



# Caracterización funcional y regulación de los sistemas génicos implicados en el metabolismo de alantoina en *Klebsiella pneumoniae*

Karla Guzmán López

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

**FACULTAT DE FARMACIA**

**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGÍA MOLECULAR**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y REGULACIÓN DE  
LOS SISTEMAS GÉNICOS IMPLICADOS EN EL  
METABOLISMO DE ALANTOINA EN *Klebsiella  
pneumoniae*.**

KARLA GUZMÁN LÓPEZ

2012





**FACULTAT DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGÍA MOLECULAR**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA**

Memoria presentada por KARLA GUZMÁN LÓPEZ 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  
Llavines y la Dra. Josefa Badía Palacín, en el Departamento de Bioquímica y Biología  
Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.

Barcelona, septiembre de 2012

Dra. Josefa Badía Palacín

Dra. Laura Baldomà Llavínés

Karla Guzmán López



A mis padres y hermana



"Si te atrae una lucecita, síguela. Si te conduce al pantano, ya saldrás de él.  
Pero si no la sigues, toda tu vida te preguntarás ¿es que acaso era mi estrella?"

Séneca





Existen personas y acontecimientos en el mundo que jamás podré olvidar, por lo que significaron, lo que me hicieron sentir o simplemente porque su presencia hizo la diferencia en algún breve instante de mi vida, son personas que a donde quiera que vaya siempre llevaré en el corazón. Es para algunas de ellas a quienes van dirigidos estos agradecimientos, ya que no solo me ayudaron a imprimir esta tesis sino también a escribir un capítulo de mi vida.

Para empezar quiero agradecer a mis directoras de tesis, la Dra. Josefa Badía y Dra. Laura Baldomà varias cosas. Primero, haberme ofrecido hace años la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación. Segundo, haber dirigido, corregido y apoyado esta tesis desde su inicio. Pero además, haber comprendido mi situación personal en este último período y haberme brindado su apoyo.

A *Pepita* en particular le agradezco los primeros e-mails que contestó cuando aún no nos conocíamos, sin ello este viaje nunca hubiera comenzado.

Al Dr. Juan Aguilar le agradezco la lectura y corrección de esta memoria, así como las ideas aportadas durante el desarrollo de la tesis.

A la Dra. Rosa Giménez quiero agradecerle la inmensa calidad humana y respeto con que trata a todas las personas a su alrededor. Por todas aquellas veces en que sus palabras y acciones influyeron en mí positivamente sin que ella siquiera lo imaginara. Dicen que la grandeza de un ser humano se mide por la manera en que trata a sus semejantes...muchas gracias por ser tan grande.

A Eva Campos le agradezco haberme enseñado todos los "tips" para algunos experimentos y por seguir en contacto conmigo aun después de tanto tiempo.

A Laura, Elaine y Lorena...hay muchas más cosas que agradecer que lo que aquí se puede expresar. Sin ustedes llegar al laboratorio cada día no habría sido igual, gracias por compartir los éxitos y fracasos de nuestros experimentos, pero sobre todo gracias por haberse convertido en tan buenas amigas para mí, lo malo es que quizá no encontraré gente como ustedes en los laboratorios a los que vaya después. Agradezco de verdad que me hayan permitido compartir instantes importantes de sus vidas. En particular, Laura siempre recordare tu ayuda con el "sofá azul" porque sin yo pedirlo, brindaste tu ayuda a quien en ese entonces era prácticamente una extraña. Elaine, gracias por hacerme sentir que si algún día tenía un problema estarías tu para ayudarme y por ese interés que mostraste siempre. Lorena, gracias por las fotos, viajes y buenos momentos fuera del laboratorio, pero sobre todo gracias por todas las veces en que has secado mis lágrimas.

Al Dr. Carlos Ciudad y a Andrés les agradezco el saludo que cada mañana llegaba a nuestro laboratorio, hubo ocasiones en que ese pequeño gesto hizo la diferencia para mejorar el día.

A los compañeros de todos los demás laboratorios, gracias porque más de alguna vez me ayudaron con algún reactivo de último momento para algún experimento y siempre con una sonrisa. En particular al laboratorio de los peces con quienes tuve más relación, Marina, Diego, Mari e Iván echaré de menos las escapadas al japo y por supuesto las incomparables bromas de Diego. Gracias también a los *jefes* de todos los laboratorios y a los diferentes *cap de departament* que durante estos años han luchado siempre por mejorar el entorno de trabajo.

Gracias a las secretarías, no solo por la información que brindan y que sin ellas sería muy frustrante buscar siempre, sino también por su ayuda y disposición para resolver trámites de último momento que suelen ser importantísimos.

Hay también muchas personas fuera del laboratorio que han contribuido de diferentes formas a hacer esto posible.

A mis padres quiero agradecer su apoyo incondicional en mis decisiones, aún si estas implican anteponer mi felicidad a la suya. Su preocupación en todo momento ha hecho que nunca me sintiera sola pese a la distancia. Gracias por todos los esfuerzos que han hecho a lo largo de mi vida, esta es una pequeña forma de decirles que no han sido en vano. A ti Ana gracias por ser más que mi hermana, mi amiga y confidente, por guardar mis sueños y darme fuerza para luchar por ellos, por estar siempre cerca para consolar mis tristezas y gracias también por tu creatividad en esta portada. A esta mi pequeña familia le agradezco en especial el amor que nunca me ha faltado.

A todos los amigos que he hecho durante este tiempo, en particular a Lucía y Rose, el tiempo libre no habría sido tan divertido, ni los nuevos lugares que conocí tan mágicos, si ustedes no hubieran estado en ellos. Andrea, te agradezco la gran amistad que ha crecido a lo largo de este tiempo, pero sobre todo por las alegrías y tiempos difíciles que hemos pasado juntas porque al final te convertiste en mi pequeña familia de este lado del mar.

Y a ti Ben gracias por estar en mi vida y permitirme compartir la tuya. Por sostener mi mano y darme tu energía, han sido tu fuerza y apoyo los que ayudaron a que las dificultades parecieran más sencillas. Gracias por todas las pequeñas y grandes cosas que haces para hacerme feliz.





## PRESENTACIÓN

El nitrógeno es un compuesto vital para los seres vivos, ya que forma parte de proteínas y ácidos nucleicos. Cuando el amonio, la fuente preferida de nitrógeno, es limitante en el medio, muchos microorganismos son capaces de obtener nitrógeno de otras fuentes alternativas como son las bases púricas y sus metabolitos derivados, entre ellos la alantoina y alantoato.

Este estudio se enfoca en el metabolismo de alantoina, y su derivado alantoato, como fuentes de nitrógeno en la enterobacteria *Klebsiella pneumoniae*. El interés por este metabolismo surgió al observar que *K. pneumoniae* a diferencia de *E. coli* es capaz de utilizar los nitrógenos de la alantoina en condiciones aeróbicas. Los genes implicados en dicho metabolismo están agrupados en dos *clusters* diferentes y su nomenclatura continúa con la propuesta para la degradación de purinas en esta bacteria (de la Riva et al. 2008). La primera agrupación denominada *hpxSAB-hpxC-guaD*, contiene los genes implicados en la degradación de alantoina a alantoato y el gen que codifica guanina desaminasa. En la segunda agrupación se encuentran los genes *hpxFGHIJK-hpxU-hpxWXYZ* que están implicados en el metabolismo posterior de alantoato.

El sistema *hpxSAB-hpxC-guaD* está formado por tres unidades transcripcionales de las cuales *hpxC* y *guaD* se transcriben de manera divergente e independientemente de *hpxSAB*. Hemos determinado su inicio de transcripción, lo que ha permitido establecer que *hpxSAB* y *hpxC* se transcriben a partir de promotores dependientes de la subunidad  $\sigma^{70}$  de la RNA polimerasa mientras que *guaD* presenta un promotor  $\sigma^{54}$ . Por similitud de secuencia proponemos que el gen *hpxA* codifica una racemasa que permitiría la formación de (S)-alantoina a partir de su enantiómero (R). El producto del gen *hpxB* es una alantoinasa que cataliza la degradación de alantoina a alantoato, esta enzima no presenta homología con las alantoinasas típicas, pero sí con la nueva alantoinasa (PuuE) independiente de metales identificada en *Pseudomonas fluorescens*. En base a similitud de secuencia proponemos que el gen *hpxC* codifica una alantoina permeasa que permitiría la entrada a la célula de la alantoina presente en el medio extracelular. El gen *guaD* codifica una guanina desaminasa que cataliza el paso de guanina a xantina. Aunque esta reacción tiene lugar al inicio de la vía de degradación de purinas, ha sido objeto de este estudio ya que forma parte del *cluster* implicado en la degradación de alantoina. El gen *hpxS* codifica una proteína de la familia de reguladores GntR que podría tener un papel dual, actuando como represor en ausencia de alantoina y como activador cuando este metabolito está presente en el medio. HpxS se une a dos sitios contiguos, S1 y S2, cubriendo las cajas -10 y -35 del promotor del operón *hpxSAB*.

La caracterización de la regulación del sistema se ha llevado a cabo mediante diversas metodologías, analizando diferentes cepas mutantes y distintas condiciones de disponibilidad de nitrógeno. Los resultados obtenidos muestran que el *cluster hpxSAB-hpxC-guaD* está sometido a una doble regulación, la llevada a cabo por el sistema global del nitrógeno y la regulación específica de la vía. En este *cluster*, la unidad transcripcional *hpxSAB* es la más regulada, su expresión se induce cuando la

alantoina es la fuente de nitrógeno a diferencia de las otras dos unidades transcripcionales *hpxC* y *guaD* cuya expresión no es inducida por este metabolito.

La transcripción del gen *guaD* está regulada por la disponibilidad de nitrógeno por acción de la proteína NtrC. La expresión del gen *hpxC* parece ser constitutiva. Para que la inducción del operón *hpxSAB* sea completa es necesaria la presencia de las proteínas HpxS y NAC, las cuales podrían interactuar en presencia de alantoina.

En lo que concierne al sistema *hpxFGHIJK-hpxU-hpxWXYZ*, se identificaron tres unidades transcripcionales de las cuales *hpxU* y *hpxFGHIJK* se transcriben en el mismo sentido y de forma divergente a *hpxWXYZ*. De este *cluster*, los operones *hpxFGHIJK* y *hpxWXYZ* se transcriben a partir de promotores dependientes de la subunidad  $\sigma^{70}$  de la RNA polimerasa mientras que en la región promotora de *hpxU* se han identificado secuencias de unión tanto para la subunidad  $\sigma^{54}$  como para la  $\sigma^{70}$ . Por similitud de secuencia se propone que los genes *hpxFGHI* codifican un sistema de transporte tipo ABC que permitiría la entrada del alantoato a la célula. Los genes *hpxJ* y *hpxK* codifican una ureidoglicina aminotransferasa y una alantoato amidohidrolasa respectivamente. La proteína HpxK hidroliza el alantoato para producir ureidoglicina, posteriormente HpxJ cataliza la transaminación entre la ureidoglicina y un  $\alpha$ -cetoácido para producir oxalurato y el correspondiente aminoácido. Por similitud de secuencia se propone que las proteínas codificadas por los genes *hpxW* y *hpxY* podrían ser una oxamato y una oxalurato amidohidrolasa respectivamente. Respecto a los genes *hpxX* y *hpxZ*, aunque presentan homología con otras proteínas, ninguna ha sido caracterizada, solo se sugiere que HpxZ podría estar implicada en la utilización de oxalurato. El gen *hpxU* codifica una proteína reguladora perteneciente a la familia de reguladores RpiR que en ausencia de alantoato, reprime la expresión del operón *hpxFGHIJK* además de regular su propia transcripción. Se han localizado los sitios de unión para HpxU en el promotor de *hpxFGHIJK* y en la región intergénica *hpxU-hpxW*.

La caracterización de la regulación del *cluster hpxFGHIJK-hpxU-hpxWXYZ* muestra que existe un control de la transcripción por el sistema global de nitrógeno y por el regulador específico. El alantoato induce la expresión de los genes *hpxU* y *hpxFGHIJK*. La transcripción del gen *hpxU* está levemente regulada por la disponibilidad de nitrógeno. La expresión de *hpxWXYZ* no está controlada por la presencia de alantoato ni por la disponibilidad de nitrógeno.

Aunque *K. pneumoniae* forma parte de nuestra flora intestinal, existen cepas patógenas que pueden causar ciertas patologías como la neumonía. En un estudio realizado (Chou *et al.* 2004) en personas con artritis reumatoide, enfermedades pulmonares crónicas, meningitis bacteriana y diabetes mellitus no dependiente de insulina; se observó un incremento en los niveles de alantoina respecto a individuos sanos. La capacidad de *Klebsiella pneumoniae* de degradar alantoina ha sido asociada con la capacidad de causar abscesos hepáticos en humanos. Estos hechos podrían representar una ventaja para esta bacteria en la competencia con el resto de especies microbianas que constituyen la flora humana facilitando así la colonización del nicho ecológico. A pesar de que las condiciones del tracto intestinal son anaeróbicas, la capacidad de utilizar aeróbicamente la alantoina como fuente de nitrógeno podría ser útil para las cepas patógenas a la hora de colonizar ambientes aeróbicos como las vías respiratorias.

## ABREVIATURAS

<b>β-ME</b>	B-Mercaptoetanol
<b>AAH</b>	Alantoato amidohidrolasa
<b>AD</b>	Adenina desaminasa
<b>All</b>	Alantoína
<b>Alt</b>	Alantoato
<b>Ap</b>	Ampicilina
<b>ATP</b>	Adenosintrifosfato
<b>Bisacrilamida</b>	N,N'-Metilén-bisacrilamida
<b>Biuret</b>	Ureidoformamida
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>Cm</b>	Cloranfenicol
<b>csp</b>	Cantidad suficiente para
<b>CTAB</b>	<i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i>
<b>DIG</b>	Digoxigenina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EBP</b>	<i>Enhancer Binding Proteins</i>
<b>EDTA</b>	Etilendiaminotetracetato
<b>EMSA</b>	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
<b>FAD</b>	Dinucleótido de flavina y adenina
<b>GD</b>	Guanina desaminasa
<b>GDH</b>	Glutamato deshidrogenasa
<b>Gln</b>	Glutamina
<b>GOGAT</b>	Glutamato sintasa
<b>GS</b>	Glutamina sintetasa
<b>HIU</b>	5-hidroxiisourato
<b>HTH</b>	<i>Helix turn helix</i>
<b>Hx</b>	Hipoxantina
<b>IPTG</b>	Isopropil β-D-tiogalactopiranosido
<b>IHF</b>	<i>Integration Host Factor</i>
<b>Km</b>	Kanamicina
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michaelis Menten
<b>LB</b>	<i>Lysogeny Broth</i>
<b>ME</b>	Molécula efectora
<b>MBP</b>	<i>Maltose-Binding Protein</i>
<b>MoCo</b>	Cofactor molibdeno
<b>MOPS</b>	Ácido-3-(n-morfolín) propanosulfónico
<b>MurNAc</b>	Ácido N-acetilmurámico
<b>NAC</b>	<i>Nitrogen Assimilation Control protein</i>
<b>NAD</b>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
<b>NAPs</b>	Proteínas asociadas a nucleótidos
<b>NBDs</b>	Dominios de unión a nucleótidos



<b>NTR</b>	<i>NiTrogen Regulatory system</i>
<b>NtrC</b>	<i>Nitrogen Regulatory protein C</i>
<b>OHCU</b>	2-oxo-4-hidroxi-4-carboxi-5-ureidoimidazolina
<b>ONPG</b>	o-Nitro-fenil- $\beta$ -D-galactopiranosido
<b>OI</b>	Oxalurato
<b>Om</b>	Oxamato
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de acrilamida
<b>PBS</b>	Tampón fosfato
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>RACE</b>	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>Sm</b>	Estreptomicina
<b>TAE</b>	Tampón Tris-ácido acético glacial
<b>TBE</b>	Tampón de Tris-HCl, Borato y EDTA
<b>Tc</b>	Tetraciclina
<b>TE</b>	Tampón de Tris-HCl y EDTA
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina
<b>TF</b>	Factor de transcripción
<b>TFB</b>	<i>Transformation Buffer</i>
<b>TMDs</b>	Dominios transmembrana
<b>Tn</b>	Transposón
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil) aminometano
<b>U</b>	Unidad de actividad enzimática
<b>Ur</b>	Ácido úrico
<b>Ug</b>	Ureidoglicolato
<b>UGlyAH</b>	Ureidoglicina aminohidrolasa
<b>Ur</b>	Ácido úrico
<b>V<sub>max</sub></b>	Velocidad máxima de reacción
<b>W4</b>	Medio mínimo
<b>XDH</b>	Xantina deshidrogenasa
<b>X-gal</b>	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

# ÍNDICE



<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. DEGRADACIÓN DE PURINAS.....</b>	<b>3</b>
1.1.1. METABOLISMO DE PURINAS EN ENTEROBACTERIAS.....	7
1.1.1.1. En <i>Escherichia coli</i> .....	7
1.1.1.2. En <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	10
<b>1.2. ORGANIZACIÓN GÉNICA EN BACTERIAS.....</b>	<b>13</b>
<b>1.3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN BACTERIAS.....</b>	<b>14</b>
1.3.1. RNA POLIMERASA: Subunidades $\sigma$ y su función.....	14
1.3.2. CONTROL DE LA TRANSCRIPCIÓN POR REGULADORES ESPECÍFICOS: ACTIVADORES Y REPRESORES.....	15
1.3.2.1. Reguladores de la familia GntR.....	17
1.3.2.2. Reguladores de la familia RpiR.....	18
1.3.3. REGULADORES GLOBALES.....	20
1.3.3.1. El sistema NTR: regulación global por nitrógeno.....	20
1.3.3.2. <i>Nitrogen Assimilation Control protein (NAC)</i> .....	22
1.3.3.3. Regulación por curvatura del DNA: IHF ( <i>Integration Host       Factor</i> ).....	24
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>3. MATERIALES.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1. CEPAS BACTERIANAS.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2. VECTORES.....</b>	<b>33</b>
3.2.1. PLÁSMIDOS.....	35
3.2.1.1. Vectores de clonación.....	35
3.2.1.2. Plásmidos utilizados para la obtención de mutantes.....	35
3.2.1.3. Plásmidos utilizados para la construcción de fusiones transcripcionales.....	36
3.2.1.4. Vectores utilizados para la expresión y/o purificación de proteínas.....	36
3.2.2. FAGOS.....	37
<b>3.3. OLIGONUCLEÓTIDOS.....</b>	<b>37</b>
<b>3.4. REACTIVOS Y KITS COMERCIALES.....</b>	<b>37</b>
<b>3.5. PROGRAMAS INFORMÁTICOS Y BASES DE DATOS.....</b>	<b>37</b>

<b>4. MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.....</b>	<b>41</b>
4.1.1. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO.....	41
4.1.1.1. Preparación de un lisado P1.....	43
4.1.2. TRANSDUCCIÓN GENERALIZADA CON EL BATERIÓFAGO P1.....	43
4.1.2.1. Preparación de un lisado P1.....	43
4.1.2.2. Transducción a genoma.....	44
4.1.3. OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES.....	45
4.1.3.1. Métodos químicos.....	45
4.1.3.1.1. Mediante TFB.....	45
4.1.3.1.2. Mediante CaCl <sub>2</sub> .....	46
4.1.3.2. Métodos físicos: electroporación.....	47
4.1.4. TRANSFORMACIÓN DE CELULAS COMPETENTES.....	47
4.1.4.1. Choque térmico.....	47
4.1.4.2. Electroporación.....	48
4.1.5. CONJUGACIÓN.....	48
4.1.6. OBTENCIÓN DE MUTANTES.....	50
4.1.6.1. Mutagénesis dirigida en <i>K. pneumoniae</i> por inserción de un casete de resistencia a antibiótico.....	50
4.1.6.1.1. Utilizando pKAS32.....	51
4.1.6.1.2. Mediante pUT mini Tn5-Tc.....	52
<b>4.2. ANÁLISIS Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....</b>	<b>53</b>
4.2.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES.....	53
4.2.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE LOWRY.....	54
4.2.3. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A MBP.....	55
4.2.4. PURIFICACIÓN DE NAC.....	56
4.2.5. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE-SDS).....	57
4.2.6. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	59
4.2.6.1. Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa.....	59
4.2.6.2. Determinación de la actividad guanina desaminasa.....	60
4.2.6.3. Determinación de la actividad alantoinasa.....	60
4.2.6.4. Determinación de la actividad alantoato amidohidrolasa.....	61

