.

Martínez J, Martínez L, Rosenblueth M, Silva J, Martínez-Romero E. How are sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. *Int. Microbiol.* 2004. 7: 261-268.

Mason JR, Cammack R. The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* 1992. 46: 277-305.

Matiasovicova J, Adams P, Barrow PA, Hradecka H, Malcova M, Karspikova R, Budinska E, Pilousova L, Rychlik I. Identification of putative ancestors of the multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104 clone harboring the *Salmonella* genomic island 1. *Arch. Microbiol.* 2007. 187(5):415-24.

Matsui H, Shimaoka M, Kawasaki H, Takenaka Y, Kurahashi O. Adenine deaminase activity of the *yicP* gene product of *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001. 65(5): 1112-1118.

Matsumoto H, Kobayashi OR, Terawaki Y. Chromosomal location of genes participating in the degradation of purines in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Gen. Genet.* 1978. 167:165-176.

McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, Porwollik S, Ali J, Dante M, Du F, Hou S, Layman D, Leonard S, Nguyen C, Scott K, Holmes A, Grewal N, Mulvaney E, Ryan E, Sun H, Florea L, Miller W, Stoneking T, Nhan M, Waterston R, Wilson RK. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature.* 2001. 413 (6858): 852-856.

McGee DJ, May CA, Garner RM, Himpf JM, Mobley HLT. Isolation of *Helicobacter pylori* genes that modulate urease activity. *J. Bacteriol.* 1999. 181(8): 2477-2484.

Merrick MJ, Edwards RA. Nitrogen control in bacteria. *Microbiol. Rev.* 1995. 59(4): 604-622.

Miller J H. *A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and related bacteria*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1992.

Miller VL, Mekalanos JJ. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* 1988. 170:2575-2583.

Moison R, de Beaufort A, Hassnoot A, Dubbelman T, van Zoeren-Grubben D, Berger H. Uric acid and ascorbic acid redox ratios in plasma and tracheal aspirate of preterm babies with acute and chronic lung disease. *Infect. Immun.* 1995. 63: 1603-1607.

Morawski B, Segura A, Ornston LN. Substrate range and genetic analysis of *Acinetobacter* vanillate demethylase. *J. Bacteriol.* 2000. 182(5): 1383-1389.

Munch R, Hiller K, Grote A, Scheer M, Klein J, Schobert M, Jahn D. Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics*. 2005. 21(22): 4187-4189.

N

Nassif X, Fournier JM, Arondel J, Sansonetti PJ. Mucoïd phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. *Infect. Immun*. 1989. 57(2): 546-552.

Neihardt FC, Umbarger HE. "Chemical composition of *Escherichia coli*". 2^a ed. En: Neihardt FC. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. Washington, D.C.: ASM Press, 1996, p. 13-16.

Nygaard P. Adenosine deaminase from *Escherichia coli*. *Methods. Enzymol*. 1978. 51: 508-512.

Nygaard P. "Utilization of preformed purine bases and nucleoside". En: Munch-Petersen A. *Metabolism of nucleotides, nucleosides and nucleobases in microorganisms*. London: Academic Press, 1983, p. 27-93.

Nygaard P, Duckert P, Saxild HH. Role of adenine deaminase in purine salvage and nitrogen metabolism and characterization of the *ade* gene in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol*. 1996. 178(3): 846-853.

Nygaard P, Søren MB, Andersen KAK, Saxilds HH. *Bacillus subtilis* guanine deaminase is encoded by the *yknA* gene and is induced during growth with purines as the nitrogen source. *Microbiol*. 2000. 146: 3061-3069.

P

Peden DV, Hohman R, Brown ME, Mason RT, Berkebile C, Fales HM, Kaliner MA. Uric acid is a major antioxidant in human nasal airway secretions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990. 87: 7638-7642.

Petersen C, Møller LB, Valentin-Hansen P. The cryptic adenine deaminase gene of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*. 2002. 277(35): 31373-31380.