<b>4.3. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA.....</b>	<b>61</b>
4.3.1. OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO.....	61
4.3.2. OBTENCIÓN DE DNA PLASMÍDICO.....	62
4.3.2.1. Obtención de DNA plasmídico a pequeña escala: método de la lisis alcalina.....	62
4.3.2.2. Obtención de DNA plasmídico a media escala.....	62
4.3.3. TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DEL DNA.....	62
4.3.3.1. Digestión del DNA: endonucleasas de restricción.....	62
4.3.3.2. Ligación de fragmentos de DNA.....	63
4.3.3.3. Marcaje de fragmentos de DNA.....	63
4.3.4. TÉCNICA DE PCR.....	64
4.3.5. RESOLUCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA.....	65
4.3.5.1. Separación de fragmentos de DNA en geles de agarosa.....	65
4.3.5.2. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....	66
4.3.5.3. Separación de fragmentos de DNA en geles de poliacrilamida.....	66
4.3.5.4. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de poliacrilamida.....	67
4.3.5.5. Purificación de fragmentos de DNA obtenidos por PCR.....	67
4.3.6. CONSTRUCCIÓN DE MOLÉCULAS HÍBRIDAS DE DNA.....	68
4.3.7. SECUENCIACIÓN DE DNA (MÉTODO DE SANGER) CON SUSTRATOS FLUORESCENTES.....	68
4.3.8. IDENTIFICACIÓN DE REGIONES CROMOSOMICAS POR <i>GENOME WALKING</i> .....	68
<b>4.4. CARACTERIZACIÓN DE PROMOTORES.....</b>	<b>69</b>
4.4.1. FUSIÓN DE PROMOTORES AL GEN <i>lacZ</i> .....	69
4.4.1.1. Obtención de fusiones en vector multicopia.....	69
4.4.1.2. Transferencia de fusiones de promotor de plásmido a genoma.....	69
4.4.2. ENSAYOS DE RETARDACIÓN DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA EN GEL DE POLIACRILAMIDA. ....	71
4.4.2.1. Reacción de unión DNA-proteína.....	71
4.4.2.2. Preparación del gel de poliacrilamida.....	72
4.4.2.3. Separación electroforética de las sondas y los complejos de retardación.....	72

<b>4.5. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA.....</b>	<b>72</b>
4.5.1. OBTENCIÓN DE RNA TOTAL.....	73
4.5.1.1. Separación electroforética del RNA en geles desnaturalizantes de agarosa.....	73
4.5.2. DETERMINACIÓN DEL INICIO DE TRANSCRIPCIÓN.....	74
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>79</b>
<b>5.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS GÉNICOS IMPLICADOS EN LA   UTILIZACIÓN DE PURINAS Y DERIVADOS EN LA CEPA KC2653 DE <i>K.   pneumoniae</i>.....</b>	<b>79</b>
<b>5.2. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA GÉNICO IMPLICADO EN LA   DEGRADACIÓN DE ALANTOINA A ALANTOATO EN LA CEPA KC2653.....</b>	<b>81</b>
5.2.1. ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE <i>hpxSAB-hpxC-guaD</i> .....	81
5.2.2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS PRODUCTOS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>hpxSAB-hpxC-guaD</i> .....	84
5.2.2.1. Asignación de función a GuaD.....	84
5.2.2.2. Asignación de función a HpxB.....	86
5.2.2.3. Asignación de función a HpxA.....	87
5.2.2.4. Función del gen <i>hpxC</i> , asignada por análisis <i>in silico</i> .....	88
5.2.2.5. Función del gen <i>hpxS</i> , asignada por análisis <i>in silico</i> .....	88
5.2.3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE <i>hpxSAB-hpxC-guaD</i> .....	89
5.2.3.1. Efecto de la disponibilidad de nitrógeno.....	89
5.2.3.2. Efecto de la presencia de purinas o derivados en la expresión de las fusiones transcripcionales <i>hpxSAB</i> , <i>hpxC</i> y <i>guaD</i> .....	90
5.2.3.3. Análisis de la expresión de <i>hpxSAB-hpxC-guaD</i> en mutantes <i>nac</i> o <i>ntrC</i> .....	92
5.2.3.4. Función de HpxS en la regulación del sistema génico <i>hpxSAB-hpxC-guaD</i> .....	94
5.2.3.4.1. Análisis de la expresión de <i>hpxSAB-hpxC-guaD</i> en el mutante <i>hpxS::kan</i> .....	96
5.2.4. INTERACCIÓN DE HpxS Y NAC CON LOS PROMOTORES DE <i>hpxSAB-   hpxC-guaD</i> .....	98
5.2.4.1. Análisis de la unión de HpxS a las regiones promotoras de <i>hpxSAB-hpxC-guaD</i> .....	98
5.2.4.2. Análisis de la unión de NAC a las regiones promotoras de <i>hpxSAB-hpxC-guaD</i> .....	104

<b>5.3. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA GÉNICO IMPLICADO EN LA DEGRADACIÓN DE ALANTOATO EN LA CEPA KC2653.....</b>	<b>107</b>
5.3.1. ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE <i>hpxFGHIJK-hpxU-hpxWXYZ</i> .....	107
5.3.2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS PRODUCTOS DE EXPRESION DE LOS GENES <i>hpxFHGIJK-hpxU-hpxWXYZ</i> .....	109
5.3.2.1. Asignación de función a HpxK.....	109
5.3.2.2. Asignación de función a HpxJ.....	112
5.3.2.3. Función de los genes <i>hpxFGHI</i> , asignada por análisis <i>in silico</i> .....	113
5.3.2.4. Función del gen <i>hpxU</i> , asignada por análisis <i>in silico</i> .....	114
5.3.2.5. Función de los genes <i>hpxWXYZ</i> , asignada por análisis <i>in silico</i> .....	114
5.3.3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE <i>hpxFGHIJK-hpxU-hpxWXYZ</i> .....	116
5.3.3.1. Efecto de la disponibilidad de nitrógeno.....	116
5.3.3.2. Efecto de la presencia de purinas o derivados en la expresión de las fusiones transcripcionales <i>hpxFGHIJK, hpxU</i> y <i>hpxWXYZ</i> .....	118
5.3.4. INTERACCIÓN DE HpxU CON LOS PROMOTORES DE <i>hpxFGHIJK-hpxU-hpxWXYZ</i> .....	120
5.3.4.1. Análisis de la unión de HpxU a las regiones promotoras de <i>hpxFGHIJK-hpxU-hpxWXYZ</i> .....	120
5.3.4.1.1. Unión de HpxU a la región promotora de <i>hpxFGHIJK</i> .....	121
5.3.4.1.2. Unión de HpxU a la región intergénica <i>hpxU-hpxW</i> .....	124
<b>5.4. MODELO DE REGULACIÓN DE LOS SISTEMAS <i>hpxSAB-hpxC-guaD</i> Y <i>hpxFGHIJK-hpxU-hpxWXYZ</i>.....</b>	<b>128</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>135</b>
<b>7. REFERENCIAS .....</b>	<b>139</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>151</b>
<b>9. PUBLICACIONES.....</b>	<b>173</b>

K. Guzmán, J. Badía, R. Jiménez, J. Aguilar, L. Baldomà. (2011). Functional assignment and regulation of the genes involved in allantoin to allantoinate metabolism and in the deamination of guanine in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*. **193**(9):2197





# 1. INTRODUCCIÓN



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. DEGRADACIÓN DE PURINAS

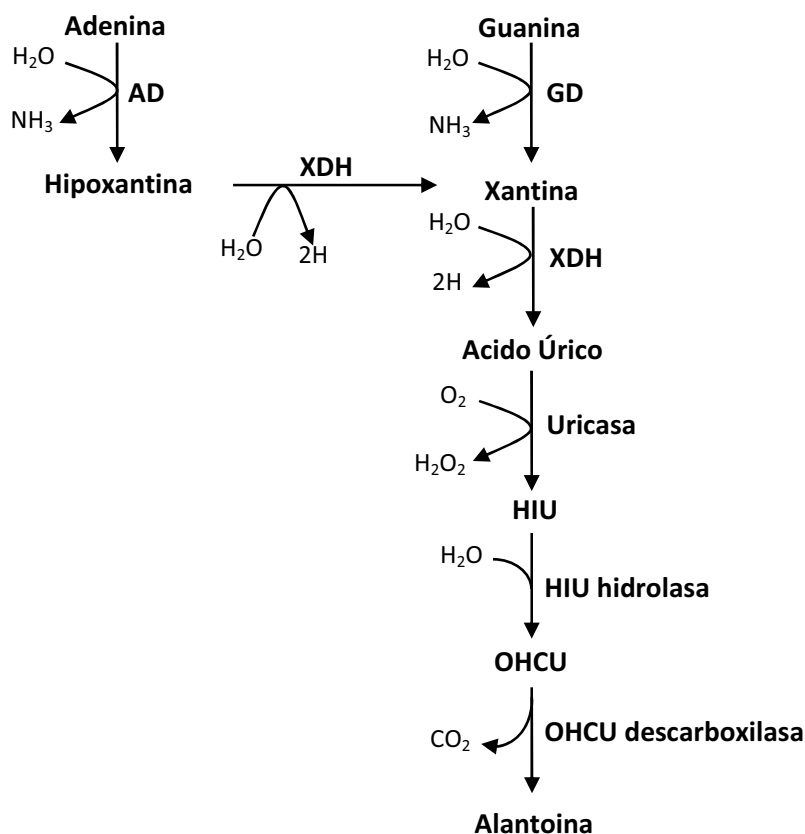
Las bases púricas son compuestos orgánicos heterocíclicos que contienen 4 ó 5 átomos de nitrógeno. Son constituyentes de los ácidos nucleicos y son importantes para la transferencia y almacenamiento de energía (ATP) así como para la síntesis de proteínas y señalización (GTP). Estos compuestos ricos en nitrógenos son utilizados por las plantas, animales y muchos microorganismos para almacenar y translocar nitrógeno para su asimilación o excreción (Pope *et al.* 2009).

Las purinas y sus derivados se encuentran formando parte de la biomasa y están involucradas en casi todos los procesos de la vida. Estos compuestos abundan en los ecosistemas (Vogels and Van der Drift 1976), se forman y degradan continuamente en la biosfera. Proceden de la descomposición de la materia viva y de los productos de desecho de los organismos (Schultz *et al.* 2001).

Cuando el amonio, la fuente preferida de nitrógeno es limitante, plantas, hongos y bacterias pueden obtener nitrógeno de las bases púricas. Así, algunos organismos degradan estos compuestos hasta CO<sub>2</sub> y amonio, mientras que otros contienen solo algunos enzimas de la vía, siendo en este caso la degradación de purinas incompleta.

Para que las purinas puedan metabolizarse estas deben llegar al interior celular. El transporte de bases nitrogenadas a través de las membranas biológicas está mediada por proteínas específicas de transporte transmembrana. Transportadores de nucleobases se han identificado genéticamente y/o fisiológicamente en bacterias, hongos, protozoos, algas, plantas y mamíferos. En bacterias y hongos se han clonado y analizado un número limitado de genes transportadores los cuales han sido analizados a nivel molecular. Se ha evidenciado que los transportadores de nucleobases y secuencias similares de función desconocida presentes en bases de datos constituyen tres familias básicas, denominadas: NAT (*Nucleobase-Ascorbate Transporter*), PRT (*microbial Purine-Related Transporter*) y PUP (*Plant PUrine-related transporter*) (Harry de Koning 2000). La primera familia incluye a miembros de arqueobacterias, eubacterias, hongos, plantas y metazoos, la segunda se limita a los procariotas y hongos, y la tercera sólo se encuentra en plantas. Curiosamente, los transportadores de ascorbato en mamíferos, son homólogos a las secuencias de NAT.

Una vez en el interior celular, el siguiente paso en la asimilación de las bases púricas adenina y guanina como fuente de nitrógeno, es una reacción de desaminación catalizada por enzimas específicas para cada una de las bases dando como resultado una molécula de amonio e hipoxantina o xantina, respectivamente. El catabolismo de hipoxantina o xantina transcurre en dos etapas; en la primera, ambos compuestos son oxidados por la acción de la xantina deshidrogenasa a ácido úrico, el cual es posteriormente convertido en alantoina a través de tres reacciones enzimáticas (FIGURA 1.1.). En la segunda, la degradación de alantoina se completa en la mayoría de los organismos hasta CO<sub>2</sub> y amonio. Aunque la primera parte de esta ruta metabólica es común para todas las especies, la degradación de alantoato puede seguir diferentes vías dependiendo del organismo tal como se muestra en la FIGURA 1.2. (Yoo *et al.* 1985; Cusa *et al.* 1999; Schultz *et al.* 2001; Serventi *et al.* 2009; Werner *et al.* 2010).



**FIGURA 1.1. Vía de degradación de purinas a alantoína.** AD: adenina desaminasa, GD: guanina desaminasa. XDH: xantina deshidrogenasa. HIU: 5-hidroxiisourato. OHCU: 2-oxo-4-hidroxi-4-carboxi-5-ureidoimidazolina.

La oxidación de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico está universalmente catalizada por xantina deshidrogenasas (XDH) o xantina oxidasas. Estos enzimas se han estudiado en bacterias, hongos, plantas y metazoos. Secuencias afines se han encontrado en arqueas. Enzimas de esta familia contienen dominios de unión a FAD y centros ferrosulfurados los cuales son esenciales en la cadena de transporte de electrones durante la reacción de oxidación. La actividad de muchas XDH requiere del cofactor molibdeno (MoCo) como es el caso de la XDH presente en *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa* (Cultrone *et al.* 2005), sin embargo, existen también XDH independientes de MoCo como la descrita en *Klebsiella pneumoniae M5a1* (Garzón *et al.* 1992). En el caso de algunas levaduras como *Saccharomyces pombe* y *Candida albicans* no se han identificado genes que codifiquen XDH a pesar que son capaces de utilizar purinas como fuente de nitrógeno, lo que sugiere que ambos organismos son capaces de oxidar la xantina a ácido úrico mediante una reacción en la que no está implicada ninguna molibdoenzima (Goudela *et al.* 2005).

El ácido úrico formado es posteriormente oxidado a 5-hidroxiisourato (HIU) en una reacción catalizada por la uricasa. Recientemente, esta proteína ha sido purificada y caracterizada a partir de *Aspergillus flavus* (Gabison *et al.* 2010), se trata de un tetrámero con cuatro sitios activos que, a diferencia de otras oxidasas, no es dependiente de metales o cofactores. El producto de la uricasa, HIU, puede hidrolizarse espontáneamente a 2-oxo-4-hidroxi-4-carboxi-5-ureidoimidazolina

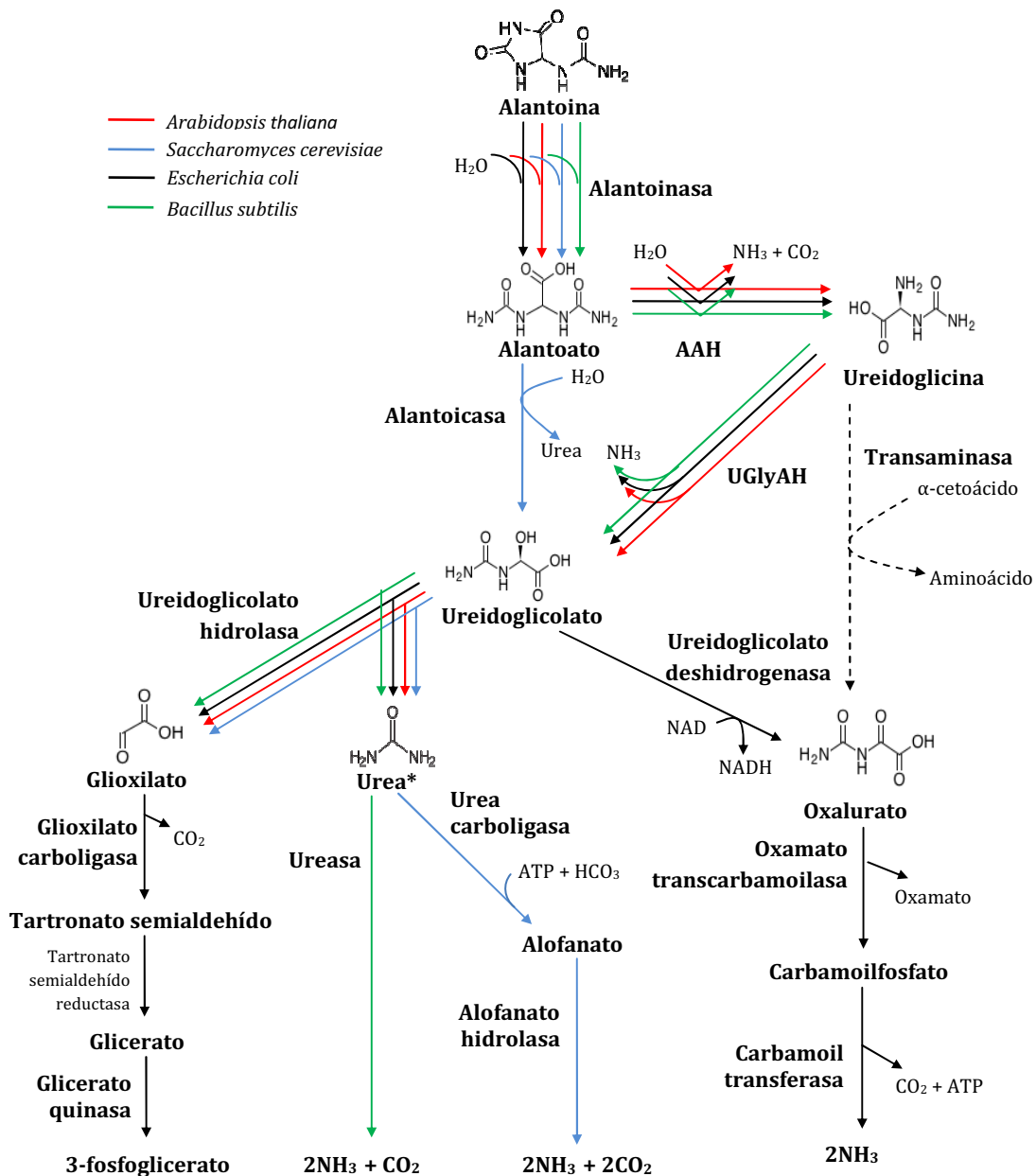
(OHCU), sin embargo, estudios realizados por Kahn and Tipton 2000 sugieren que *in vivo* su hidrólisis es catalizada por la HIU hidrolasa. OHCU puede ser transformado de manera espontánea aunque muy lentamente, o mediante catálisis llevada a cabo por la enzima OHCU descarboxilasa (Werner and Witte 2011).

La alantoína es transformada en alantoato por acción de una actividad alantoinasa. Uno de los genes que codifica esta proteína se identificó por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae* y se le denominó DAL1 (Buckholz and Cooper 1991). La proteína codificada por este gen tenía una clara similitud de secuencia con otras enzimas que actúan sobre anillos amídicos como hidantoinasas. Proteínas homólogas a DAL1 han sido identificadas en anfibios, insectos, bacterias y plantas (Lee and Moss 1991; Kim *et al.* 2000; Yang and Han 2004). Estudios realizados en *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Schizosaccharomyces pombe* demostraron que en determinadas condiciones se expresaba una proteína con actividad alantoinasa (Janssen *et al.* 1982) codificada por el gen *puuE*, la cual fue clasificada por su estructura y secuencia dentro de las polisacárido deacetilasas dada su homología con enzimas que catalizan reacciones hidrolíticas sobre peptidoglicanos (Ramazzina *et al.* 2008). Estudios de mutantes *knockout* en el gen *puuE* (purine ut<sup>il</sup>ization E), evidenciaron que estos carecen de actividad alantoinasa y por tanto no son capaces de crecer en alantoína como fuente de nitrógeno.

Las alantoinasas *PuuE* y *DAL1* aunque catalizan la misma reacción, no presentan similitud de secuencia. El 65% de la actividad alantoinasa codificada por genomas bacterianos es atribuido a *PuuE* aunque también ha sido encontrada en hongos y levaduras. El dominio polisacárido deacetilasa de *PuuE* ha sido relacionado con proteínas involucradas en rutas metabólicas específicas para compuestos asociados a la membrana celular, mientras que el dominio amidohidrolasa de *DAL1* es frecuentemente encontrado en proteínas involucradas en el metabolismo primario, incluyendo enzimas que catalizan otras reacciones del metabolismo de purinas.