Pitts OM, Priest DG. A steady-state kinetic investigation of the uricase reaction mechanism. *Arch. Biochem. Biophys*. 1974. 163: 359-366.

Porter SC, North AK, Wedel AB, Kustu S. Oligomerization of NtrC at the *glnA* enhancer is required for transcriptional activation. *Genes Dev*. 1993. 7: 2258-2273.

Prival MJ, Magasanik B. Resistance to catabolite repression of histidase and proline genes oxidase during nitrogen nitrogen-limited growth of *Klebsiella aerogenes*. *J. Biol. Chem*. 1971. 246: 6288-6296.

R

Ramazzina I, Folli C, Scchi A, Berni R, Percudani R. Completing the uric acid degradation pathway through phylogenetic comparison of whole genomes. *Nat. Chem. Biol*. 2006. 2(3): 144-148.

Reen FJ, Boyd EF, Porwollik S, Murphy BP, Gilroy D, Fanning S, McClelland M. Genomic comparisons of *Salmonella enterica* serovar Dublin, Agona and Typhimurium strains recently isolated from milk filters and bovine samples from Ireland, using a *Salmonella* microarray. *Appl. Environ. Microbiol*. 2005. 71(3): 1616-1625.

Reese MG. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Comput. Chem*. 2001. 26(1): 51-6.

Reitzer L, Schneider BL. Metabolic context and possible physiological themes of σ^{54} -dependent genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2001. 65(3): 422-444.

Rintoul MR, Cusa E, Baldommà L, Badía J, Reitzer L, Aguilar J. Regulation of the *Escherichia coli* allantoin regulon: coordinated function of the repressor AllR and the activator AllS. *J. Mol. Biol.* 2002. 324: 599-610.

Rosario CJ, Bender RA. Importance of tetramer formation by the Nitrogen Assimilation Control protein for strong repression of glutamate dehydrogenase formation in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 2005. 187(24): 8291-8299.

Rouf MA, Lompfrey RF. Degradation of uric acid by certain aerobic bacteria. *J. Bacteriol.* 1968. 96: 617-622.

S

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2^a ed. Cold Spring Harbor, New York.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3^a ed. Ed. Cold Spring Harbor, New York.: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

Schell MA. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 1993. 47:597-626.

Schultz AC, Nygaard P, Saxild HH. Functional analysis of 14 genes that constitute the purine catabolic pathway in *Bacillus subtilis* and evidence for a novel regulon controlled by the PucR transcription activator. *J. Bacteriol.* 2001. 183(11): 3293-3302.

Schwacha A, Bender RA. The product of the *Klebsiella aerogenes nac* (nitrogen assimilation control) gene is sufficient for activation of the hut operons and repression of the *gdh* operon. 1993. *J. Bacteriol.* 175: 2116-2124.

Self WT. Regulation of purine hydrolase and xanthine dehydrogenase from *Clostridium purinolyticum* in response to purines, selenium and molybdenum. *J. Bacteriol.* 2002. 184(7): 2039-2044.

Simons RW, Houman F, Kleckner N. Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene*. 1987. 53: 85-96.

Skorupsky K, Taylor RK. Positive selection vectors for allelic exchange. *Gene*. 1996. 169:47-52.

Smith GR, Yeheskel SH, Magasanik B. Genetic and metabolic control of enzymes responsible for histidine degradation in *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 1971. 246(10): 3320-3329.

Sorensen LB. Elimination of uric acid in man. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1960. 12(54):1.

Sorensen LB. Role on the intestinal tract in the elimination of uric acid. *Arthritis Rheum.* 1965. 8(5): 649-706.

Spurio R, Falconi M, Brandi A, Pon CL, Gualerzi GO. The oligomeric structure of nucleoid protein H-NS is necessary for recognition of intrinsically curved DNA and for DNA bending. *EMBO J.* 1997. 16: 1795-1805.

Studholme DJ, Dixon R. Domain architectures of σ^{54} -dependent transcriptional activators. *J. Bacteriol.* 2003.185:1757-67.

Suárez T, Vieira de Queiroz M, Oestreicher N, Scazzochio C. The sequence and binding specificity of UaY, the specific regulator of the purine utilization pathway in *Aspergillus nidulans*, suggest an evolutionary relationship with the PPR1 protein of *Saccharomyces pombe*. *EMBO J.* 1995. 14(7): 1453-1467.

T

Tatusova TA, Madden TL. Blast 2 sequences: a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999. 174:247-250.

Tropel D, van der Meer JR. Bacterial regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004. 68(3): 474-500.

Tsunehiro A, Adhya S. Repressor induced site-specific binding of HU for transcriptional regulation. 1997. EMBO J. 16:3666-3674.

Tyler B. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. Annu. Rev. Biochem. 1978. 47: 1127-1162.

V

Voet D, Voet JG. *Bioquímica*. Barcelona: Omega, 1992.

Vogels GD, Van der Drift C. Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. Bacteriol. Rev. 1976. 40(2): 403-468.

Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1979. 76:615-619.

W

Wagenlehner FME, Heisig P, Irtenkauf C, Notka F, Decker J, Lehn N, Linde H. Clinically significant borderline resistance of sequential clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Int. J. Antimicrob. Agents. 2003. 22: 367-373.

Weatherburn MW. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Anal. Chem. 1967. 39:971-974.

Wong SH. The use of purines compounds as sole sources of carbon and nitrogen by *Klebsiella species*. Microbios. 1988. 56: 57-62.

Wray Jr LV, Ferson AE, Fisher SH. Expression of the *B. subtilis* ureABC operon is controlled by multiple regulatory factors including CodY, GlnR, TnrA y SpoOH. J. Bacteriol. 1997. 179: 5949-5501.

X

Xi H, Schneider BL, Reitzer L. Purine catabolism in *Escherichia coli* and function of xanthine dehydrogenase in purine salvage. J. Bacteriol. 2000. 182: 5332-5341.

Y

Yang CC, Yen CH, Ho MW, Wang JH. Comparison of pyogenic liver abscess caused by non-*Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella pneumoniae*. J. Microbiol. Immunol. Infect. 2004. 37: 176-184.

Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. Gene. 1985. 33(1): 103-119.

Yuan HS, Finkel SE, Feng JA, Kaczor-Grezeskowiak M, Johnson RC, Dickerson RE. The molecular structure of wild type and a mutant Fis protein: relationship between mutational changes and recombinational enhanced function of DNA binding. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1991. 88: 9558-9562.

Z

Ziegler DM. Recent studies on the structure and function of multisubstrate flavin-containing monooxygenases. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1993. 33: 1979-1999.

Zimmerman EF, Magasanik B. Utilization and interconversion of purine bases and ribonucleosides by *Salmonella typhimurium*. J. Biol. Chem. 1964. 239: 293-300.

8. ANEXOS

ANEXO 1: OLIGONUCLEÓTIDOS

En los casos en los que los cebadores contenían alguna diana de restricción, ésta se destaca mediante color. En rojo se especifica la diana reconocida por *EcoRI*, en morado la de *XbaI*, en verde la de *MluI*, en azul la de *Ascl*, en naranja la de *BamHI* y en gris la de *SmaI*.

ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DEL REGULÓN *all* DESCRITO POR Chou *et al.*, 2004

336F: TCTGATTTATCCACATT (Chou *et al.*, 2004)

1416R: CCGTTAGGCAATCCAGAC (Chou *et al.*, 2004)