Para la posterior degradación de alantoato existen dos rutas metabólicas distintas (FIGURA 1.2.). En algunos hongos, levaduras, bacterias y anfibios el alantoato es metabolizado a través de una enzima denominada alantoicasa hasta urea y ureidoglicolato (Lee and Moss 1991), mientras que en plantas, así como en algunas bacterias, el metabolismo de alantoato se produce a través de la alantoato amidohidrolasa (AAH) generándose en este caso una molécula de amonio, dióxido de carbono y ureidoglicina.

Los genes que codifican alantoicasa se han clonado a partir de diferentes fuentes como son microorganismos (Lee and Moss 1991; Piedras *et al.* 2000), peces y anfibios (Vigetti *et al.* 2000; Vigetti *et al.* 2003; Wang *et al.* 2005). La estructura tridimensional de esta proteína ha sido resuelta a partir de levaduras y muestra una disposición hexamérica en el cristal (dímero de trímeros). La AAH de *E. coli* ha sido también cristalizada y su estructura resuelta. Se trata de un dímero con dos sitios activos para la unión a zinc o manganeso, características en común con la enzima caracterizada de *Bacillus subtilis* (Xu *et al.* 1995; Agarwal *et al.* 2007).



**FIGURA 1.2. Vía de degradación de alantoína en diferentes especies.** AAH: alantoato amidohidrolasa, UGlyAH: ureidoglicina aminohidrolasa. La línea punteada representa una vía postulada en algunas bacterias que carecen de UGlyAH (Werner *et al.* 2010). \*La formación de urea en plantas es aun controvertida.

Se ha propuesto que la ureidoglicina formada es hidrolizada a ureidoglicolato por acción de la ureidoglicina aminohidrolasa (UGlyAH) (Vogels and Van der Drift 1976). Sin embargo, se han encontrado algunas especies bacterianas que carecen de UGlyAH, en cuyo caso se ha observado la presencia en su genoma de un gen que codifica una proteína con actividad aminotransferasa. En este sentido, un estudio reciente en *K. pneumoniae* ha demostrado que la ureidoglicina puede ser convertida directamente en oxalurato a través de una reacción de transaminación catalizada por la ureidoglicina aminotransferasa, producto del gen *hpxJ* (Serventi *et al.* 2009; Werner *et al.* 2010).

El metabolismo del ureidoglicolato en plantas sigue siendo controvertido ya que puede seguir por la vía de la urea o liberar directamente amonio y dióxido de carbono, mientras que en *E. coli* es transformado en glioxilato y urea por acción de la proteína ALLA (Cusa *et al.* 1999).

En cuanto a la degradación de purinas en microorganismos, estos podrían dividirse en dos grupos, los que degradan purinas en condiciones aeróbicas (protozoos, algas, hongos, levaduras y algunas bacterias) y los que las degradan en condiciones anaeróbicas como algunas especies de *Clostridium*. Algunos organismos no expresan la última parte de la vía de las purinas o lo hacen solo en condiciones anaeróbicas, por ejemplo *E. coli* K-12 puede utilizar la alantoína y sus catabolitos como fuente de nitrógeno solo bajo condiciones de anaerobiosis.

### 1.1.1. METABOLISMO DE PURINAS EN ENTEROBACTERIAS.

Los estudios sobre la degradación de purinas en bacterias se han centrado fundamentalmente en las especies *Pseudomonas aureoginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Klebsiella pneumoniae*. Las tres últimas, pertenecientes a la familia de las *enterobacteriaceae*.

Las purinas llegan al intestino como producto de la digestión de alimentos de origen celular. Los ácidos nucleicos son resistentes al medio ácido del estómago, se degradan a sus nucleótidos principalmente en el duodeno; estos compuestos no pueden atravesar las membranas celulares y son hidrolizados posteriormente a nucleósidos por acción de nucleotidasas y fosfatasas. Solo una pequeña fracción de los ácidos nucleicos ingeridos es incorporada a los ácidos nucleicos de los tejidos, por tanto, el destino de la mayor parte de bases nitrogenadas suele ser su degradación y excreción (Voet, 1992). En humanos, el producto del catabolismo de purinas es el ácido úrico, el cual solo puede ser degradado por acción de la flora intestinal ya que los seres humanos carecemos de uricasa. Por ello es importante conocer cómo puede contribuir el metabolismo de nuestra microbiota para la completa degradación de las purinas.

El metabolismo de purinas por las enterobacterias tiene un especial interés por el papel que desempeñan en la fisiología intestinal y por su implicación en diversas patologías. El estudio realizado en el grupo de investigación donde se ha desarrollado esta tesis ha estado centrado particularmente en *E. coli* y *K. pneumoniae*.

#### 1.1.1.1. En *Escherichia coli*.

*E. coli* es capaz de catabolizar purinas, aunque no de forma eficiente para poder utilizarlas como única fuente de nitrógeno en condiciones aeróbicas. Xi *et al.* 2000, demostraron la formación de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de [ $^{14}\text{C}$ ]adenina, lo cual implica la participación de enzimas con actividad xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa. La primera cataliza dos reacciones consecutivas, en las que se produce la conversión de hipoxantina a xantina y posteriormente la conversión de xantina a ácido úrico, el cual es transformado después en alantoína por acción de la uricasa.

Los genes que codifican XDH y uricasa fueron localizados dentro de un *cluster* de 23 genes, en el que se encontraron 5 promotores dependientes de  $\sigma^{54}$ . El análisis



posterior de las secuencias reveló la presencia, además de la XDH, de una alantoinasa y una alantoato amidohidrolasa, lo cual sugería el posterior metabolismo de la alantoína en *E. coli*. Sin embargo no se demostró la formación de amonio ni carbamilo fosfato, lo que implicaba que el metabolismo de purinas es incompleto en condiciones aeróbicas y no suministra nitrógenos durante el crecimiento en condiciones limitantes de nitrógeno (Xi *et al.* 2000). Esto demuestra que la alantoína en condiciones aeróbicas no puede ser metabolizada como fuente de carbono, ni utilizada como fuente de nitrógeno y es compatible con los resultados presentados por Cusa *et al.* 1999. Sin embargo, en condiciones anaeróbicas la alantoína puede ser utilizada como fuente de nitrógeno por esta bacteria. El hecho de que las xantinas deshidrogenasas solo sean funcionales en presencia de oxígeno y que la alantoína solo se pueda metabolizar en condiciones anaeróbicas, justifica que la adenina no pueda ser utilizada de forma eficiente como fuente de nitrógeno en presencia de oxígeno.

El metabolismo de alantoína puede seguir dos vías diferentes dependiendo de la disponibilidad de nitrógeno, carbono y oxígeno (Hasegawa *et al.* 2008). En condiciones anaeróbicas y de limitación de nitrógeno, la alantoína se degrada vía carbamilo fosfato hasta amonio con la finalidad de suministrar una fuente de nitrógeno. En condiciones aeróbicas la alantoína es transformada en 3-fosfoglicerato vía glioxilato con la finalidad de producir energía. Para la asimilación de los nitrógenos de la alantoína, esta es convertida en ureidoglicolato por la acción secuencial de la alantoinasa (*allB*) y alantoato amidohidrolasa (*allC*), generándose en el proceso dos moléculas de amonio (FIGURA 1.3.). El metabolismo del ureidoglicolato producido puede seguir dos vías alternativas ya que es sustrato de dos enzimas diferentes, la ureidoglicolato deshidrogenasa (*allD*) y la ureidoglicolato hidrolasa (*allA*). En este sentido, en condiciones de anaerobiosis y nitrógeno limitante el metabolismo en *E. coli*, sigue por la vía de *allD* para producir nitrógeno, mientras que en condiciones aeróbicas y con la finalidad de obtener energía, a través de *allA* (FIGURA 1.3.).

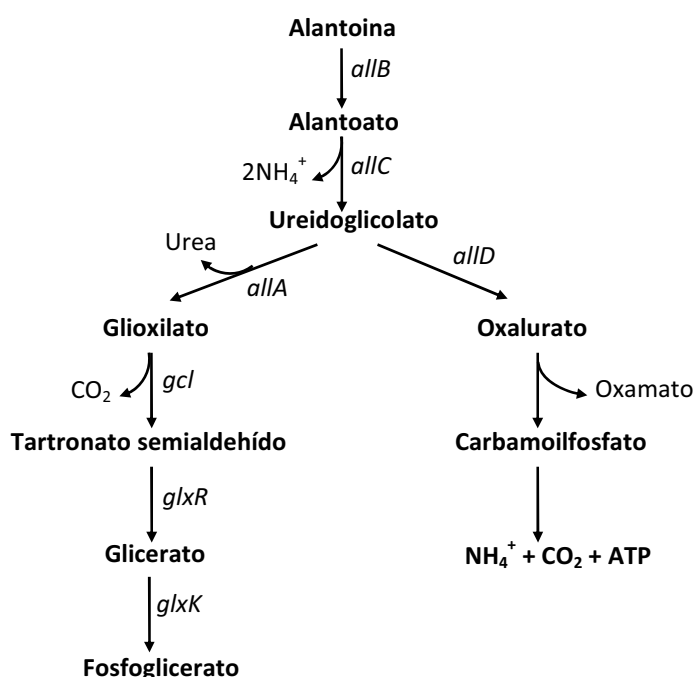


FIGURA 1.3. Ruta metabólica para la degradación de alantoína en *E. coli*.

Continuando por la vía de degradación que permite la obtención de nitrógeno, la ureidoglicolato deshidrogenasa (*allD*) oxida el ureidoglicolato a oxalurato, el cual es posteriormente metabolizado a oxamato y carbamoil fosfato, CO<sub>2</sub> y amonio por la acción secuencial de la oxamato transcarbamoilasa y carbamato fosfotransferasa. El carbamoil fosfato producido puede ser incorporado en la síntesis *de novo* de pirimidinas y arginina. Por la segunda vía, si lo que se quiere es producir energía, la ureidoglicolato hidrolasa (*allA*) convierte el ureidoglicolato en urea y glioxilato el cual es degradado a través de la vía del D-glicerato hasta el intermediario glicolítico 3-fosfoglicerato, por la acción sucesiva de la glioxilato carboligasa (*gcl*), tartrónico semialdehído reductasa (*glxR*) y la glicerato kinasa (*glxK*) (Cusa *et al.* 1999).

Los genes que codifican las enzimas involucradas en este proceso metabólico constituyen el regulón *all* que está organizado en 5 unidades transcripcionales: *allS*, *allA*, *allR*, *gcl-hyi-glxB-ybbV-allB-ybbY-glxK* y *allD-allC-ylbA* (Vogels and Van der Drift 1976; Chang *et al.* 1993; Cusa *et al.* 1999) (FIGURA 1.4.). Este regulón consta de once genes estructurales y dos genes que codifican las proteínas reguladoras AllR y AllS (Rintoul *et al.* 2002).

Los dos reguladores, AllR y AllS, participan en la regulación de la transcripción de más de diez genes involucrados en el catabolismo de alantoína. AllR es un represor, cuyo dominio de unión a la molécula efectora localizado en el extremo C-terminal ha sido cristalizado y caracterizado (Walker *et al.* 2006; Lorca *et al.* 2007). La expresión constitutiva de este represor ocurre tanto en ausencia como presencia de oxígeno. Por otra parte, *allS* es expresado en ausencia de oxígeno e hiperinducido en condiciones de nitrógeno limitante, siendo independiente de reguladores globales de la transcripción como NtrC o NAC, de los cuales se hablará más adelante (Zimmer *et al.* 2000).

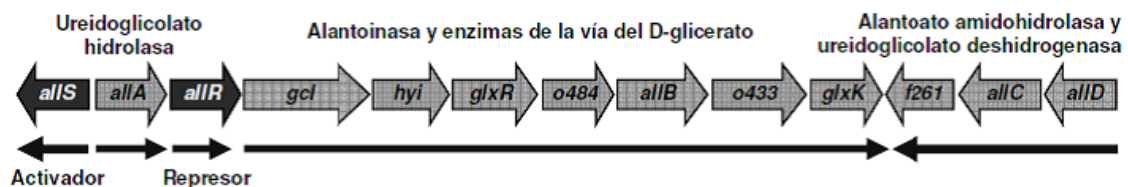
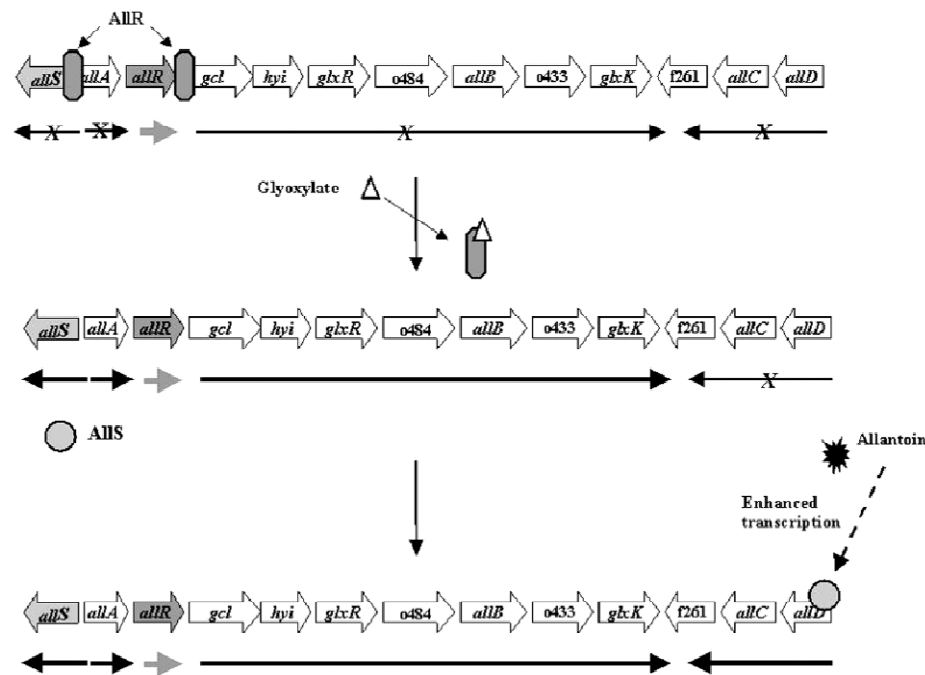


FIGURA 1.4. Regulón *all* de *E. coli*. Se indica la función codificada por cada unidad transcripcional.

El modelo de regulación del sistema *all* fue propuesto por Rintoul *et al.* 2002. El represor AllR, a baja concentración intracelular de glioxilato, bloquea la transcripción de los promotores *palIA*, *pgcl* y *pallS*, los dos primeros controlan la síntesis de enzimas involucradas en el metabolismo de alantoína y glioxilato mientras que el último controla la síntesis del activador AllS. En ausencia de AllS, el operón *allD* no se transcribe. Cuando el glioxilato intracelular aumenta, AllR se une a este efector liberándose de los promotores *palIA*, *pgcl* y *pallS*, para así permitir la transcripción de los genes correspondientes. El incremento de AllS en presencia de alantoína en el medio activa la transcripción a partir de *palID* (FIGURA 1.5.). Estudios realizados posteriormente (Hasegawa *et al.* 2008) muestran que la presencia de alantoína en el medio favorece la interacción entre AllR y los promotores de los genes que regula. Por tanto la alantoína es considerada un corepresor de este sistema. Tomando todo lo anterior en consideración, se sugiere que la actividad de AllR está controlada por dos

moléculas efectoras, alantoína y glioxilato. La represión de los promotores es mayor al formarse el complejo AllR-alantoína. Este complejo, cuando el glioxilato está presente en el medio intracelular, se disocia del DNA permitiendo la transcripción de los genes *allD-allC-f261* a partir del promotor *palID*. Las proteínas reguladoras AllR y AllS juegan por tanto un papel clave en el control coordinado de las dos vías, la función represora de AllR es activada en presencia de alantoína, el sustrato común de ambas vías, llevando a la represión de los genes que llevan a la producción de energía. Por otro lado cuando el glioxilato se acumula, AllR es inactivado y se produce la desrepresión de la vía de producción de energía.

La vía de degradación de purinas también parece estar regulada por RutR (Hasegawa *et al.* 2008). Esta proteína juega un papel clave en la regulación de un conjunto de genes implicados en la síntesis de pirimidinas y de arginina y en la degradación de pirimidinas y purinas, por lo que podría existir una interrelación entre el metabolismo de pirimidinas y purinas a través de RutR. Se ha descrito también que RutR podría controlar el sistema *all* aunque se desconoce el mecanismo de este *cross-talk*.



**FIGURA 1.5. Modelo de regulación por AllR y AllS del regulón de la alantoína en *E.coli*.** Las proteínas reguladoras y sus genes están sombreados. Las flechas negras debajo de los genes indican las unidades transcripcionales y las grises corresponden a genes que se transcriben como unidad (Rintoul *et al.*, 2002).

#### 1.1.1.2. En *Klebsiella pneumoniae*.

*Klebsiella pneumoniae* es una bacteria que forma parte de la microbiota humana aunque también puede encontrarse en el tracto respiratorio y urinario. Sin embargo existen cepas patógenas oportunistas causantes de un gran número de enfermedades multiresistentes a antibióticos como bacteremias, neumonías e infecciones de las vías urinarias (Chou *et al.* 2004; Jonas *et al.* 2004). En estos casos la competencia por el hábitat con el resto de especies microbianas que cohabitan en el huésped es

fundamental para que los patógenos puedan colonizar su nicho ecológico. Las dos especies más importantes desde el punto de vista clínico y epidemiológico son *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*.

*Klebsiella* puede utilizar purinas y alantoína como fuente de nitrógeno y asimilar todos los nitrógenos de estas moléculas (Xi *et al.* 2000).

Hasta el año 2004, no se habían identificado genes de *K. pneumoniae* implicados en la degradación de purinas. En un estudio realizado por Chou *et al.* 2004, se analizaron aislados patógenos de *K. pneumoniae* asociados a infecciones hepáticas y se compararon con cepas no patógenas, entre ellas la MGH78578. A diferencia de las cepas no patógenas, las patógenas contienen un locus de 22Kb asociado al metabolismo de la alantoína el cual es ortólogo al regulón *all* de *E. coli* (FIGURA 1.6). En estos patógenos, el locus identificado está implicado en la utilización de alantoína como fuente de carbono y de nitrógeno tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas.