KallS.1: GGACGCATGGTCGGAATGTGTC

KallS.2: GTAGAGCGCCAGGTCAACATTG

KallA.1: CCCCTGACGCGAGATGCATTCC

KallA.2: GCAAAGCTCAGCTCCACGGTCG

KallR.2: GCGCGGTACTGATATTCCTTGC

KallR.1: GGTTGGTGGCATATCGGTCTTGG

Kgcl.1: CGATTTGCCTTATGATGTCCAG

Kgcl.2: GCATTTGCTGCGCAATGTCTACC

KallB.1: GGTCGATGCGCATACGCATATCTC

KallB.2: CGAGAGGCTACATAATCATGCG

KallD.1: GGTTGTCGTACATCGAGCTGAC

KallD.2: CAGAGGCATTCATTCGCGCGGC

LOCALIZACIÓN DEL TRANSPOSÓN mini-Tn5 Km MEDIANTE PCR INVERSA

miniTn5Km.ext: GCTTGCTCAATCAATCACCG

lminiTn5Km.int: CTCGCTAGATTGTTAATGCG

OminiTn5Km.int: TTGCAAACCCTCACTGATCC

SECUENCIACIÓN DEL REGULÓN *hpx*

seqhpxE.F: TTCTTTACCTACCTGCGGCCGTTTCTTGAGACCGTCGCGC

seqhpxE.R: GCGAGTCGCAGTCTCGCGGTGGCTCCCGTTATATTCATGAC

seqhpxQT.F: GGTCTCGGCGTGGAGTCGGTGCCGGCGTTTCTCAGCCATTTCCGCCGAT

seqhpxQT.R: CACGGGACTGTATATCTGGGGGAATTCATCGCCTTGTTT

seqhpxD1.F: CTCGTCTGAGCAGTGGATCT

seqhpxD1.R: TGCCGCACTGGGACGACGCG

seqhpxD2.F: GGATCGGCGAAGGTGTCGGT

seqhpxD2.R: GTGAGCAGGAAGAGAAATCA

seqhpxR.F: GGCAGTTGATTTGCTGAAATCC
seqhpxR.R: GTGGACCACCTTTGTCTGGCGAAG
seqhpxO.F: CAGCCACACCGTCAGCCAGAAAG
seqhpxO.R: GGTGCCCTGCATGCAGATCATCC
seqhpxP1.F: GTCTGACGAACATCACAGTGG
seqhpxP1.R: TACAGTGACGCCATCCGCCA
seqhpxP2.F: CATCAGCCTGATCAAGGTCAG
seqhpxP2.R: AGGCTGTTACACTGACTCAG
int1.F: CATATTAGGGTGTTACATCCATCAC
int2.F: GAGGATGGTGTCTGCACATGC
int1.R: CGGCAGTGGCGCTCAAACAG
int3.F: CGGCATCAGCGAGACGCGCT
int4.F: AGTCGATCCCCGACTGTTTGAG

DETERMINACIÓN DE LOS INICIOS DE TRANSCRIPCIÓN MEDIANTE RACE

Oligo d[T]-anchor primer: GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTV; V= A, C ó G (Roche)

PCR anchor primer: GACCACGCGTATCGATGTCGAC (Roche)

Determinación del inicio de transcripción del operón *hpxDE*

deSP1: GTCCAGCAGGGTGGCTTTCACC
deSP2: CAGCCAGTCCTCTGGATCAAAG

Determinación del inicio de transcripción del gen *hpxR*

rSP1r: CGAACAGCGGGGTACCGAAGGCCTCCTC
rSP2r: GCCGAGGCGGAGATATGCAGCTGCTC
rSP3r: CACGGCGATGAAATAGTGCGCG

Determinación del inicio de transcripción del gen *hpxO*

oSP1: GGCGCCAATCACGATTGCTTTC
oSP2: CTACAGCAATTTGCGTACCAGTTC
oSP3: CATCGGTGCAATGTGAGGTA

Determinación del inicio de transcripción del operón *hpxPQT*

pqtSP1: CGAGGGTAGCGCCGATGATCAGC
pqtSP2: CCGCCAGCACATGCTGGAGAGCGC

Secuenciación de los insertos clonados en el vector pGEMT

T7 promoter primer: TAATACGACTCACTATAGGG (Promega)

SP6 promoter primer: TAAATCCACTGTGATATCTT (Promega)

CLONAJE DE *hpxDE* Y *hpxO* EN EL VECTOR pUC19

hpxDEact.F: GGAATTCGCGCGATGGTGATTGTCTTC

hpxDEact.R: GCTCTAGAAATGGTGATGGATGTGAACAC

hpxOact.F: GGAATTCAGTACGCTGTTGCGACCGCT

hpxOact.R: GCTCTAGAGAGCCATCGCTGTGCCTCAG

MUTAGÉNESIS DIRIGIDA MEDIANTE INSERCIÓN DEL GEN *kan*

Mutagénesis dirigida de *hpxO*

Clonaje de *hpxO* en el vector pKAS32

OC1: CCGGAATTCAGCCACACCGTCAGCCAGAAAG

OC2: GCTCTAGAGGTGCCCTGCATGCAGATCATCC

Construcción del casete KAN-O

kanMlul.F: GTGTGTACGCGTTATGGACAGCAAGCGAACCG

kanMlul.R: GTGTGTACGCGTTCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAG

Mutagénesis dirigida de *hpxP*

Clonaje de *hpxP* en el vector pBR322

PC1: CGCGAATTCATCGGTGCAATGTGAGGTAT

PC2 (=seqhpxP2): AGGCTGTTACTACTGACTCAG

Construcción del casete KAN-P

kan.F: TATGGACAGCAAGCGAACCG

kan.R: TCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAG

Mutagénesis dirigida de *hpxR*

Clonaje de *hpxR* en el vector pUC18Not

RC1: GGAATTCCTGCTCACATCGGTGATTGT

RC2: GCTCTAGAGGGAAGGATATGCAGCTCAC

Construcción del casete KAN-R

kanAscl.F: ATGGCGCGCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC

kanAscl.R: ATGGCGCGCCATATGAATATCCTCCTTAG

COMPROBACIÓN DE LA INSERCIÓN DEL GEN *kan* EN LOS GENES *hpxO*, *hpxP* ó *hpxR*

Oligonucleótidos internos al gen *kan*

K1: CAGTCATAGCCGAATAGCCT (Datsenko y Wanner, 2000)

K2: CGGTGCCCTGAATGAACTGC (Datsenko y Wanner, 2000)

Oligonucleótidos externos casete KAN-O

OM1: CGCGCACTATTTTCATCGCCG

OM2: GACAATCACCGGCACCAGAG

Oligonucleótidos externos al casete KAN-P

PM1 (=int3.F): CGGCATCAGCGAGACGCGCT

PM2: ATTCTCGCTGTCCACCGACGA

Oligonucleótidos externos al casete KAN-R

RM1: GTCCAGCAGGGTGGCTTTCACC

RM2 (=seqhpxR.R): GTGGACCACCTTTGTGGCGAAG

SÍNTESIS DE LAS SONDAS UTILIZADAS EN LAS COMPROBACIONES POR SOUTHERN BLOT

Sonda SO

SO.F: GAACTGCTGTATGACAATCTGCTGC

SO.R: GCACGATATGCCGCTCCAG

Sonda SP

SP.F: GCCGAACTGCACGCTGTCCCG

SP.R: GAGCCATCGCTGTGCCTCAG

Sonda SR

SR.F: GAATCAAAAGTTTCTGTATGTTGC

seqhpxO.R: GGTGCCCTGCATGCAGATCATCC

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE *hpxP* MEDIANTE RT-PCR

seqhpxP2.F: CATCAGCCTGATCAAGGTCAG

seqhpxP2.R: AGGCTGTTACACTGACTCAG

S16-Rv: AATTCCGATTAACGCTTGCACCC

S16-Fw: TAACGGCTCACCTAGGCGACGATC

CONSTRUCCIÓN DE LAS FUSIONES DE PROMOTOR A *lacZ*

Φ (*hpxD-lacZ*)