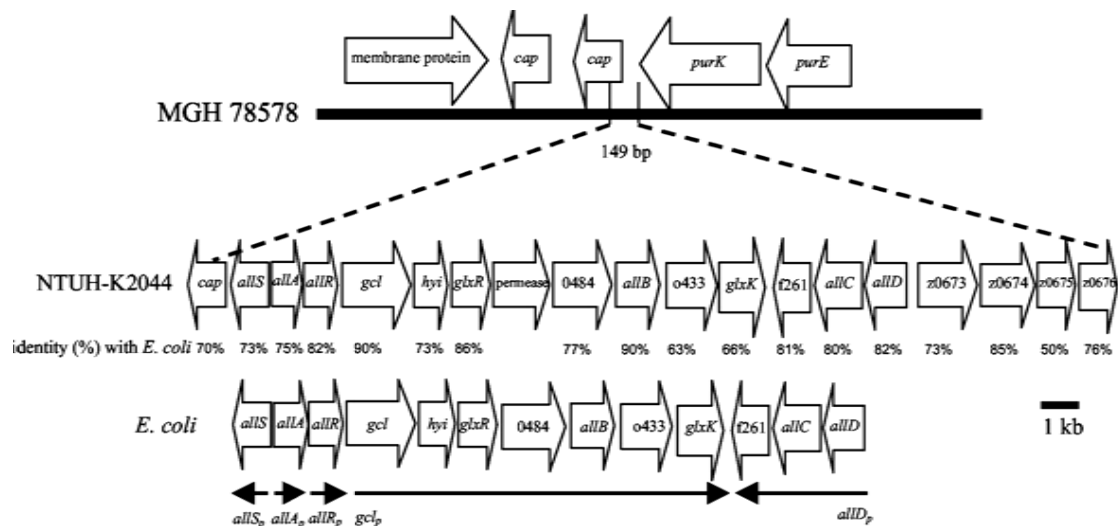


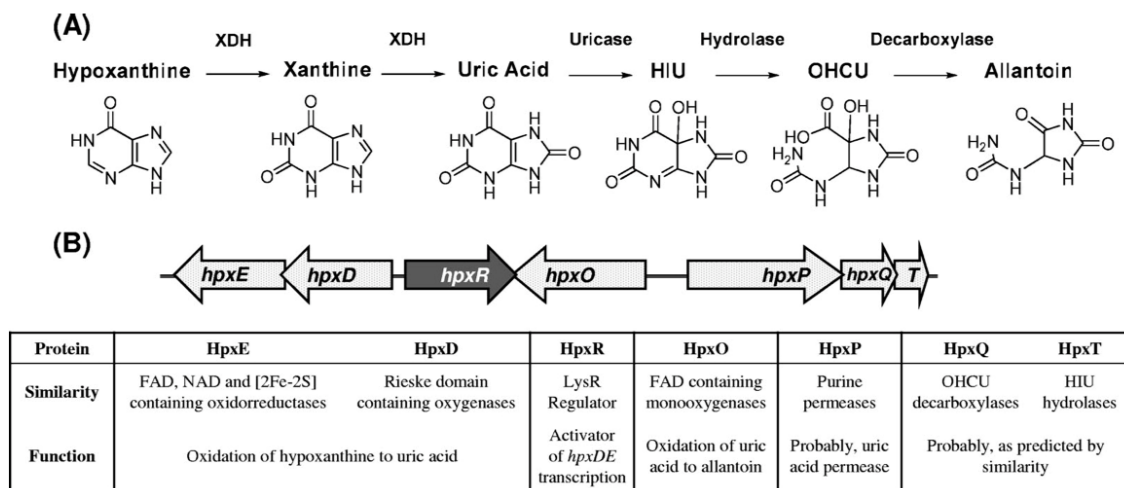
FIGURA 1.6. Regulón *all* de la cepa patógena de *K. pneumoniae* NTUH-K2044. Chou *et al.*, 2004.

Sin embargo existe una gran variabilidad fenotípica y genotípica entre las distintas cepas de *K. pneumoniae* (Brisse and Verhoef 2001). Características como la presencia de plásmidos (Hartstein *et al.* 1993), la resistencia a determinados antibióticos o el aspecto de las colonias pueden ser muy diferentes entre cepas (Lai *et al.* 2003). La presencia del regulón *all* en cepas patógenas y su ausencia en cepas no patógenas puede reflejar también esta variabilidad.

La capacidad de las bacterias de metabolizar alantoína, puede contribuir a su adaptación al medio y ha sido relacionada con ciertas enfermedades humanas. En personas con artritis reumatoide, enfermedades pulmonares crónicas, meningitis bacteriana y diabetes mellitus no dependiente de insulina, se ha observado un incremento en los niveles de alantoína respecto a individuos sanos. Es por ello que la capacidad de *Klebsiella pneumoniae* de degradar alantoína ha sido asociada con la capacidad de causar abscesos hepáticos en humanos (Chou *et al.* 2004).

Estudios realizados posteriormente con *K. pneumoniae* (de la Riva *et al.* 2008) y *K. oxytoca* (Pope *et al.* 2009) muestran que adenina, guanina e hipoxantina pueden ser utilizadas como fuente de nitrógeno por estas cepas en condiciones aeróbicas. La asimilación de todos los nitrógenos de las purinas indica que esta ruta metabólica transcurre hasta su totalidad en ambas especies, lo cual ya había sido sugerido por Xi *et al.* 2000, al observar que la densidad de cultivos de *K. pneumoniae* crecidos con adenina como fuente de nitrógeno era cuatro veces superior a la de los cultivos en los que se utilizaba una concentración equimolecular de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

De la Riva *et al.* 2008 han identificado y caracterizado el sistema génico responsable de la oxidación de hipoxantina hasta alantoína en *K. pneumoniae*. El sistema *hpx* está compuesto por siete genes organizados en cuatro unidades transcripcionales, *hpxDE*, *hpxR*, *hpxO*, y *hpxPQT* (FIGURA 1.7.). Las proteínas involucradas en la oxidación de hipoxantina (HpxDE) y ácido úrico (HpxO) no muestran similitud con ninguna de las proteínas reportadas previamente que catalizan este tipo de reacciones, sin embargo son similares a oxigenasas que actúan sobre compuestos aromáticos. Estudios posteriores demostraron que HpxO es una urato oxidasa, que a diferencia de otras enzimas de este tipo, es dependiente de FAD (O'Leary *et al.* 2009).



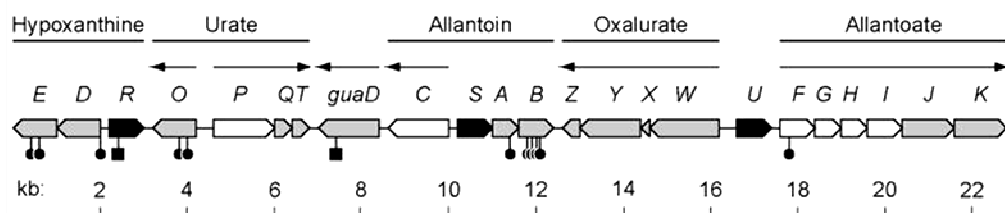
**FIGURA 1.7. Mapa metabólico para la asimilación de hipoxantina hasta alantoína.** (A). Vía de degradación de hipoxantina hasta alantoína. (B). Organización génica del sistema *hpx* en *K. pneumoniae*. La similitud de secuencia y asignación de función de las proteínas codificadas en este sistema se indican en la tabla. XDH, xantina deshidrogenasa (de la Riva *et al.* 2008).

Bajo condiciones de exceso de nitrógeno la expresión de *hpxDE* está reprimida. Cuando el nitrógeno es limitante, la represión desaparece permitiendo la transcripción de este operón. En esta situación, HpxR se une al promotor de *hpxDE* activando su transcripción. En presencia de hipoxantina, HpxR permite la máxima transcripción del operón *hpxDE*, probablemente debido a un cambio conformacional de la proteína reguladora mediada por una molécula señal que facilita la interacción de HpxR con la RNA polimerasa o con algún otro regulador transcripcional. La oxidación de hipoxantina por la oxidasa HpxDE produce ácido úrico, el cual induce la expresión de *hpxPQT*. Este mecanismo de regulación se produce en condiciones de nitrógeno limitante.

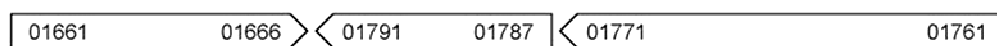
Paralelamente, el metabolismo de purinas ha sido también estudiado por Pope *et al.* 2009 en *Klebsiella oxytoca*. Concretamente se ha identificado un conjunto de 23 genes agrupados que codifican proteínas involucradas en la utilización de purinas como fuente de nitrógeno, la función de algunos de estos genes ha sido asignada por homología de secuencia con otras especies (FIGURA 1.8.a.). Por comparación de secuencia, en *Klebsiella pneumoniae* se observó que estos genes estarían agrupados en tres *clusters* independientes, el locus comprendido entre los genes KPN\_01661 y KPN\_01666 implicado en la asimilación de hipoxantina hasta alantoína (de la Riva *et al.* 2008), el locus comprendido entre KPN\_01787 y KPN\_01790 contiene los genes implicados en el metabolismo de alantoína a alantoato, el gen KPN\_01791 podría ser responsable de la desaminación de guanina a hipoxantina, mientras que el locus KPN\_01761 a KPN\_01766 podría participar en la degradación de alantoato hasta glioxilato (FIGURA 1.8.b.).

Si bien en *K. pneumoniae* se han identificado los sistemas génicos implicados en el metabolismo de guanina e hipoxantina en base a la homología de secuencias con *K. oxytoca*, no hay nada reportado a nivel experimental sobre su caracterización. En este trabajo se abordará el estudio de dichos sistemas génicos a nivel experimental.

#### a). *K. oxytoca*



#### b). *K. pneumoniae* MGH78578



**FIGURA 1.8. Genes en *Klebsiella* sp. para la utilización de purinas.** a). Mapa físico determinado por análisis de secuencia del DNA en *K. oxytoca*. Los genes están anotados con flechas de acuerdo al producto que codifican: gris, enzimas; blanco, proteínas transportadoras; negro, proteínas reguladoras. Los cinco módulos genéticos están anotados por el sustrato sobre el cual actúan. b). Organización genética en *Klebsiella pneumoniae* MGH78578, las puntas de las flechas indican la orientación relativa en el genoma. (Pope *et al.* 2009)

## 1.2. ORGANIZACIÓN GÉNICA EN BACTERIAS.

Las bacterias son capaces de sensor constantemente las condiciones fisicoquímicas extracelulares para poder responder modificando su patrón de expresión génica y adaptarse a las condiciones medioambientales (Ishihama 2000; Pérez-Rueda and Collado-Vides 2000).

Los genes que codifican proteínas de función metabólica relacionada están situados próximos en el genoma bacteriano. Además estos genes tienden a estar colocados en el orden en que tiene lugar la reacción bioquímica de sus productos de expresión. Este orden facilita la regulación coordinada de los genes agrupados

conjuntamente, aportando un beneficio selectivo y de ahorro energético al organismo. Esta agrupación génica recibe el nombre de operón. Por tanto un operón puede definirse como un conjunto de genes que se transcriben en una misma unidad transcripcional formando un RNA mensajero policistrónico y que codifican funciones relacionadas. Los operones contienen normalmente genes que codifican funciones no esenciales para el organismo, mientras que los genes que codifican funciones esenciales suelen transcribirse individualmente.

Genes y/o operones que codifican funciones independientes pueden estar controlados por un mismo factor de regulación. El conjunto de estos operones recibe el nombre de regulón. Un ejemplo puede ser el regulón controlado por el gen regulador *cdaR* que controla la expresión de los operones que participan en el metabolismo de galactarato y glucarato en *E.coli* (Monterrubio *et al.* 2000).

Así mismo un conjunto de genes, operones y regulones pueden estar controlados por un mismo factor de regulación aunque cada uno de estos esté regulado por un regulador específico, constituyendo un modulón. Son ejemplos de modulones, CRP que regula la represión catabólica por glucosa, ARC que regula la expresión aeróbica/anaeróbica, FNR que regula la expresión anaeróbica, NtrC que regula la expresión de genes en condiciones de limitación de nitrógeno, siendo esta regulación de forma directa o indirecta a través de NAC. También cabe resaltar que hay proteínas que ayudan a regular la transcripción porque modulan la curvatura del DNA. Entre estas están HNS, FIS, IHF.

### 1.3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN BACTERIAS

Existen numerosos mecanismos de control de la expresión génica, los cuales son responsables de la actividad diferencial de los genes en las distintas etapas del ciclo de vida de un organismo, en función de sus condiciones fisiológicas o ambientales.

Este control requiere de la activación y/o represión de un gran número de genes que permitan adaptar la fisiología y el metabolismo celular a las nuevas condiciones. Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos para regular la expresión de sus genes que puede tener lugar a diferentes niveles: i) En la estructura del DNA, modificando la topología del mismo. ii) En el proceso de transcripción en todas sus fases: inicio, elongación y terminación. iii) Regulación a nivel de la estabilidad del mRNA. iv) En el proceso de la traducción. v) En la fase postraduccional.

En este apartado nos centraremos en el control del inicio de la transcripción, en especial en aquellos aspectos relacionados con el sistema génico objeto de este estudio. En concreto en el papel de la subunidad sigma de la RNA polimerasa y en el papel de los reguladores globales y específicos, los cuales median de manera precisa la activación o represión de genes dependiendo de las condiciones presentes en el medio de crecimiento (Zhou and Yang 2006; Ishihama 2010).

#### 1.3.1. RNA POLIMERASA: Subunidades $\sigma$ y su función.

La RNA polimerasa de las eubacterias es una enzima formada por cuatro subunidades de constituyen el núcleo o *core* ( $\alpha_2 \beta\beta'$ ) que forma la maquinaria básica para la síntesis de RNA, y una subunidad  $\sigma$ , de la que existen diferentes clases ( $\sigma^{70}$ ,  $\sigma^{54}$ ,

$\sigma^{32}$ ,  $\sigma^{24}$ ,  $\sigma^{28}$ ,  $\sigma^{38}$ ), 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  $\sigma$ . La mayoría de los factores  $\sigma$  en *E. coli* son homólogos a  $\sigma^{70}$ , excepto  $\sigma^{54}$  que posee varias características que la hacen única.

La subunidad  $\sigma^{54}$ , también conocida como RpoN, NtrA y  $\sigma^N$ , está usualmente asociada con la asimilación de nitrógeno. La RNA polimerasa solo puede formar el complejo abierto para la transcripción con  $\sigma^{54}$  con ayuda de las proteínas activadoras EBP (*Enhancer Binding Proteins*) que se unen a sitios funcionales a pesar de la distancia y la orientación (Studholme and Dixon 2003). Las EBP contienen además un dominio que controla la actividad ATPasa (Reitzer and Schneider 2001). La interacción entre  $\sigma^{54}$  y las EBP requiere la curvatura del DNA, la cual esta facilitada en algunos casos por las *DNA bending proteins* como IHF (*Integration Host Factor*) (Carmona *et al.* 1997).

La secuencia consenso establecida para la unión de  $\sigma^{54}$  al DNA es YTGGCACGNNNTTGCW (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 de dA+dT de los 50pb localizados inmediatamente a 5' de esta secuencia es del 70-50% y la longitud media de las regiones intergénicas que contienen un promotor  $\sigma^{54}$  es de  $267 \pm 160$ bp (Reitzer and 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.

Por otra parte la subunidad  $\sigma^{70}$ , codificada por el gen *rpoD*, medía la expresión de la mayoría de los genes involucrados en las funciones celulares más habituales (genes *housekeeping*) (Helmann and Chamberlin 1988). Algunos elementos característicos de los promotores regulados por esta subunidad son:

- a) Un hexámero de secuencia consenso TATAAT situado en la posición -10 respecto al inicio de transcripción.
- b) Un segundo hexámero situado en la posición -35 con una secuencia consenso TTGACA. La separación entre estos hexámeros es habitualmente de  $17 \pm 1$  pb, ambos son reconocidos por la subunidad  $\sigma^{70}$  de la RNA polimerasa.
- c) Una secuencia rica en dA+dT denominada elemento UP (*UPstream element*) que 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 u operón bajo su control.

### 1.3.2. CONTROL DE LA TRANSCRIPCIÓN POR REGULADORES ESPECÍFICOS: ACTIVADORES Y REPRESORES

La transcripción de un gen o sistema génico no depende exclusivamente de la RNA polimerasa, sino que puede estar modulada por otros factores que pueden



activarla o reprimirla. Estos factores son conocidos como factores de transcripción y pueden ser específicos o globales.

En este apartado se tratarán los factores de transcripción específicos. Estos no actúan de forma continua, sino que su función varía según los requerimientos de cada momento.

Se denomina factor de transcripción (TF) a aquella proteína que se une a una secuencia específica del DNA y es necesaria para activar o reprimir la transcripción de un gen. Algunos TFs se unen solo a secuencias de DNA, otros se unen a un segundo TF y otros son capaces de unirse a otros TF al mismo tiempo que al DNA (Jay D 1996; Browning and Busby 2004). La regulación de la transcripción de un gen en un organismo es un mecanismo complicado donde la unión de los TFs al DNA es una clave importante. Según la estructura y homología de secuencia de las regiones de unión al DNA, los TFs pueden ser clasificados en diferentes grupos. El dominio de unión al DNA puede ser *hélix-turn-helix*, *winged hélix* o  *$\beta$  ribbon*.

La localización del lugar de unión de la proteína reguladora en el promotor está directamente relacionada con la función. La mayoría de proteínas activadoras se unen entre las posiciones -80 y -30 de la región promotora respecto al origen de transcripción e interactúan directamente con las subunidades alfa y sigma de la RNA polimerasa. En procesos catabólicos un activador estimula la expresión del gen, normalmente al favorecer la unión de la RNA polimerasa al DNA y generalmente requieren de una molécula inductora para ejercer su efecto. Las proteínas represoras, se unen en secuencias adyacentes o en el lugar de unión de la RNA polimerasa. Cuando se trata de un represor, el TF se une al DNA en ausencia de la molécula efectora para impedir que la RNA polimerasa se una al promotor. Algunos represores pueden ejercer su efecto por unión al RNA mensajero e impedir que el ribosoma inicie la traducción. Algunos TFs actúan únicamente como activadores o represores mientras que otros pueden comportarse de las dos formas (reguladores duales) dependiendo del sitio de unión al DNA respecto al promotor (Yamamoto and Ishihama 2003; Ishihama 2010).

Un ejemplo de regulación dual, sería la llevada a cabo por el regulador LldR implicado en el metabolismo de L-lactato *E. coli*. La proteína LldR puede actuar tanto como represor como activador de la expresión del operón *lldPRD*, dependiendo del lugar al que se una en el promotor ya que este último posee dos cajas (O1 y O2) reconocidas por el regulador (Aguilera *et al.* 2008). La unión de LldR con O1 es lo suficientemente fuerte como para facilitar la unión débil de una nueva molécula de LldR con O2. La interacción de las dos proteínas, unidas a O1 y O2, podría facilitar la formación de un *loop* en el DNA reprimiendo la transcripción del operón *lldPRD*. Cuando el L-lactato está presente, la unión de esta molécula efectora al extremo C-terminal de LldR ocasiona un cambio conformacional que desestabiliza el *loop* del DNA, formando así un complejo abierto para la transcripción. En tal situación, el regulador LldR unido a O1 podría interactuar con la RNA polimerasa, o algún otro regulador transcripcional, para activar la transcripción del operón *lldPRD*.

Algunos sistemas génicos también pueden estar regulados por más de un regulador específico. Tal es el caso de la regulación llevada a cabo por AllR y AllS en el sistema *all*, implicado en metabolismo de alantoina en *E. coli* (INTRODUCCION 1.1.1.1.).

Las proteínas reguladoras pueden ser clasificadas dependiendo de ciertas características de su estructura, dando origen a las llamadas familias de reguladores entre las que se encuentran IclR, LysR, NadR, GntR, RpiR, entre otras.

Se tratarán en este punto, dada su importancia para el desarrollo de este trabajo, dos familias de reguladores: GntR y RpiR.

### 1.3.2.1. Reguladores de la familia GntR.

La familia de reguladores GntR, Pfam PF00392 (Bateman *et al.* 2002), fue descrita por primera vez en 1991 y nombrada después de la identificación del represor del operón del gluconato de *Bacillus subtilis* (Haydon and Guest 1991). En la actualidad cuenta con más de 6200 proteínas localizadas en diversos genomas de eubacterias, por lo que en realidad está considerada como una superfamilia.

Las proteínas reguladoras de la familia GntR están ampliamente distribuidas en el mundo bacteriano y regulan una gran variedad de procesos que van desde el metabolismo primario hasta el desarrollo. Se sabe que las proteínas pertenecientes a esta familia, están implicadas en la regulación de varios procesos celulares fundamentales tales como motilidad, virulencia, producción y resistencia a antibióticos (Jaques and McCarter 2006; Truong-Bolduc and Hooper 2007).

Los reguladores GntR usualmente están localizados en la región cromosómica adyacente a los genes que controlan. Cuando una molécula efectora, que normalmente es un intermediario metabólico de la vía regulada, se une al extremo C-terminal, ocurre un cambio conformacional en la proteína que modifica sus características de unión al DNA resultando en la represión o activación de la transcripción (Hoskisson and Rigali 2009).

Dada la gran variedad de moléculas que pueden ser reconocidas por los reguladores GntR, no es de sorprender que estén involucrados en la regulación de muchos procesos metabólicos primarios, modulando la expresión génica como respuesta al cambio en la concentración de metabolitos en el medio. Se ha descrito que las proteínas miembro de esta familia están involucradas en la regulación del metabolismo de ácidos grasos (DiRusso *et al.* 1993), catabolismo de aminoácidos (Allison and Phillips 1990; Ortuño-Olea and Durán-Vargas 2000) y regulación del catabolismo de carbono (Mota *et al.* 1999; Rigali *et al.* 2002).

Los dominios de unión al DNA de la familia GntR comparten un importante nivel de similitud y todos presentan el motivo topológico de unión al DNA “winged-helix-turn-helix” (WH) con el motivo HTH típico seguido de una  $\beta$ -horquilla. Por el contrario, el dominio C-terminal de unión al ligando varía significativamente entre las distintas proteínas, proporcionando una base para la clasificación actual de las subfamilias principales, HutC, MocR, YtrA, AraR, la PlmA, y la familia FadR que es la más grande ya que comprende aproximadamente el 40% de todos los reguladores de la familia GntR, (Lee *et al.* 2003; Franco *et al.* 2006). El regulador mejor caracterizado de esta familia es el producto de expresión del gen *fadR*, miembro fundador de la subfamilia FadR. Esta proteína funciona como un represor del regulón *fad*, que incluye los genes responsables del transporte, activación y  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos de cadena larga

y media (DiRusso *et al.* 1993). Se ha resuelto la estructura cristalina del represor, así como las estructuras de complejos con el oligonucleótido dsDNA del promotor y con el efector, miristoil-CoA (van Aalten *et al.* 2000; van Aalten *et al.* 2001; Xu *et al.* 2001). Estos estudios revelaron el mecanismo por el cual los cambios de conformación inducidos por el efector en el dominio regulador se transmiten al dominio WH y consecuentemente como se produce la interrupción en la interacción represor-operón, con lo que se elimina la represión.

Se ha demostrado que FadR controla negativamente 12 genes y también actúa como un activador de otros tres genes más (DiRusso *et al.* 1993). Los reguladores de la subfamilia FadR se hallan normalmente involucrados en la encrucijada de rutas metabólicas, por ejemplo, galactonato (DgoR), gluconato (GntR), vanillato (VanR) ó malonato (MatR). Tienen en común el disponer de un dominio C-terminal formado por 6 ó 7  $\alpha$ -hélices, pero no presentan similitud de secuencia de aminoácidos.

La mayoría de los reguladores transcripcionales (WH) en procariontes se unen al DNA como proteínas homodiméricas, en este sentido estudios realizados con FadR (Raman *et al.* 1997) demostraron que la formación del dímero está mediada por interacciones específicas en los dominios C-terminal. Para su unión al DNA juega también un papel importante la secuencia de unión en el promotor que puede tener estructura tanto de *inverted repeat* como de *direct repeat* (Rigali *et al.* 2002). El alineamiento de la secuencia de los promotores regulados por proteínas pertenecientes a esta familia, permitió identificar una secuencia palindrómica común 5'-(N)<sub>y</sub>GT(N)<sub>x</sub>AC(N)<sub>y</sub>-3'.

Los estudios realizados con la familia FadR han demostrado la naturaleza de sus miembros para autoregular negativamente su transcripción, así como el hecho de poder actuar como activadores y represores en la misma vía. Tal es el caso del propio regulador FadR en *E. coli*, mencionado anteriormente, de la proteína NorG de *Staphylococcus aureus* que es un activador/represor de transportadores tipo ABC involucrados en la autólisis de la pared celular (Truong-Bolduc and Hooper 2007), o de del regulador dual LldR implicado en el metabolismo de L-lactato en *E. coli* (Aguilera *et al.* 2008).

Respecto a otras subfamilias, se ha resuelto la estructura 3D de la proteína PhnF (miembro de la subfamilia HutC), que regula el transporte y biodegradación de fosfonatos en *E. coli* (Gorelik *et al.* 2006). Se conoce también que los miembros de MocR usualmente catalizan la transferencia de un grupo amino a un aceptor de moléculas como un cetó-ácido (Ko *et al.* 1999), la subfamilia YtrA parece estar siempre asociada con transportadores tipo ABC, pero se desconoce mucho todavía respecto a las mismas.

### 1.3.2.2. Reguladores de la familia RpiR.

Esta familia de reguladores transcripcionales está poco caracterizada, sin embargo existen algunas proteínas que han sido identificadas y estudiadas en diferentes microorganismos.

El primer miembro de esta familia, fue la proteína RpiR de *Escherichia coli* (a la cual se debe su nombre) que además de autoregularse, está involucrada en la regulación de la expresión del gen *rpiB* cuyo producto interconvierte la ribulosa 5-fosfato y ribosa 5-fosfato. En el estudio se describe que las regiones promotoras de *rpiB* y *rpiR* son zonas ricas en AT, cada una de ellas contiene un *inverted repeat* y varios *direct repeats*, y se sugiere que dichas características de los promotores podrían ser importantes para la unión del regulador al DNA (Sorensen and Hove-Jensen 1996).

Algunos homólogos de RpiR han sido identificados tanto en bacterias gram-negativas como gram-positivas, siendo capaces de comportarse como represores o activadores de la transcripción.

Es frecuente que los miembros de esta familia actúen como reguladores transcripcionales del catabolismo de azúcares. En *B. subtilis* el metabolismo de la maltosa está regulado por un activador perteneciente a esta familia, en *E. coli* controla el catabolismo de la ribosa, mientras que en *Pseudomonas putida* y *Salmonella enterica* reguladores de este tipo están involucrados en la degradación de la glucosa e inositol respectivamente. Se ha observado que las proteínas de esta familia contienen en su extremo N-terminal una región HTH de unión al DNA, característica de muchos reguladores transcripcionales. Este tipo de dominio es uno de los más difundidos en procariotas. Generalmente las proteínas con extremo HTH forman homodímeros para unirse a una secuencia palindrómica de DNA (Sorensen and Hove-Jensen 1996; Yamamoto *et al.* 2001; Daddaoua *et al.* 2009).

Estudios sobre el catabolismo del ácido N-acetilmurámico (MurNAc), un amino azúcar asociado a la pared celular de casi todas las eubacterias, realizados en *E. coli*, revelaron la presencia de una proteína reguladora perteneciente a la familia RpiR (MurR) la cual controla la expresión de la MurNAc esterasa (MurQ). MurR forma un multímero que se une a dos *inverted repeats* adyacentes entre sí presentes en la región intergénica *murQ-murR*, de esta forma MurR reprime la expresión de MurQ e interfiere con su propia transcripción. La formación de un tetrámero de MurR, sugiere que dos dímeros de esta proteína se unen simultáneamente a los dos *inverted repeats* identificados en la región promotora (Jaeger and Mayer 2008).

Recientemente se han identificado tres homólogos a RpiR en *Staphylococcus aureus* (RpiRA, RpiRB, RpiRC) implicados en la transcripción de las proteínas de la vía de las pentosas fosfato. Los tres homólogos contienen en su extremo C-terminal un dominio denominado SIS. Este dominio está presente en proteínas que participan en la isomerización de azúcares fosfato y también se han encontrado en represores que sensan la concentración celular del producto generado por el último enzima al cual regulan, lo cual sugiere que su actividad reguladora puede estar controlada por intermediarios de la vía (Zhu *et al.* 2011).

En *Sinorhizobium meliloti*, una proteína miembro de la familia RpiR regula la transcripción de los genes *iolY*, *iolR*, *iolC*, implicados en el metabolismo del inositol (IoIR). Por comparación de secuencia de los tres promotores, se identificó una secuencia consenso de unión a IoIR: 5' -GGAA-(N)<sub>6</sub>-TTCC-3' (Kohler *et al.* 2011).

### 1.3.3. REGULADORES GLOBALES

Los factores de transcripción globales son capaces de regular la transcripción de un gran número de unidades transcripcionales pertenecientes a diferentes rutas metabólicas. Entre los reguladores globales se encuentran por ejemplo NtrC y NAC (regulación por nitrógeno, ver INTRODUCCION 1.3.3.1.), IHF (controla la curvatura del DNA, ver INTRODUCCION 1.3.3.3.), CRP (regulación por carbono) (Martínez-Antonio and Collado-Vides 2003), etc. Por la relevancia que tienen en este trabajo nos centraremos en los reguladores globales NtrC, NAC e IHF.

#### 1.3.3.1. El sistema NTR: regulación global por nitrógeno.

El amonio es la fuente de nitrógeno preferida de las bacterias, sin embargo, no está siempre presente en el medio. Cuando esto ocurre, se ponen en marcha rutas metabólicas alternativas que permitan obtener el nitrógeno de otras fuentes, tales como aminoácidos, algunos compuestos de nitrógeno inorgánico y bases nitrogenadas. En condiciones en las que la fuente de nitrógeno es limitante se produce la regulación coordinada de genes involucrados en rutas metabólicas que permiten la asimilación del nitrógeno en dichas condiciones.

La asimilación de nitrógeno requiere de la síntesis de glutamina y glutamato, ya que estos compuestos son los donadores celulares por excelencia de nitrógeno. En el caso de fuentes que no puedan transferir el nitrógeno contenido en su estructura directamente a glutamina o glutamato mediante transaminación, el amonio se convierte en el intermediario obligatorio (Reitzer and Schneider 2001).

En enterobacterias existen dos rutas para la asimilación de amonio. En la primera, la enzima glutamina sintetasa (GS) cataliza la conversión de amonio y glutamato en glutamina y la enzima glutamato sintetasa (GOGAT) transfiere el nitrógeno del grupo amina de la glutamina a  $\alpha$ -cetoglutarato para producir dos moléculas de glutamato (FIGURA 1.9.). En la segunda, la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) cataliza la conversión de amonio y  $\alpha$ -cetoglutarato en glutamato, sin embargo esta ruta solo es funcional en condiciones de exceso de nitrógeno (Merrick and Edwards 1995).

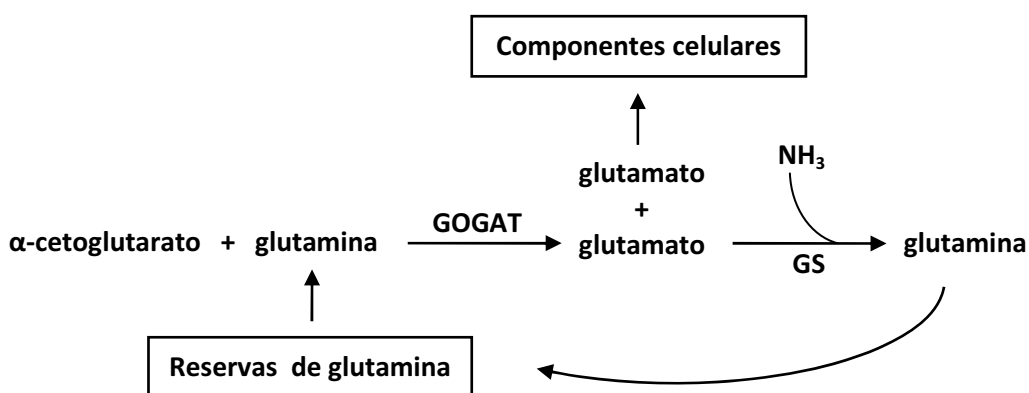
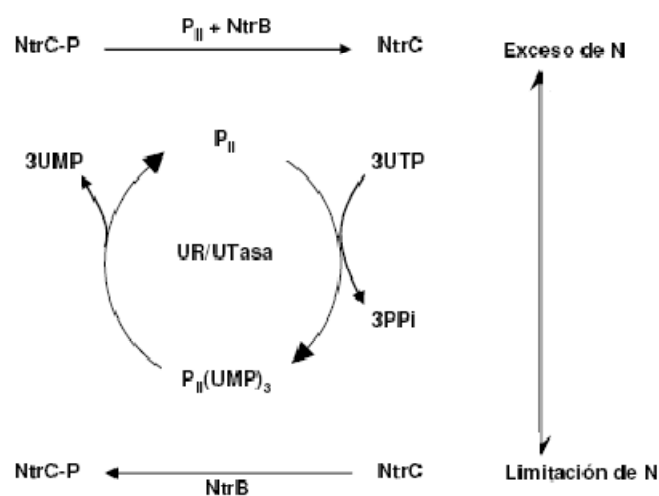


FIGURA 1.9. Asimilación de amonio en enterobacterias en condiciones de exceso de nitrógeno. GOGAT: glutamato sintetasa. GS: glutamina sintetasa.

La regulación por nitrógeno en enterobacterias está bajo el control del sistema NTR (*NiTrogen Regulatory system*) el cual está compuesto de cuatro proteínas: UTasa-UR (*UridylylTransferase-Uridylyl-Removing*),  $P_{II}$ , NtrB y NtrC (*NiTrogen Regulatory protein C*). UTasa-UR y  $P_{II}$  están implicadas tanto en la regulación de la actividad de la enzima GS como en la regulación de genes dependientes de  $\sigma^{54}$ . 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 con promotor dependiente de  $\sigma^{54}$ .

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 se localizan generalmente cerca de la posición -100 respecto del inicio de transcripción y cada una de ellas es reconocida por un dímero de NtrC. Dado el distante sitio de unión al DNA entre NtrC y la RNA polimerasa, el contacto entre ambas proteínas generalmente esta facilitado por la curvatura del DNA que produce el factor IHF (Carmona *et al.* 1997). Los promotores activados por NtrC contienen al menos dos secuencias de unión para esta proteína debido a que la interacción entre este activador y la subunidad  $\sigma^{54}$  requiere que NtrC forme un oligómero compuesto por al menos dos dímeros. La formación de tal oligómero solo se puede llevar a cabo una vez que NtrC es fosforilado por NtrB.

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  $\sigma^{54}$  favoreciendo la formación del complejo abierto para iniciar la transcripción. Por el contrario, en condiciones de exceso de nitrógeno  $P_{II}$  permanece sin modificar.  $P_{II}$  no uridinilado es incapaz de interactuar con NtrB, lo que provoca la desfosforilación de NtrC-P (FIGURA 1.10.). De esta manera NtrC desfosforilado puede unirse al DNA pero es incapaz de interactuar con  $\sigma^{54}$  (Bender 1991; Merrick and Edwards 1995; Reitzer and Schneider 2001).

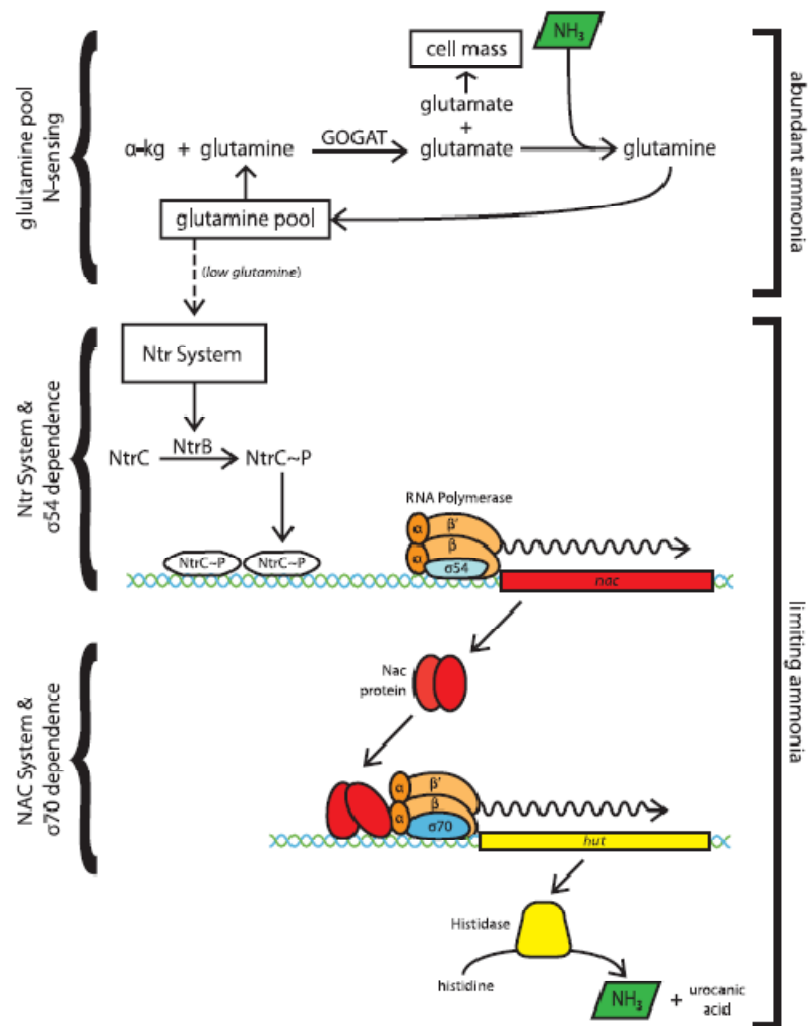


**FIGURA 1.10. Modelo de la regulación de la actividad de NtrC en respuesta a las condiciones de nitrógeno.** UR/UTasa cataliza la uridinilación y desuridinilación de  $P_{II}$ . NtrB cataliza la fosforilación y defosforilación de NtrC. (Merrick y Eduarwds, 1995).

### 1.3.3.2. Nitrogen Assimilation Control protein (NAC).

Cuando el nitrógeno es limitante, NtrC-P activa la transcripción de un gran número de operones que contienen genes involucrados en proveer nitrógeno a la célula. Sin embargo, la transcripción de un conjunto de operones regulados por nitrógeno es dependiente de la subunidad  $\sigma^{70}$  de la RNA polimerasa y no de  $\sigma^{54}$ . La transcripción de estos operones es regulada por nitrógeno indirectamente a través del regulador NAC perteneciente a la familia LysR (Best and Bender 1990; Collins *et al.* 1993). La secuencia consenso de unión de esta proteína al DNA ha sido identificada: ATA-N<sub>9</sub>-AAT. Dicha unión, se produce en condiciones limitantes de nitrógeno.

La síntesis de NAC es totalmente dependiente de NtrC-P, el cual se une al promotor  $\sigma^{54}$  del gen *nac*. NAC activa la transcripción de genes dependientes  $\sigma^{70}$  cuyos productos proporcionan amoníaco o glutamato a la célula (FIGURA 1.11.).



**FIGURA 1.11. Regulación de NAC por NtrC.** El regulador NAC conecta la transcripción de genes dependientes de  $\sigma^{70}$  con la regulación efectuada por el sistema NTR (promotores  $\sigma^{54}$ ). En el esquema se representa la activación, mediada por NAC, de la expresión del operón *hut* (*histidine utilization*) en condiciones de nitrógeno limitantes (Bender 2010).

La mayoría de los estudios sobre NAC se han realizado en *K. pneumoniae*. NAC es un regulador muy versátil ya que puede actuar tanto como activador ó represor (Bender 1991). En general, NAC activa la transcripción de genes implicados en la utilización de fuentes de nitrógeno limitantes 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 el operón *gdh* (Schwacha and Bender 1993). Pero además, NAC autoregula la expresión de su propio gen. Así pues, el gen *nac* es el único dependiente de  $\sigma^{54}$  que es regulado por NAC.

Por lo que respecta a otras enterobacterias, *E. coli* también expresa NAC aunque la regulación por esta proteína no es relevante (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*).

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

**TABLA 1.1. Rutas regulables por la disponibilidad de nitrógeno en *K. pneumoniae*** (Bender 1991; Janes and 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

Estudios recientes indican que la regulación efectuada por NAC es más amplia de lo que inicialmente se pensaba ya que es capaz de unirse a más de 90 regiones promotoras en *K. pneumoniae*. Lo anterior sugiere que la regulación por NAC, como respuesta a la limitación de nitrógeno, abarca no solo a genes implicados en el metabolismo del nitrógeno, sino también algunos involucrados en el balance de las fuentes de nitrógeno y carbono (Frisch and Bender 2010).

Entre los promotores identificados en *K. pneumoniae* que se unen a NAC se encuentra el que regula la expresión del locus KPN\_01789/01790 el cual podría codificar un regulador transcripcional y una alantoína permeasa respectivamente. Ambos genes están implicados en el metabolismo de alantoína como fuente de nitrógeno.



### 1.3.3.3. Regulación por curvatura del DNA: IHF (*Integration Host Factor*)

La estructura del DNA, como puede ser la formación de bucles, tiene gran importancia en procesos como la regulación transcripcional. Estos giros se forman cuando dos 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 diferentes. A este tipo de proteínas se les conoce como NAPs (*Nucleotide Associated Proteins*).

Las proteínas asociadas a nucleótidos (NAPs), son reguladores globales de la transcripción génica en bacterias. Alteran la topología de unión al DNA ya que provocan la formación de giros y curvaturas en su estructura. Estudios realizados en 12 tipos de NAPs en *E.coli*, mostraron que generalmente son expresadas a altos niveles y difieren unas de otras en el grado de especificidad por el DNA, así como en el nivel de expresión a lo largo de las diferentes fases de crecimiento bacteriano (Azam and Ishihama 1999). Se han identificado varias NAPs en bacterias, entre las principales destacan: IHF, HU, Fis, Dan (Ishihama 2010; Czaplá *et al.* 2011).