pfDE.F: CCGGAATTCCTGCAGCTCATCAAATTTCTGTC

pfDE.R: CGCGGATTCAGTCCCTCTGGATCAAAGGTGC

Φ (*hpxR-lacZ*)**pfR.F:** CCGGAATTCGTCCAGCAGGGTGGCTTTCACC**pfR.R:** CGCGGATTCACGGCGATGAAATAGTGCGCG **Φ (*hpxO-lacZ*)****pfO.F:** CCGGAATTCGAGGGTAGCGCCGATGATCAGC**pfO.R:** TCCCCGGGGACTGTTTGAGCGCCACTGCC **Φ (*hpxP-lacZ*)****pfPQT.F:** CCGGAATTCGACTGTTTGAGCGCCACTGCC**pfPQT:** TCCCCGGGGCGAGGGTAGCGCCGATGATCAGC**Secuenciación de los insertos clonados en el vector pRS415****pRS415seq:** CCAGGAATTGGGGATCGGAATTC (Profesor R. Bender. University of Michigan)**pRS415ext:** GTCGCCGCTTTCATCGTTGT (Profesor R. Bender. University of Michigan)**CLONAJE DE *hpxR* EN EL VECTOR *pc2x*****mbphpxR.F:** GGAATTCATGAGTCCATTTTCCGTTTCGC**mbphpxR.R:** CGGGATCCGCATTATCAACGGCATGTGCGAC**SÍNTESIS DE SONDAS CORRESPONDIENTES A LA REGIÓN P_{*hpxD-R*} USADAS EN LOS EMSAs****der1.F (=deS2):** CAGCCAGTCCTCTGGATCAAAG**der1.R:** CAATAAAACAATCACCGATG**der234.F:** CTGCTCACATCGGTGATTGT**der2.R (=rSP3):** CACGGCGATGAAATAGTGCGCG**der3.R:** CCCTGTACTCTTTTTTGCAACAG**der4.R:** CAACAGCAGAGTGAATTAATGG**SÍNTESIS DE SONDAS CORRESPONDIENTES A LA REGIÓN P_{*hpxO-P*} USADAS EN LOS EMSAs****op12.F (=oSP1):** GGCGCCAATCACGATTGCTTTC**op13.R:** TAGTAAAGAGAAGTGCATGG**op2.R:** CATAAAAAGGCAACCAATACCTC**op345.F (=SR.F):** GAATCAAAGTTTCTGTATGTTGC**op4.R:** CATCAACTTAGATTACGCTCGTC**op5.R:** AAGCAGGCCAGAGACGACAA

OTROS OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS

M13: GTAAAACGACGGCCAGT

malE: GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC

ANEXO 2: FRAGMENTOS OBTENIDOS POR PCR

A continuación se muestran las principales características de los fragmentos obtenidos mediante PCR utilizados en la construcción de las fusiones de promotor a *lacZ* y como sondas en los EMSAs.

Fragmentos utilizados para construir las fusiones de promotor a *lacZ*

Las posiciones se indican respecto al inicio de transcripción correspondiente a cada promotor, determinado experimentalmente.

CEBADORES		PROMOTOR	
NOMBRE	OPERÓN/GEN	POSICIONES	TAMAÑO (pb)
pfDE.F/pfDE.R	<i>hpxDE</i>	-346/+97	443
pfR.F/pfR.R	<i>hpxR</i>	-212/+93	305
pfO.F/pfO.R	<i>hpxO</i>	-267/+288	555
pfPQT.F/pfPQT.R	<i>hpxPQT</i>	-258/+297	555

Características de las sondas correspondientes a la región P_{*hpxD-R*}

Las posiciones se indican respecto al inicio de transcripción correspondiente al promotor P_{*hpxD*} (^D) o P_{*hpxR*} (^R).

CEBADORES	SONDAS		
	NOMBRE	POSICIÓN	TAMAÑO (pb)
der1F / der1R	Sder1	+101/+4 ^D	98
der234 / der2R	Sder2	-63/+93 ^R	156
der234 / der3R	Sder3	-63/+46 ^R	109
der234 / der4R	Sder4	-63/+29 ^R	92

Características de las sondas correspondientes a la región P_{*hpxO-P*}

Las posiciones se indican respecto al inicio de transcripción correspondiente al promotor P_{*hpxO*} (^O) o P_{*hpxP*} (^P).