IHF es una proteína formada por dos subunidades, IhfA e IhfB, con perfiles de unión al DNA similares, lo cual indica una tendencia a formar heterodímeros (Prieto *et al.* 2011). IHF juega un papel dual, por una parte está implicada en el superenrollamiento y desestabilización de la doble cadena del DNA, y por otra parte, participa en numerosos procesos fisiológicos como replicación, recombinación específica, transposición y expresión de numerosos genes.

En la regulación de la transcripción, IHF facilita la formación de un *loop* alrededor del promotor, para conseguir una conformación activa, con un ángulo de curvatura de aproximadamente 160° (Sugimura and Crothers 2006). La unión de IHF a sitios de baja afinidad y la presencia de *loops* en las regiones promotoras, favorece la formación del complejo responsable de iniciar la transcripción (Zhou and Yang 2006; Ishihama 2010).

Varios estudios se han realizado para aportar más información sobre IHF como regulador de la transcripción. Hasta el momento se han identificado 150 genes cuya transcripción esta mediada por IHF (Gama-Castro *et al.* 2008). En este sentido, cabe destacar el estudio realizado en los operones *nir* y *fim* de *E. coli*, donde IHF reprime la transcripción del primero y activa la del segundo (Browning *et al.* 2008). Además, se ha reportado que algunos genes determinantes para la virulencia de ciertas especies de *Salmonella* están bajo el control de IHF (Mangan *et al.* 2006).

El lugar de unión de IHF, el cual está altamente conservado, es una región de DNA de aproximadamente 35pb, dividida en dos dominios asimétricos, uno de los cuales está formado por una secuencia conservada de 13pb y otro por una secuencia degenerada rica de 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).

Tal como se ha comentado anteriormente IHF participa en la regulación de la transcripción por NtrC en condiciones de nitrógeno limitante. La activación de la transcripción mediada por NtrC requiere que el promotor del gen activado contenga al

menos dos secuencias de unión para dicho regulador, de tal forma que cada una de ellas sea reconocida por un dímero de NtrC. Debido a la distancia existente entre las dianas de unión de NtrC y la secuencia de unión de  $\sigma^{54}$ , el contacto entre ambas proteínas generalmente está facilitado por la curvatura del DNA que produce el factor IHF (Carmona *et al.* 1997; Wassem *et al.* 2000).



## 2. OBJETIVOS



---

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar como ciertas condiciones del medio como la disponibilidad de nitrógeno, pueden provocar cambios en la expresión génica de las enterobacterias de tal forma que esta adaptación a las condiciones extracelulares pueda favorecer la colonización del nicho ecológico.

Concretamente nos hemos centrado en el metabolismo de purinas en *K. pneumoniae*, los objetivos planteados han sido:

- 1) Caracterizar el sistema génico *hpxSAB-hpxC-guaD* implicado en el metabolismo de alantoina como fuente de nitrógeno.
  - Asignar función a los genes de este sistema.
  - Caracterizar el gen *hpxB* implicado en la degradación de alantoina a alantoato.
  - Caracterizar el gen *guaD* implicado en la degradación de guanina a xantina.
  - Analizar el efecto de la disponibilidad de nitrógeno en la regulación de la expresión génica del sistema.
  - Caracterizar la función de la proteína HpxS en la expresión del operón *hpxSAB*.
  - Analizar la participación del sistema NTR/NAC en la regulación transcripcional de los genes de este sistema.
  
- 2) Caracterizar el sistema génico *hpxFGHIJK-hpxU-hpxWXYZ* implicado en el metabolismo de alantoato como fuente de nitrógeno.
  - Asignar función a los genes de este sistema.
  - Caracterizar el gen *hpxK* implicado en la degradación de alantoato a ureidoglicina.
  - Caracterizar el gen *hpxJ* implicado en la degradación de ureidoglicina a oxalurato.
  - Analizar el efecto de la disponibilidad de nitrógeno en la regulación transcripcional del sistema.
  - Caracterizar la función de la proteína HpxU en la regulación de la expresión de este sistema.



# 3. MATERIALES





### 3. MATERIALES

#### 3.1. CEPAS BACTERIANAS

Las cepas de *Escherichia coli* y *Kebsiella pneumoniae* que fueron utilizadas en este trabajo se presentan en la TABLA 3.1. 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 3.1. Cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*.** Para cada cepa se indica su nombre, descripción del fenotipo/genotipo y su origen o referencia. \*Las secuencias de nucleótidos están dadas en dirección 5'-3' de la cadena codificante de cada gen y numeradas respecto a su inicio de transcripción.

Cepas	Características importantes	Referencia
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
XL1-Blue	<i>supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15 Tn10(Tc<sup>r</sup>)</i> ]	Stratagene
S17(λpir)	Tp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> <i>recA thi pro hsdR<sup>-</sup> M<sup>+</sup>RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7 λ</i>	Biomedal
EB6193	RP4-2 <i>tet: Mu -1 kan::Tn7 leu-63::IS10 recA1 creC510 hsdR17 endA1 zbf-5 uidA(ΔMul):pir+ thi Sp<sup>R</sup>/Sm<sup>R</sup></i>	R.A. Bender
DH5αF'	φ80d <i>lacZΔM15 recA1 endA1 λ<sup>-</sup> gyrA96 thi-1 hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) phoA supE44 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF) U169</i>	Gibco BRL
EB4335	DH5α/pCB1083; pCB1026	R.A. Bender
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>		
KC2653	<i>hutC515 Δ[bla]-2 dadA1 str-6</i>	(Liu and Bender 2007)
KC5249	<i>hutC515 Δ[bla]-2 nac-2</i>	R. A. Bender
KC2738	<i>hutC515 ntrC2::Tn5-131</i>	(Bender and Friedrich 1990)
KC6678	KC2653, <i>hpxDE-lacZ, glnG::Tn5, Tc<sup>r</sup></i>	(de la Riva <i>et al.</i> 2008)
KB17K	KC2653 <i>hpxS::kan</i>	Este estudio
Φ( <i>hpxC-lacZ</i> ) <sup>*</sup>	<i>hpxC</i> (-189 a +170) fusionado a <i>lacZ</i>	Este estudio
Φ( <i>guaD-lacZ</i> ) <sup>*</sup>	<i>guaD</i> (-156 a +83) fusionado a <i>lacZ</i>	Este estudio
Φ( <i>hpxF-lacZ</i> ) <sup>*</sup>	<i>hpxF</i> (-201 a +140) fusionado a <i>lacZ</i>	Este estudio
Φ( <i>hpxU-lacZ</i> ) <sup>*</sup>	<i>hpxU</i> (-194 a +105) fusionado a <i>lacZ</i>	Este estudio

#### 3.2. VECTORES

En este trabajo se emplearon diversos tipos de vectores que se detallan en la TABLA 3.2. Los vectores plasmídicos se utilizaron en la clonación de diferentes

fragmentos de DNA, construcción de capas mutantes, estudio de fusiones de promotor y expresión y/o purificación de proteínas.

**Tabla 3.2. Vectores utilizados.** 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	Características	Referencia
pUC18 <i>Not</i> (2715 pb)	Plásmido auxiliar para clonación usando dianas <i>NotI</i> .	Ap <sup>r</sup> , $\alpha$ - <i>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 <sup>r</sup> , $\alpha$ - <i>lacZ</i> . Alto número de copias.	Promega
pKAS32 (4400 pb)	Mutagénesis dirigida.	Ap <sup>r</sup> , <i>oriR6K</i> , <i>mobRP4</i> , <i>rpsL</i> . Bajo número de copias. <i>recA1 creC510 hsdR17 endA1 zbf-5</i>	(Skorupski and Taylor 1996).
pRS415 (10752 pb)	Construcción fusiones transcripcionales.	Ap <sup>r</sup> , <i>lacZYA</i> . Alto número de copias.	(Simons <i>et al.</i> 1987)
pCB1583 (14,4 Kb)	Inserción de fusiones transcripcionales.	Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , <i>oriR6K</i> , <i>mobRP4</i> , <i>rpsL</i> , <i>rbsA' lacZ rbsK'</i> . Bajo número de copias.	(Liu and Bender 2007)
pMAL-c2x (6646 pb)	Expresión de proteínas de fusión a MBP.	Ap <sup>r</sup> , <i>malE</i> , $\alpha$ - <i>lacZ</i> , <i>lacI<sup>q</sup></i> . Alto número de copias.	New England Bio Labs
pKD4 (3267 pb)	Mutagénesis dirigida	Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , <i>oriR6K</i> ; <i>kan</i> se encuentra flanqueado por las dianas de la recombinasa FLP.	(Datsenko and Wanner 2000)
pCB1083	Reprime expresión de NAC- <i>his</i> hasta añadir IPTG	<i>lacI<sup>q</sup></i> clonado en pACYC184	(Rosario and Bender 2005)
pCB1026	Expresión de NAC- <i>his wild type</i>	Fragmento <i>EcoRI-BamHI</i> conteniendo NAC fusionado a 6 histidinas en su extremo C-terminal clonado en pQE70	(Rosario and Bender 2005)
pCAT19 (1053 bp)	Mutagénesis dirigida	Gen <i>Tn9CAT</i> del pB325 clonado en pUC18	(Fuqua 1992)
pUTminiTn5Tc (7,5kb)	Mutagénesis dirigida	Ap <sup>r</sup> , <i>oriR6K</i> , <i>mobRP4</i> , <i>tnp*</i> , mini-Tn5 Tc. Bajo número de copias.	Biomedal
P1	Transducción	Bacteriófago P1 tipo salvaje	(Miller 1992)

### 3.2.1. PLÁSMIDOS

Los vectores pUC18*Not*, pGEMT y pMAL-c2x tienen la característica común de permitir distinguir a simple vista las colonias transformadas con los vectores recombinantes de aquellas que contienen los vectores no recombinantes, gracias al fenómeno de la  $\alpha$ -complementación.

Estos vectores codifican, bajo el control de un promotor *lac*, el fragmento amino terminal de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, conocido como subunidad  $\alpha$ , capaz de complementar el producto génico de *lacZ* $\Delta$ M15 (subunidad  $\omega$ ). La región de clonación (*polylinker*) de estos plásmidos se localiza dentro de la zona codificante de la subunidad  $\alpha$ , de tal forma que cuando no se ha clonado ningún fragmento de DNA, se produce una subunidad  $\alpha$  íntegra capaz de complementar la subunidad  $\omega$ . En cepas *lacZ* $\Delta$ 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  $\beta$ -galactosidasa), se genera una proteína  $\beta$ -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  $\alpha$  (*lacZ*), de tal forma que no es posible la  $\alpha$ -complementación, y al no existir una proteína  $\beta$ -galactosidasa funcional, el X-Gal no es hidrolizado y las células mantienen su color blanco.

#### 3.2.1.1. Vectores de clonación

El vector pUC18*Not* deriva del pUC18 diferenciándose de éste en la presencia de dianas *NotI* flanqueando la región de clonación. Esta característica permite emplear pUC18*Not* como plásmido auxiliar en la clonación de fragmentos de DNA. Ya que la presencia de la diana *NotI* no es frecuente, 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 (Promega) se comercializa en forma linear 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 polimerasa).

#### 3.2.1.2. Plásmidos utilizados para la obtención de mutantes

Los vectores pUTmini-Tn5Tc (Herrero *et al.* 1990) y pKAS32 (Skorupski and Taylor 1996) derivan del plásmido pGP704 (Miller and Mekalanos 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 *ori*R6K que requiere la proteína  $\pi$ , 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  $\lambda$  *pir*). En segundo lugar, contienen el origen de transferencia *mob*RP4 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 pKAS32 contiene el gen *rpsL* que codifica la proteína ribosomal S12, lo que permite distinguir entre bacterias que contengan o no este plásmido. Las cepas que son Sm<sup>r</sup> 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<sup>s</sup> (Skorupski and Taylor 1996).

### 3.2.1.3. 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 4.4.1.2.). 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 Tc y pKAS32 (MATERIALES 3.2.1.2.), posee el origen de replicación *ori6K*, dependiente de la proteína  $\pi$ , y el origen de transferencia en los procesos de conjugación *mobRP4*.

### 3.2.1.4. 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 (di Guana *et al.* 1988). El vector pMAL-c2x contiene el gen *lacI<sup>q</sup>*, 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 asparaginas 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 otra que codifica la diana reconocida por el Factor Xa, proteasa que se utiliza para digerir la proteína de fusión.

Los vectores pCB1026 y pCB1083 han sido utilizados conjuntamente para sobreexpresar la proteína NAC en la cepa EB4335. El vector pCB1026 contiene la proteína NAC fusionada a una cola de histidinas (NAC-*his*), la cual permitirá su posterior purificación por afinidad a una columna de níquel. El vector pCB1083 mantiene la expresión de NAC-*his* reprimida hasta que se añade el inductor IPTG al medio de cultivo.

### 3.2.2. FAGOS

El bacteriófago P1 se ha utilizado en la transferencia de material genético de una cepa a otra mediante transducción generalizada (MÉTODOS 4.1.2).

### 3.3. OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos, cebadores o *primers* utilizados en este trabajo para amplificar fragmentos de DNA mediante PCR (MÉTODOS 4.3.4.), sintetizar cDNA (MÉTODOS 4.5.3.) o secuenciar DNA (MÉTODOS 4.3.7.), fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Estos, a no ser que se especifique lo contrario, 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 estudio, indicándose para todos ellos su nombre, secuencia nucleotídica y aplicación.

### 3.4. 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.

### 3.5. PROGRAMAS INFORMÁTICOS Y BASES DE DATOS

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizó como punto de referencia la secuencia del genoma de *K. pneumoniae* MGH78578 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.

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 y BLAST-2seq (Tatusova and Madden 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 procesar los resultados de reacciones de secuenciación se empleó el programa **Chromas Lite v2.01**, disponible en [http://www.technelysium.com.au/chromas\\_lite.html](http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html).

Para identificar posibles dianas de unión de reguladores de la transcripción se empleó **Virtual Footprint** (Münch *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  $\sigma^{54}$  de la RNA polimerasa se llevó a cabo mediante el programa **PromScan** (Studholme *et al.* 2000), accesible desde la página web <http://www.promscan.uklinux.net/home.html>.

# 4. MÉTODOS





## 4. MÉTODOS

### 4.1. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

#### 4.1.1. 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 quería llevar a cabo. Dependiendo 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 este comprendido 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. 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*, las cepas de *E.coli* S17-1  $\lambda$  *pir* y EB6193 se hicieron crecer a una temperatura de 30°C, mientras que el resto de cepas de *E.coli* a 37°C.

#### COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

**Medio de cultivo completo o medio rico:** Este tipo de medio contiene todos 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 (Bertani 2004), compuesto por:

<u>LB:</u>	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).

<u>W4:</u>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,5g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,5g/l
	MgSO <sub>4</sub>	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	0,03g
Peptona proteosa	3g	Violeta cristal	1mg
Mezcla de sales biliares no.3	1,5 g	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:

- 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 GGIn (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 GNIN (Bender *et al.* 1983). Ya que la glutamina puede degradarse fácilmente, liberando al medio moléculas de  $\text{NH}_4^+$ , las soluciones de este aminoácido han de ser extemporáneas y esterilizarse mediante filtración, los cultivos se han de realizar a 30°C (Bender *et al.* 1977).

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 GGIn (limitación de nitrógeno) o GGInN (exceso de nitrógeno), se utilizaron alantoina, alantoato o ureidoglicolato como únicas fuentes de nitrógeno o añadidas a los anteriores medios. En la TABLA 4.1 se muestran todos los medios de cultivo utilizados en estos estudios.

**TABLA 4.1. 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
GGIn	Glutamina 0,04%	Limitación de nitrógeno
GGInN	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2% Glutamina 0,2%	Exceso de nitrógeno
GAlI	Alantoina 0,05%	Alantoina como única fuente de nitrógeno

GGInAll	Glutamina 0,04% Alantoina 0,05%	Alantoina con nitrógeno limitante
GAlt	Alantoato 0,05%	Alantoato como única fuente de nitrógeno
GGInAlt	Glutamina 0,04% Alantoato 0,05%	Alantoato con nitrógeno limitante
GUg	Ureidoglicolato 0,05%	Ureidoglicolato como única fuente de nitrógeno
GGInUg	Glutamina 0,04% Ureidoglicolato 0,05%	Ureidoglicolato con nitrógeno limitante
GGInOl	Glutamina 0,04% Oxalurato 0,05%	Oxalurato con nitrógeno limitante
GGInOm	Glutamina 0,04% Oxamato 0,05%	Oxamato con nitrógeno limitante

#### Otros suplementos:

- 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 al medio de cultivo en 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 estreptomicina se aumento en 1mg/ml en los medios de selección de los mutantes de *K. pneumoniae* obtenidos utilizando el vector pKAS32.

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

#### 4.1.2. TRANSDUCCIÓN GENERALIZADA CON EL BACTERÍFAGO 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 otro ya descrito (Goldberg *et al.* 1974).

##### 4.1.2.1. Preparación de un lisado P1

Los lisados se obtuvieron por crecimiento de la cepa donadora junto al fago P1 salvaje en presencia de Ca<sup>2+</sup>. 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 CaCl<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup>) con 200 µl 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 CaCl<sub>2</sub> 5mM (LB-Ca<sup>2+</sup>). 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 10<sup>9</sup> a 10<sup>10</sup> pfu/ml.
6. Añadir 3ml de LB-Ca<sup>2+</sup> e incubar a temperatura ambiente durante 5min.
7. Extraer la capa de Top-agar con la ayuda de un asa y depositarla en un tubo de centrifuga. Añadir unas gotas de cloroformo, agitar vigorosamente e incubar a temperatura ambiente durante 20 min.
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>Soft-agar:</u>	Triptona	15,5g/l
	Extracto de levadura	8,75g/l
	NaCl	0,5g/l
	Agar	7,5g/l

**4.1.2.2. 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 Ca<sup>2+</sup>. 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 antibiótico 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 MgSO<sub>4</sub> 0,1M y CaCl<sub>2</sub> 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  $10^{-3}$ ). Incubar a 30°C sin agitación durante 20min.
6. Añadir 200µl de citrato sódico 1M y agitar vigorosamente.
7. Añadir 1ml de LB e incubar a 30°C durante 1h en constante agitación.
8. Centrifugar a 5.000rpm durante 10min a temperatura ambiente.
9. Resuspender el sedimento celular en 100µl de citrato sódico 0,5M y extender sobre placas de selección. Incubar a 30°C durante 12h.
10. Purificar los lisógenos obtenidos mediante crecimiento de colonias aisladas en el mismo tipo de placas.

#### 4.1.3. 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 depende de la estabilidad de las mismas y del método de transformación posterior.

##### 4.1.3.1. Métodos químicos

###### 4.1.3.1.1. 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 <sub>2</sub>	45mM
CaCl <sub>2</sub>	10mM
Esterilizar el TFB por filtración y guardar a 4°C	

Solución de DMSO/DTT

Acetato potásico pH7,5	10mM
DTT	1M
DMSO	90% v/v
Guardar alicuotado a -20°C	

#### 4.1.3.1.2. Mediante CaCl<sub>2</sub>

Este procedimiento se basa en el método descrito por Ausubel *et al.* 1991 en el que la membrana celular se permeabiliza mediante iones Ca<sup>2+</sup>. 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 CaCl<sub>2</sub> 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 CaCl<sub>2</sub>. 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 CaCl<sub>2</sub>. 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 CaCl<sub>2</sub>

Tris-HCl pH 7	10mM
CaCl <sub>2</sub>	60mM
Glicerol	15% v/v

**4.1.3.2. Métodos físicos: electroporación**

Este procedimiento se basa en un método ya descrito (Dower *et al.* 1988). Se 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 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.

**4.1.4 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES.**

Las células se transformaron por choque térmico o por electroporación, dependiendo del proceso usado en la elaboración de células competentes.

**4.1.4.1. Choque térmico**

Se aplica para 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 la temperatura adecuada según la cepa transformada.
4. Sembrar en placas de LB a las que se les ha añadido el antibiótico adecuado para seleccionar las células transformantes. Incubar 12-16h.

**4.1.4.2. 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. Incubar a la temperatura adecuada durante 12-16h.

<u>SOC</u>	
Glucosa	0,4% p/v
MgSO <sub>4</sub>	5mM
MgCl <sub>2</sub>	5mM
Triptona	20g/l
Exto. de levadura	5g/l
NaCl	0,6g/l
KCl	1,2g/l
Ajustar pH 7 con NaOH	

**4.1.5. 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  $\lambda$  *pir* en los procesos de conjugación que se llevaron a cabo durante la mutagénesis dirigida y construcción de fusiones transcripcionales de *K. pneumoniae*. En estos casos se transfirieron los plásmidos pUTmini-Tn5Tc ó pKAS32 y pCB1583, 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. Se utilizó la cepa *E. coli* S17-1  $\lambda$  *pir* que 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  $\pi$  dependientes.

#### PROCEDIMIENTO

1. Inocular una colonia de *E. coli* S17-1  $\lambda$  *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.
2. Mezclar en 1ml de MgSO<sub>4</sub> 10mM los siguientes volúmenes de ambas cepas:  
25 $\mu$ l Donadora y 25 $\mu$ l Receptora (Proporción 1 Donadora: 1 Receptora)  
50  $\mu$ l Donadora y 25 $\mu$ l Receptora (Proporción 2 Donadora: 1 Receptora)  
25  $\mu$ l Donadora y 50 $\mu$ l Receptora (Proporción 1 Donadora: 2 Receptora)
3. Centrifugar a 5.000rpm durante 10min a temperatura ambiente.
4. Resuspender el sedimento celular en 20 $\mu$ l de MgSO<sub>4</sub> 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 MgSO<sub>4</sub> 10mM.
6. Centrifugar a 5.000rpm durante 10min a temperatura ambiente.
7. Resuspender el sedimento celular en 1ml de MgSO<sub>4</sub> 10mM y extender 100 $\mu$ l de diferentes diluciones (Ej. 10<sup>0</sup> a 10<sup>-4</sup>) 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.

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.

#### 4.1.6. OBTENCIÓN DE MUTANTES

##### 4.1.6.1. Mutagénesis dirigida en *K. pneumoniae* por inserción de un casete de resistencia a antibiótico

Esta metodología se basa en las propiedades suicidas de los vectores pKAS32 (Skorupski and Taylor 1996), pUT-mini-Tn5-Tc y en la recombinación homóloga entre un gen salvaje y un casete (KAN, CAT) consistente en el gen interrumpido por el gen de resistencia a Km (*kan*) o Cm (*cat*).

Aunque pUT-mini-Tn5-Tc es un plásmido utilizado normalmente para obtener mutantes al azar por inserción de un transposón (Herrero *et al.* 1990), presenta algunas características en común a pKAS32 que le permiten ser utilizado también para mutagénesis dirigida (FIGURA 4.1.). Entre dichas características, en el esqueleto de ambos vectores se localiza el gen de resistencia a ampicilina (*bla*), además contienen un origen de replicación obtenido a partir del vector R6K (*oriR6K*) y un origen de transferencia derivado de RP4 (*mobRP4*; ver METODOS 4.1.5.)

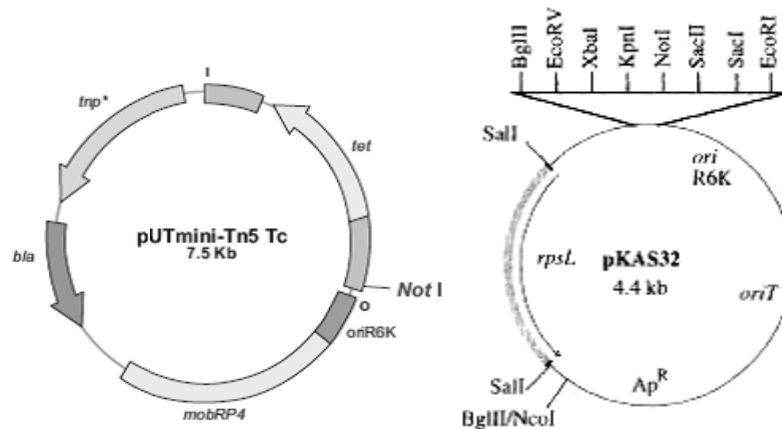


FIGURA 4.1. Vectores pUTmini Tn5 Tc y pKAS32.

El origen de replicación de estos dos vectores deriva del vector suicida R6K, cuya replicación depende de la presencia del factor  $\pi$  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  $\lambda$  *pir* en el momento de la conjugación. La recombinación homóloga entre el gen salvaje y el casete se produce tras la conjugación entre una cepa donadora y una cepa receptora. Ya que la cepa receptora no produce el factor  $\pi$  y por tanto no puede mantener el pUTmini-Tn5 Tc/ pKAS32 de manera estable, los transconjugantes son seleccionados por resistencia al antibiótico aportado en el casete.

En el momento en el que se identifican colonias con el fenotipo deseado, la localización del casete en el genoma se puede comprobar mediante PCR (MÉTODOS 4.3.4.) usando un oligonucleótido interno al casete KAN/CAT (Datsenko and Wanner,

2000) y un oligonucleótido correspondiente a la región del genoma adyacente a los fragmentos utilizados para construir el casete KAN/CAT.

Aunque pKAS32 y pUT-mini-Tn5-Tc presentan características importantes en común, lo cual permite que la base de la mutagénesis dirigida sea la misma, presentan también algunas particularidades que hacen que la metodología a seguir tenga algunas variantes.

#### 4.1.6.1.1. Utilizando pKAS32

Además de lo descrito anteriormente, el vector pKAS32 tiene en su estructura el gen *rpsL* que permite la selección de los mutantes (FIGURA 4.1). El gen *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 de *rpsL* (Lederberg 1951). Por esta razón, cepas resistentes a Sm se vuelven Sm<sup>s</sup> cuando contienen pKAS32. Este fenómeno permite seleccionar los transconjugantes que han incorporado el casete pero han eliminado pKAS32.

El gen *kan* de resistencia a Km se obtuvo mediante amplificación del mismo por PCR (MÉTODOS 4.3.4.) a partir del vector pKD4 (Datsenko and 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. Dado el gran tamaño de pKAS32 y el hecho de que es un vector de bajo número de copias, la construcción del casete puede realizarse con mayor facilidad si se emplea un plásmido auxiliar como el pGEMT (ver MATERIALES 3.2.).

Una vez construido el vector recombinante con el casete KAN, este se transfiere a una cepa Sm<sup>r</sup>, como KC2653, mediante 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.

#### PROCEDIMIENTO

1. Clonar el gen que se desee mutar en pGEMT.
2. Amplificar por PCR el gen *kan* a partir del vector pKD4, utilizando oligonucleótidos con dianas de restricción compatibles con el vector recombinante construido anteriormente. Estas dianas han de localizarse únicamente dentro del gen clonado, de tal manera que al interrumpir dicho gen queden, al menos, 500bp a ambos lados de *kan*.
3. Purificar el producto de PCR tal y como se describe en MÉTODOS 4.3.5.5.
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. Una vez construido el casete, clonarlo en pKAS32.
6. Transformar la cepa EB6193 con el producto de la ligación y sembrar la transformación en placas de LB suplementadas con Km 25µg/ml.
7. 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.
8. 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.
9. Purificar una colonia de *E. coli* S17-1 λ *pir* pKAS32 KAN en placas de LB suplementadas con Km 25µg/ml.
10. Realizar un proceso de conjugación entre *E. coli* S17-1λ *pir* pKAS32 KAN y KC2653. La mezcla de conjugación se siembra en placas de medio mínimo W4 con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2% p/v como fuente de nitrógeno, citrato de sodio 0,4% p/v como fuente de carbono y suplementadas con Km 50 µg/ml. Incubar durante 48h a 30°C.
11. Purificar las colonias transconjugantes en las mismas placas de selección. Incubar durante 48h a 30°C.
12. Sembrar colonias aisladas en LB suplementado con Km 50µg/ml. Incubar durante 12-16h a 30°C.
13. Sembrar colonias aisladas en LB carente de NaCl y suplementado con Sm 1mg/ml. Incubar durante 12-16h a 30°C.
14. De nuevo, sembrar colonias aisladas en LB carente de NaCl y suplementado con Sm 1mg/ml. Incubar durante 12-16h a 30°C
15. Sembrar colonias aisladas en LB suplementado con Km 50µg/ml. Incubar durante 12-16h a 30°C.
16. Purificar las colonias Km<sup>r</sup> en LB suplementado con Km 50µg/ml.
17. Comprobar la correcta recombinación del casete mediante fenotipo y PCR.

#### 4.1.6.1.2. Mediante pUT mini Tn5-Tc

Este vector, además de las características en común con pKSA32, contiene un gen de resistencia a Tc y una única diana *Not1* que permite la clonación de insertos *Not1/Not1*.

El gen *cat* de resistencia a Cm se obtuvo mediante digestión a partir del vector pCAT19 (Fuqua 1992). El casete se construyó utilizando el plásmido auxiliar pUC18*Not* el cual permite obtener un inserto flanqueado por dianas *Not1*, de esta manera el casete puede ser clonado posteriormente en pUTmini Tn5 Tc.

#### PROCEDIMIENTO

1. Clonar el gen que se desee mutar en pUC18*Not*.

2. Digerir el vector pCAT19 utilizando un o dos dianas del *polykinker*. Estas dianas han de localizarse solo una vez dentro del gen clonado, de tal manera que al interrumpir dicho gen queden, al menos, 500bp a ambos lados del gen *cat*.
3. Clonar el gen *cat* 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.
4. Una vez construido el casete, clonarlo en el vector pUTminiTn5Tc utilizando la diana *Not1*.
5. Transformar la cepa EB6193 con el producto de la ligación y sembrar la transformación en placas de LB suplementadas con Cm 20µg/ml.
6. Identificar mediante PCR un clon que haya insertado el casete CAT y obtener su DNA plasmídico. Comprobar por digestiones enzimáticas y secuenciación la correcta inserción y orientación del casete CAT.
7. Transformar la cepa *E. coli* S17-1  $\lambda$  *pir* con el plásmido circular pUTminiTn5Tc CAT. Sembrar en placas de LB suplementadas con Cm 20µg/ml y Tc 12,5µg/ml.
8. Purificar una colonia de *E. coli* S17-1  $\lambda$  *pir* pUTminiTn5Tc CAT en placas de LB suplementadas con Cm 20µg/ml y Tc 12,5µg/ml.
9. Realizar un proceso de conjugación entre *E. coli* S17-1 $\lambda$  *pir* pUTminiTn5Tc CAT y KC2653 rifampicina resistente (Rif<sup>r</sup>). La mezcla de conjugación se siembra en placas de medio mínimo W4 con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2% p/v como fuente de nitrógeno, citrato de sodio 0,4% p/v como fuente de carbono y suplementadas con Cm 20µg/ml. Incubar durante 48h a 30°C.
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 Cm 20µg/ml y Rif 25µg/ml. Incubar durante 12-16h a 30°C.
12. De nuevo sembrar colonias aisladas en LB carente de NaCl y suplementado con Cm 20µg/ml y Rif 25µg/ml. Incubar durante 12-16h a 30°C. Repetir este paso una vez más.
13. Comprobar la correcta recombinación del casete mediante fenotipo y PCR.

## 4.2. ANÁLISIS Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

### 4.2.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES

El medio intracelular de los cultivos bacterianos se obtuvo según el procedimiento descrito (Boronat and 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.

#### 4.2.2 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 de un método que permite determinar la concentración de proteínas en el rango de 20-200 $\mu$ g/ml (Lowry *et al.* 1951). 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 diferenciassen de la media en más de un 10%.

##### PROCEDIMIENTO

1. Añadir 100 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O 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  $\mu$ g de BSA.
3. Añadir a los tubos correspondientes a las muestras 25 $\mu$ l 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 100 $\mu$ l 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  $\mu$ g proteína/ $\mu$ l.

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

### 4.2.3 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A MBP

En este trabajo las proteínas se purificaron 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 (di Guana *et al.* 1988).

Para llevar a cabo la purificación se utilizó el kit “pMAL™ 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 3.2.1.4.), que contiene a 3' de *malE* y a 5' de la región de clonación una secuencia que codifica los aminoácidos que son 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  $\alpha$ -*lacZ*, lo que permite discriminar entre colonias blancas y azules de una cepa capaz de llevar a cabo la  $\alpha$ -complementación (MATERIALES 3.2.1.) en un medio suplementado con XGal.

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. La proteína de interés 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 a purificar en el vector pMAL-c2x.
2. Transformar la cepa XL1-Blue con el DNA plasmídico obtenido en el paso anterior, siguiendo el procedimiento descrito en MÉTODOS 4.1.4
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, 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 3.2.5).
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 4.2.5.).
15. Digerir la proteína de fusión con la proteasa adecuada, que dependerá del vector de expresión utilizado. Como en este trabajo se utilizó pMAL-c2x, la proteína de fusión se puede digerir con Factor Xa, 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 4.2.5.).

Tampón de columna

Tris-HCl pH 7,4	20mM
NaCl	200mM
EDTA	1mM

#### 4.2.4 PURIFICACIÓN DE NAC

La purificación de la proteína reguladora NAC fusionada a una cola de histidinas se realizó por cromatografía de afinidad a una columna de níquel (Rosario and Bender 2005).

## PROCEDIMIENTO

1. Realizar un cultivo a 30°C de la cepa EB4335 que contiene los plásmidos pCB1083 y pCB1026 hasta una DO de 0,6 a 600nm.
2. Añadir IPTG al cultivo anterior a una concentración de 1mM para inducir la expresión de la proteína. Incubar 4h.
3. Recoger el cultivo celular por centrifugación a 4500rpm, 15min a 4°C.
4. Resuspender en tampón de columna y obtener el extracto celular por sonicación.
5. Incubar el extracto celular con la resina de níquel en agitación durante 1h a 4°C.
6. Colocar la mezcla anterior en una columna y lavar con tampón de lavado.
7. Eluir la proteína de fusión con tampón de columna adicionado con 250mM de imidazol.
8. Dializar las fracciones recogidas durante 12-16h a 4°C para eliminar el imidazol.
9. Analizar la proteína purificada en un gel de acrilamida-SDS.

<u>Tampón de columna</u>		<u>Tampón de lavado</u>	
Na <sub>2</sub> (PO) <sub>4</sub> pH 7	100mM	Na <sub>2</sub> (PO) <sub>4</sub> pH 7	100mM
NaCl	250mM	NaCl	500mM
MgCl <sub>2</sub>	2,5mM	MgCl <sub>2</sub>	2,5mM
Glicerol	10%	Glicerol	10%
Imidazol	10mM	Imidazol	90mM
β-ME	1mM	β-ME	1mM

### **4.2.5 SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE-SDS).**

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (Laemmli 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. La electroforesis tiene lugar a una intensidad de corriente de 15mA.

La composición de las soluciones utilizadas se muestra a continuación:

<u>Gel apilador</u>	
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

<u>Gel separador</u>	
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
$\beta$ -ME	20%

<u>Tampón de electroforesis</u>	
Tris-HCl pH 8,3	25mM
SDS	0,1% p/v
Glicina	192mM

<u>Tampón de muestra (4x)</u>	
Tris-HCl pH 6,8	0,25M
SDS	8%
Glicerol	40%
Azul bromofenol	0,08%

Una vez finalizada la electroforesis, y para poder visualizar las bandas proteicas separadas, se procede a una tinción con azul brillante de Coomassie, colorante que permite detectar específicamente bandas proteicas correspondientes a un mínimo de 1 $\mu$ g. Por último, el gel es 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. Secar el gel al vacío.

<u>Solución de tinción</u>	
Azul brillante de coomassie	0,1%
Ácido acético glacial: metanol: agua destilada	1:5:5

<u>Solución de tinción</u>	
Ácido acético glacial: metanol: agua destilada	1:5:5

#### Solución de fijación

Ácido acético glacial: metanol: agua destilada 1:1:18

### 4.2.6 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

#### 4.2.6.1 Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa

La enzima  $\beta$ -galactosidasa cataliza la hidrólisis de  $\beta$ -galactósidos, como la lactosa, en monosacáridos. El método para determinar la actividad  $\beta$ -galactosidasa se basa en la hidrólisis del sustrato ONPG por acción de la  $\beta$ -galactosidasa en  $\beta$ -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  $\beta$ -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 4.2.2.).

#### 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 5000rpm durante 10min a 4°C. A partir de aquí, mantener las células en frío.
4. Resuspender el sedimento celular en 10ml de KCl 1% p/v.
5. Centrifugar a 5000rpm durante 10min a 4°C.
6. Resuspender el sedimento celular en 1ml de KCl 1% p/v

Ensayo:

7. Añadir 100 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O desionizada a los tubos de ensayo donde se llevará a cabo la reacción.
8. Añadir 10 $\mu$ l de la suspensión celular.
9. Añadir 900 $\mu$ l de Tampón  $\beta$ -Gal preparado en el momento, agitar vigorosamente, e incubar durante 20min a 30°C.
10. Iniciar la reacción mediante la adición de 200 $\mu$ l de ONPG 4mg/ml. Agitar vigorosamente. Incubar durante el tiempo que se estipule a 30°C.
11. Parar la reacción mediante la adición de 500 $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M. Agitar vigorosamente.

12. Centrifugar las muestras a 13500rpm durante 10min.
13. Leer la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 420nm.

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

<u>Tampón <math>\beta</math>-Gal:</u>		<u>Tampón Z 5x:</u>	
Tampón Z	1x	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O	80,5g/l
CTAB	0,2g/l	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - H <sub>2</sub> O	27,5g/l
Deoxicolato de sodio	0,1g/l	KCl	3,75g/l
$\beta$ -ME	4mM	MgSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O	1,23g/l
		Ajustar a pH 7	

#### 4.2.6.2 Determinación de la actividad guanina desaminasa

La enzima guanina desaminasa cataliza la conversión de guanina en xantina y amonio. La xantina generada a partir de guanina, por acción de la guanina desaminasa, es transformada por la xantina oxidasa en ácido úrico.

El método utilizado para determinar la actividad guanina desaminasa es un sistema de reacciones acopladas en el cual se determina la formación de ácido úrico mediante la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 293nm (Saint-Marc and Daignan-Fornier 2004).

##### PROCEDIMIENTO

1. Preparar 1ml de la mezcla de reacción que contenga la muestra a ensayar en un tampón de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20mM (pH 7,4), guanina 60 $\mu$ M.
2. Iniciar la reacción a 37°C mediante la adición de 0,01U de xantina oxidasa comercial (Sigma-Aldrich).
3. Medir en espectrofotométricamente la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 293nm.

Una unidad de actividad guanina desaminasa se refiere a la cantidad de proteína necesaria para producir 1 $\mu$ mol de ácido úrico por minuto.

#### 4.2.6.3 Determinación de la actividad alantoinasa

La actividad alantoinasa se determinó utilizando un método ya descrito (Cusa *et al.* 1999). El ensayo está basado en un método colorimétrico donde el alantoato formado es cuantificado de forma indirecta por la hidrólisis ácida de éste y posterior reacción del glioxilato formado con fenilhidrazina HCl y ferricianida potásica (Lee and Roush 1964).

##### PROCEDIMIENTO

1. Obtener el extracto celular de la cepa de la cual se desea analizar la actividad alantoinasa en una solución tampón 40mM fosfato pH 7 y  $\beta$ -ME 1mM.
2. Preparar una solución extemporánea de alantoina 50mM en trietanolaminaHCl 150mM pH 8,4.

3. Añadir a 250µl de la solución que contiene el sustrato, de 0,5 a 10µl de extracto celular y agua c.s.p. 1ml. Incubar 10 min a 37°C.
4. Añadir 300µl de HCl 0,15N e incubar esta mezcla a 100°C durante 4min.
5. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
6. Añadir 300µl de tampón fosfato 0,4M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7 y 300µl de fenilhidracina HCl al 0,33%.
7. Incubar 5min a temperatura ambiente.
8. Añadir 1,5ml de HCl concentrado y 300µl de ferricianida potásica al 1,5%.
9. Después de 15min leer espectrofotométricamente a 535nm.

Simultáneamente se realiza una curva patrón con alantoato tratado de la misma manera que las muestras analizadas. En estas condiciones, una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para producir un µmol de alantoato por minuto.

#### 4.2.6.4 Determinación de la actividad alantoato amidohidrolasa

La actividad alantoato amidohidrolasa en *K. pneumoniae*, ha sido determinada a través de un sistema de reacciones acopladas. El alantoato es hidrolizado por la alantoato amidohidrolasa en amonio y ureidoglicina, posteriormente la enzima glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH utiliza como sustrato el amonio producido y α-cetoglutarato; la actividad se mide espectrofotométricamente por la disminución de absorbancia a 340nm debido a la oxidación del NADPH a NADP<sup>+</sup> (Muratsubaki *et al.* 2006).