CEBADORES	SONDAS		
	NOMBRE	POSICIÓN	TAMAÑO (pb)
op12F / op13R	Sop1	+246/-111 ^O	357
op12F / op2R	Sop2	+246/+77 ^O	170
op345F / op13R	Sop3	-47/+140 ^P	187
op345F / op4R	Sop4	-47/+55 ^P	102
op345F / op5R	Sop5	-47/-109 ^P	156

Actividades β -galactosidasa (U/mg)

Se presentan las actividades β -galactosidasa correspondientes a las figuras incluidas en RESULTADOS 4.4.2.2, 4.4.2.3., 4.4.3.1. y 4.4.3.2.3. Los valores representan la media de los obtenidos en al menos tres ensayos independientes. La desviación estándar se indica como el porcentaje de la media. En todos los casos es menor o igual al 18%. Los medios de cultivo de detallan en MÉTODOS 3.1.1.

FIGURA 4.13.: Análisis de la expresión de *hpxDE*, *hpxR*, *hpxO* y *hpxPQT*, mediante fusiones transcripcionales, en condiciones de exceso (GNGIn) o limitación de nitrógeno (GGIn).

Fusión transcripcional	Medio de cultivo	
	GGIn	GNGIn
$\Phi(hpxD-lacZ)$	589,26 (6%)	10,65 (6%)
$\Phi(hpxR-lacZ)$	149,54 (6%)	131,91 (16%)
$\Phi(hpxO-lacZ)$	819,62 (5%)	624,02 (16%)
$\Phi(hpxP-lacZ)$	347,57 (6%)	44,19 (10%)

FIGURA 4.14.: Análisis de la expresión de *hpxDE* y *hpxPQT* en ausencia de la subunidad σ^{54} de la RNA polimerasa mediante fusiones transcripcionales, en condiciones limitantes de nitrógeno (GGIn).

Fusión transcripcional	Fondo genómico	
	KC2653	<i>rpoN5018</i>
$\Phi(hpxD-lacZ)$	589,26 (6%)	624,12 (16%)
$\Phi(hpxP-lacZ)$	347,57 (6%)	107,82 (10%)

FIGURA 4.15.: Estudio de la expresión de los operones *hpxDE* y *hpxPQT* en distintos fondos genómicos, mediante fusiones transcripcionales. El medio utilizado fue GGIn (limitación de nitrógeno).

Fusión transcripcional	Fondo genómico			
	KC2653	<i>rpoN5018</i>	<i>ntrC2::Tn5-131</i>	<i>nac-2</i>
$\Phi(hpxD-lacZ)$	589,26 (6%)	624,12 (16%)	668,4 (3%)	479,58 (5%)
$\Phi(hpxP-lacZ)$	347,57 (6%)	107,82 (10%)	84,43 (14%)	760,43 (7%)

FIGURA 4.16.: Estudio de la expresión de *hpxDE* en presencia de hipoxantina o ácido úrico, mediante la fusión $\Phi(hpxD-lacZ)$.

Fusión transcripcional	Medio de cultivo							
	GNGIn	GNGInHx	GNGInUr	GGIn	GGInHx	GGInUr	GHx	GUr
$\Phi(hpxDE-lacZ)$	10,64 (6%)	17,7 (13%)	7,88 (3%)	589,26 (6%)	23.609 (13%)	463,32 (6%)	33.184 (18%)	1.447 (4%)

FIGURA 4.17.: Estudio de la expresión de *hpxR* en presencia de hipoxantina o ácido úrico, mediante la fusión $\Phi(hpxR-lacZ)$.

Fusión transcripcional	Medio de cultivo							
	GNGIn	GNGInHx	GNGInUr	GGIn	GGInHx	GGInUr	GHx	GUr
$\Phi(hpxR-lacZ)$	131,91 (16%)	125,29 (5%)	116,68 (4%)	149,54 (6%)	117,64 (9%)	149,46 (16%)	137,75 (7%)	136,18 (9%)

FIGURA 4.18.: Estudio de la expresión de *hpxO* en presencia de hipoxantina o ácido úrico, mediante la fusión $\Phi(hpxO-lacZ)$.

Fusión transcripcional	Medio de cultivo							
	GNGIn	GNGInHx	GNGInUr	GGIn	GGInHx	GGInUr	GHx	GUr
$\Phi(hpxO-lacZ)$	624,02 (16%)	578,87 (3%)	489,36 (3%)	819,62 (5%)	729,15 (6%)	706,34 (2%)	999,3 (10%)	916,03 (1%)

FIGURA 4.19.: Estudio de la expresión de *hpxPQT* en presencia de hipoxantina o ácido úrico, mediante la fusión $\Phi(hpxP-lacZ)$.

Fusión transcripcional	Medio de cultivo							
	GNGIn	GNGInHx	GNGInUr	GGIn	GGInHx	GGInUr	GHx	GUr
$\Phi(hpxP-lacZ)$	44,19 (10%)	42,47 (9%)	47,54 (15%)	347,57 (6%)	1.944 (18%)	1.109 (11%)	4.170 (13%)	3.892 (17%)

FIGURA 4.20.: Efecto de la acumulación de hipoxantina en la expresión de *hpxDE* y *hpxPQT* analizado mediante fusiones transcripcionales. El medio utilizado fue GGInHx.

Fusión transcripcional	Fondo genómico	
	KC2653	<i>hpxD::mini-Tn5 Km</i>
$\Phi(hpxD-lacZ)$	23.609 (13%)	32.274 (7%)
$\Phi(hpxP-lacZ)$	1.944 (18%)	265,57 (13%)

FIGURA 4.21.: Efecto de la acumulación de ácido úrico en la expresión de *hpxDE* y *hpxPQT*, analizado mediante fusiones transcripcionales. El medio utilizado fue GGInUr.

Fusión transcripcional	Fondo genómico	
	KC2653	<i>hpxO::kan</i>
$\Phi(hpxD-lacZ)$	463,32 (6%)	196,44 (4%)
$\Phi(hpxP-lacZ)$	1.108 (11%)	910,11 (9%)

FIGURA 4.26.: Estudio de la expresión de *hpxDE* en un mutante en el gen *hpxR*, mediante fusiones transcripcionales.

Fusión transcripcional	Medio de cultivo			
	GNGIn	GNGInHx	GGIn	GGInHx
$\Phi(hpxD-lacZ)$	10,64 (6%)	17,7 (13%)	589,26 (6%)	23.609 (13%)
$\Phi(hpxD-lacZ) hpxR::kan$	19,86 (9%)	13,98 (5%)	76,89 (3%)	62,57 (11%)

FIGURA 4.27.: Estudio de la expresión de *hpxR* en un mutante en el gen *hpxR*, mediante fusiones transcripcionales.

Fusión transcripcional	Medio de cultivo			
	GNGIn	GNGInHx	GGIn	GGInHx
$\Phi(hpxR-lacZ)$	131,91 (16%)	125,29 (5%)	149,54 (6%)	117,64 (9%)
$\Phi(hpxR-lacZ) hpxR::kan$	269,36 (8%)	355,12 (2%)	557,51 (3%)	576,54 (6%)

FIGURA 4.28.: Estudio de la expresión de *hpxO* en un mutante en el gen *hpxR*, mediante fusiones transcripcionales.

Fusión transcripcional	Medio de cultivo	
	GGIn	GGInHx
$\Phi(hpxO-lacZ)$	819,62 (5%)	729,15 (6%)
$\Phi(hpxO-lacZ) hpxR::kan$	763,29 (2%)	894,77 (5%)

FIGURA 4.29.: Estudio de la expresión de *hpxPQT* en un mutante en el gen *hpxR*, mediante fusiones transcripcionales.

Fusión transcripcional	Medio de cultivo		
	GGIn	GGInHx	GGInUr
$\Phi(hpxP-lacZ)$	347,57 (6%)	1.944 (18%)	1.109 (11%)
$\Phi(hpxP-lacZ) hpxR::kan$	333,71 (7%)	276,37 (18%)	1.603 (17%)