#### PROCEDIMIENTO

1. Preparar 1ml de la mezcla de reacción que contenga MnCl<sub>2</sub> 10mM, NADPH 20mM, α-cetoglutarato 50mM, 1kU/ml de glutamato deshidrogenasa comercial (Sigma cat. No. G2626-100MG) y alantoato 20mM, en un tampón de Tris HCl pH 8,5 200mM.
2. Iniciar la reacción a 37°C mediante la adición de la muestra que se desea ensayar.
3. Medir espectrofotométricamente la disminución de la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 340nm.

Una unidad de actividad alantoato amidohidrolasa se expresa como µmol de amonio producido por minuto.

### 4.3 PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA

#### 4.3.1 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.

### **4.3.2 OBTENCIÓN DE DNA PLASMÍDICO**

#### **4.3.2.1 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. El DNA obtenido (>8µg) 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<sup>-</sup> como EndA<sup>+</sup>, aunque se recomienda la utilización de las primeras. Así mismo, también es recomendable que el tamaño de plásmido no exceda de 20.000pb.

#### **4.3.2.2 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 (>50µg).

### **4.3.3 TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DEL DNA**

#### **4.3.3.1 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 4.3.5.5.) 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 4.3.5.1.

#### 4.3.3.2 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, desfosforilación, etc).
2. Determinar la concentración aproximada de vector e inserto.
3. Preparar la reacción de ligación según las siguientes proporciones e incubar la mezcla a la temperatura adecuada.

DNA vector	variable <sup>(1)</sup>
DNA inserto	variable <sup>(2)</sup>
T4 DNA ligasa	1U
Tampón de ligación	1x
<sup>(1)</sup> Normalmente 100ng	
<sup>(2)</sup> Habitualmente, vector:inserto	1:3

#### 4.3.3.3. Marcaje de fragmentos de DNA

Este método permite obtener fragmentos de DNA marcados no radiactivamente en su extremo 3' (Schmitz *et al.* 1991). Los fragmentos obtenidos por PCR son marcados con digoxigenina-ddUTP mediante la transferasa terminal (ambos de Roche Applied Science). Se siguió el protocolo de la casa comercial.



Los fragmentos marcados pueden ser detectados posteriormente, utilizando un anticuerpo altamente específico para la digoxigenina, *anti-DIG* (Roche Applied Science), el cual está provisto de una fosfatasa alcalina que permite su detección en presencia de un sustrato quimiluminiscente, *CDP-star* (Roche Applied Science).

*CDP-star*, un sustrato que pertenece al grupo de los dioxietano fenil fosfatos, puede ser desfosforilado por acción de la fosfatasa alcalina, formando un intermediario de cuya descomposición resulta la emisión de luz que puede ser detectada en una película de rayos-X.

#### 4.3.4. 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 (Mullis and Faloona 1987; Arnheim and Erlich 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

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

DNA molde	variable
Cebador A	0,025mM
Cebador B	0,025mM
dNTPs	0,2M
DNA polimerasa	2,5U
Tampón amplificación	1x
$Mg^{2+}$	1,5-4mM
H <sub>2</sub> O desionizada	c.s.p

2. Desnaturalizar el DNA molde a 94°C.
3. Aplicar un número variable de ciclos con los siguientes pasos:
  - a. Desnaturalización del DNA: 94°C, 45s.
  - b. Unión de los cebadores: 45s a la Tm óptima (específica para cada pareja).
  - c. Extensión: temperatura y tiempo, según polimerasa utilizada.
4. Aplicar un último ciclo de extensión durante 10min a 72°C.
5. Purificar el DNA obtenido por alguna de las técnicas descritas anteriormente.

Las reacciones se realizaron en el termociclador "Mini Cyclor™" (MJ Research).

La técnica de PCR se ha utilizado en este trabajo con diferentes finalidades:

- Obtención de fragmento de DNA que posteriormente fueron clonados en diferentes plásmidos.
- Obtención de sondas de DNA utilizados en experimentos de retardación de la movilidad electroforética.
- Selección de clones recombinantes que provienen de la ligación ente un fragmento de DNA y un vector de clonación

#### **4.3.5. RESOLUCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA**

##### **4.3.5.1. 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  $\lambda$  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 0,5µg/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 (TAE 50x):

Tris base	5M
Ácido acético glacial	1M

Tampón de carga (10x)

Glicerol	5%
Azul de bromofenol	5%

#### 4.3.5.2. 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 and Gillespie 1979), que modifican la estructura del agua. 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.

#### 4.3.5.3. 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.* 2001). 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.

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 se tiñe con bromuro de etidio para visualizar las bandas. Para ello, el gel se deposita en una bandeja con 100ml de agua destilada y bromuro de etidio (4µg/ml) y se mantiene en agitación durante 30min. El exceso de bromuro de etidio es eliminado cambiando el gel a otra bandeja con 100ml de agua destilada y manteniéndolo en agitación durante 30min.

<u>Gel de poliacrilamida</u>		<u>Tampón de carga (6x)</u>	
Acrilamida: bisacrilamida (29: 1)	5%	Azul bromofenol	1mg/ml
Tampón de electroforesis TBE	1x	Xilencianol	1mg/ml
Persulfato amónico	0,07%p/v	Glicerol	50% v/v
TEMED	0,07%p/v		
Desgasificar filtrando al vacío (poro 0,45µm)		<u>Tampón de electroforesis (TBE 5x)</u>	
		Tris-HCl pH 8	450mM
		Ácido bórico	450mM
		EDTA pH 8	10mM

#### 4.3.5.4. 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 y se deja en agitación a 37°C un mínimo de 48h para que se 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 4.3.5.5).

<u>Tampón TE</u>	
Tris-HCl pH 8	10mM
EDTA pH 8	1mM

#### 4.3.5.5. Purificación de fragmentos de DNA obtenidos por PCR

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 4.3.5.2.

#### 4.3.6. 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 4.3.4.) 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 4.3.3.1.) con el objeto de obtener en ambas moléculas extremos compatibles. El vector y el inserto así tratados son ligados (MÉTODOS 4.3.3.2.) y transformados en la cepa más adecuada según el caso (MÉTODOS 4.1.4.). Por último se selecciona un clon que contenga la molécula híbrida de interés y se obtiene el DNA plasmídico (MÉTODOS 4.3.2.). El DNA obtenido se puede analizar mediante secuenciación (MÉTODOS 4.3.7.).

#### 4.3.7. 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 secuenciaron 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 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 este método aprovecha la capacidad de la DNA polimerasa para utilizar los análogos 2'-3'-didesoxirribonucleótidos (ddNTP) a la vez que los sustratos naturales desoxirribonucleótidos (dNTP) (Sanger *et al.* 1977). 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.

Una vez realizada la PCR de secuenciación según protocolo de la casa comercial, las muestras han sido precipitadas y analizadas en los Servicios científico-técnicos de la Universidad de Barcelona.

#### 4.3.8. IDENTIFICACIÓN DE REGIONES CROMOSÓMICAS POR GENOME WALKING.

Para conocer la secuencia de una zona en el genoma, adyacente a otra previamente conocida, se utilizó el *Genome Walker™ Universal Kit* (Clontech). Este método de varias etapas, basado en PCR de larga distancia, permite conocer hasta 6kb de DNA genómico simplemente diseñando nuevos primers basados en la secuencia obtenidas en etapas anteriores.

El DNA genómico de interés es digerido con enzimas de restricción que dejan extremos romos, de tal manera que cada una de las librerías obtenidas sea ligada después con adaptadores compatibles a estos extremos (proporcionados en el kit).

Una vez que las librerías han sido construidas, se realizan dos PCRs por cada una. En la primera PCR, se utiliza un primer (AP1, provisto por el kit) que hibrida con los adaptadores y un primer (GSP1) que es específico del genoma e hibrida cerca del final de la secuencia que se conoce. En la segunda PCR se utilizan los primers AP2 y GSP2, siendo este último más interno que GSP1 en la secuencia conocida.

Cada uno de los fragmentos de DNA obtenidos, los cuales comienzan con una secuencia conocida en el extremo 5' de GSP2 y llegan hasta una secuencia desconocida adyacente, pueden ser clonados y posteriormente secuenciados.

El protocolo utilizado fue el provisto por la casa comercial.

#### **4.4. CARACTERIZACIÓN DE PROMOTORES**

##### **4.4.1. 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 reportero *lacZ*, que codifica la enzima  $\beta$ -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 and Bender 2007) para, a continuación, transferir únicamente una copia al genoma de *K. pneumoniae*.

##### **4.4.1.1. 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 3.2.1.3.).

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 en sus respectivos extremos 5'. De esta forma se facilitaba la posterior clonación de forma dirigida.

##### **4.4.1.2. 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 and Bender 2007. En primer lugar la fusión se subclona en el vector suicida pCB1583 (MATERIALES 3.2.1.3.) 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 3.2.1.3 este vector solamente puede mantenerse en una cepa que produzca el factor  $\pi$ , 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*<sup>+</sup> 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*<sup>-</sup>: Las cepas recombinantes no pueden metabolizar ribosa ya que el operón *rbs* es sustituido por la fusión transcripcional, de manera que sus colonias presentan color blanco en el medio McConkey Ribosa (MÉTODOS 4.1.1.).

$Sm^r$ : 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 (MATERIALES 3.2.1.2.). 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 estos antibióticos.

## 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* EB6193. 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. Transformar la cepa de *E. coli* EB6193 y sembrar en placas de LB que contengan  $Km$  y X-Gal.
3. Obtener células competentes de KC2653 y transformarlas con el plásmido pCB1583 recombinante mediante shock térmico. En este caso, el sedimento celular se resuspende en 100 $\mu$ 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<sup>r</sup> en placas de LB suplementado con Sm. Incubar durante 12-16h a 30°C.
8. Purificar colonias Sm<sup>r</sup> 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<sup>r</sup> son Km<sup>s</sup> y Ap<sup>s</sup>. La presencia de la fusión en la cepa puede comprobarse, además, mediante PCR a partir de colonia utilizando los oligonucleótidos 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 4.2.6.1.

#### 4.4.2. 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 multiproteico.

En este trabajo, los ensayos de retardación se realizaron con proteína purificada y fragmentos de DNA obtenidos por PCR que posteriormente fueron purificados en geles de acrilamida y marcados con digoxigenina (MÉTODOS 4.3.3.3).

##### 4.4.2.1. Reacción de unión DNA-proteína

La reacción de unión DNA-proteína(s) (*binding*) se llevó a cabo tal y como ha sido descrito (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	2mM
Glicerol	10%
Poly[d(I-C)]	0,1µg
DNA	20ng
Proteína	variable

Una vez preparadas las mezclas de reacción, éstas se incubaban a 37°C durante 20min. Después de la incubación, las muestras se guardaban en hielo hasta el momento de realizar la electroforesis.

**4.4.2.2. 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 4.3.5.3., 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 4.3.5.3.). 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.

**4.4.2.3. Separación electroforética de las sondas y los complejos de retardación**

El desarrollo de la electroforesis se llevó a cabo a 4°C, tanto el gel como el tampón atemperados con antelación.

Los geles fueron sometidos a electroforesis, antes de aplicar las muestras, durante media 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 terminada la electroforesis, las sondas y los complejos de retardación fueron transferidos a una membrana de nylon mediante corriente eléctrica. La detección quimiluminiscente de los complejos DNA-proteína marcados con digoxigenina se realizó usando Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia) según el principio descrito en METODOS 4.3.3.3 y siguiendo el protocolo de la casa comercial.

**4.5. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA**H<sub>2</sub>O-DEPC

Dietilpirocarbonato	1ml
H <sub>2</sub> O desionizada	1L
Agitar o/n	

El RNA es un ácido nucleico 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 H<sub>2</sub>O DEPC autoclavada dos veces.

#### 4.5.1. 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  $\beta$ -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 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<sub>2</sub>O.

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.

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 sílicagel y por el número de células que pueden ser tratadas con un volumen del tampón que contiene tiocianato de guanidina y  $\beta$ -ME. El número máximo de células es 109, 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.

##### 4.5.1.1. 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°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 5-10µg 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°C durante 10min.
5. Sumergir el gel en tampón MOPS 1x con formaldehído al 6% p/v y cargar las muestras y 10µl del marcador de RNA, preparado de igual modo.
6. Realizar la electroforesis a 5V/cm de gel hasta que el frente del tampón de carga llegue al final del gel.

##### Tampón de carga para RNA (2x)

Tampón MOPS	1x
Formamida desionizada	50%
Formaldehído	20%
Azul bromofenol	5%
Glicerol	5%
Bromuro de etidio	0,01µg/ml

##### Tampón MOPS (5x)

MOPS	200mM
Acetato sódico	50mM
EDTA	5mM
Ajustar a pH 7	

#### **4.5.2. 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

4.3.5.2. 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 complementariedad 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 4.3.5.1.
3. Purificar el fragmento de cDNA específico según el protocolo descrito en MÉTODOS 4.3.5.2.
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 4.3.2.
6. Analizar el fragmento clonado mediante PCR y secuenciación (MÉTODOS 4.3.7.) utilizando los oligonucleótidos complementarios al vector proporcionados por la casa comercial.



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS GÉNICOS IMPLICADOS EN LA UTILIZACIÓN DE PURINAS Y DERIVADOS EN LA CEPA KC2653 DE *K. pneumoniae*

El metabolismo de purinas ha sido estudiado por Pope *et al.* 2009, en *Klebsiella oxytoca* M5a1. En esta cepa se ha identificado un *cluster* de 23 genes responsable de la utilización de purinas como fuente de nitrógeno. La función de algunos genes de este *cluster* ha sido asignada por caracterización fenotípica de mutantes y por análisis de la similitud de secuencia. Sin embargo, no se ha comprobado su función, ni existe evidencia experimental sobre su regulación transcripcional. Un análisis por comparación de secuencias mediante el programa Blast-n, reveló que los genes identificados en *Klebsiella oxytoca* M5a1 también están presentes en *K. pneumoniae* MGH78578 pero distribuidos en tres *clusters* diferentes. Concretamente el *cluster* comprendido entre los genes KPN\_01661 a KPN\_01666 estaría implicado en el metabolismo de hipoxantina hasta alantoina, el *cluster* KPN\_01787 a KPN\_01791 contendría los genes implicados en la degradación de alantoina a alantoato, además del gen que codificaría la guanina desaminasa (KPN\_01791) y el *cluster* KPN\_01771 a KPN\_01761 estaría implicado en el catabolismo posterior del alantoato.

Trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación demostraron que la cepa KC2653 de *K. pneumoniae* puede degradar purinas hasta alantoina en condiciones aeróbicas a través de un sistema génico similar al que comprende los genes KPN\_01661 a KPN\_01666 de *K. pneumoniae* MGH78578 (de la Riva *et al.* 2008). En dicho estudio se confirma también la capacidad de esta bacteria de utilizar alantoina como fuente de nitrógeno, lo que demuestra que la vía de degradación de purinas contempla la posterior metabolización de alantoina.

Todos los productos génicos del *cluster* KPN\_01787 a KPN\_01791 y del *cluster* KPN\_01771 a KPN\_01761 presentaron similitud con genes de otras especies bacterianas como *Xantomonas campestris*, *Erwinia carotovora* y *Bacillus subtilis*, en base a lo cual se proponen funciones para todos ellos, a excepción del gen KPN\_01769 que pese a presentar homología con genes de las especies antes mencionadas, en ninguno de los casos ha sido sugerida función alguna para la proteína codificada. El tamaño y producto propuesto para cada gen después del análisis mediante Blast-n, se muestra en la TABLA 5.1. Se ha asignado un nombre a cada uno de los genes siguiendo la nomenclatura utilizada previamente por de la Riva *et al.* 2008 para el sistema génico involucrado en el metabolismo de hipoxantina a alantoina.

Dado que existe una gran variedad fenotípica y genotípica entre diferentes cepas de *K. pneumoniae*, una vez identificados los genes anteriores en la cepa MGH78578 (no. acceso NC\_009648), se diseñaron oligonucleótidos según la secuencia disponible del genoma. Los oligonucleótidos fueron utilizados para comprobar por PCR la presencia de los genes en la cepa KC2653, objeto de estudio en este trabajo, y determinar si existían diferencias en la secuencia de nucleótidos entre una cepa y otra que pudiera afectar la funcionalidad de las proteínas. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en el ANEXO 1.



Respecto al conjunto de genes *hpxSAB-hpxC-guaD* comprendidos en el locus KPN\_01787 a KPN\_01781, se amplificaron y secuenciaron todos ellos utilizando como molde DNA genómico de la cepa KC2653 (METODOS 4.3.1.). El análisis de dichas secuencias reveló que pese a existir ligeros cambios en la secuencia de nucleótidos respecto a la cepa MGH78578, parece que ninguna de ellas comportaría modificaciones importantes en la proteína codificada ya que todos son cambios conservativos de aminoácidos. Para comprobar la organización de los genes, una vez conocida la secuencia de cada uno, se diseñaron oligonucleótidos internos de tal forma que el producto de PCR tuviera el final de un gen y el principio del otro considerado adyacente a él. Con estos resultados, se determinó la organización génica del sistema *hpxSAB-hpxC-guaD* en dicha cepa (FIGURA 5.1.).

**TABLA 5.1. Asignación de función a genes de *K.pneumoniae* KC2653 en base al análisis computacional.** Se propone un producto para cada gen según el resultado del análisis de similitud de su secuencia nucleotídica. Para el análisis se utilizaron los programas Blast-n y Blast-p.

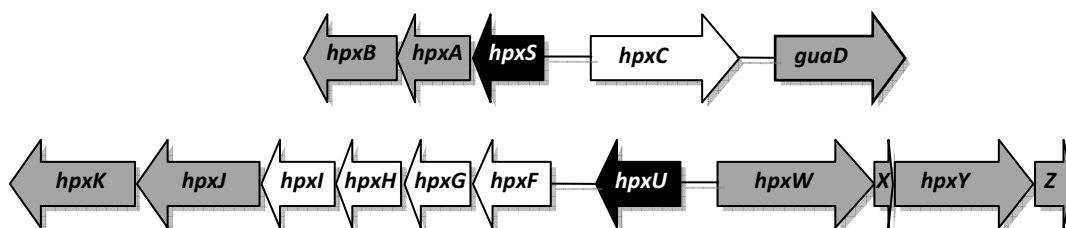
Gen	Nombre	Tamaño (bp)	Producto propuesto
KPN_01787	<i>hpxB</i>	932	Alantoinasa
KPN_01788	<i>hpxA</i>	743	Alantoina racemasa
KPN_01789	<i>hpxS</i>	715	Regulador transcripcional (GntR)
KPN_01790	<i>hpxC</i>	1496	Alantoina permeasa
KPN_01791	<i>guaD</i>	1312	Guanina desaminasa
KPN_01761	<i>hpxK</i>	1260	Alantoato amidohidrolasa
KPN_01762	<i>hpxJ</i>	1239	Ureidoglicina aminotransferasa
KPN_01763	<i>hpxI</i>	738	Transportador tipo ABC
KPN_01764	<i>hpxH</i>	654	Transportador de membrana
KPN_01765	<i>hpxG</i>	663	Transportador de membrana
KPN_01766	<i>hpxF</i>	783	Proteína periplasmática
KPN_01767	<i>hpxU</i>	849	Regulador transcripcional (RpiR)
KPN_01768	<i>hpxW</i>	1581	Oxamato amidohidrolasa
KPN_01769	<i>hpxX</i>	186	Función no asignada
KPN_01770	<i>hpxY</i>	1395	Oxalurato amidohidrolasa
KPN_01771	<i>hpxZ</i>	384	Degradación de oxalurato

En el caso del conjunto de genes *hpxFGHIJK-hpxU-hpxWXYZ*, solo se lograron amplificar los genes *hpxF*, *hpxK*, *hpxJ* y *hpxU* cuya secuencia no mostró diferencias significativas respecto a la de la cepa MGH78578. La presencia de los genes *hpxGHI* se comprobó secuenciando la región intergénica *hpxF-hpxJ*, después de conocer la secuencia correspondiente a la cepa KC2653.

La presencia de los genes *hpxWXYZ* se confirmó siguiendo otra estrategia dado que fue imposible amplificarlos por PCR utilizando como molde DNA genómico. Para ello se utilizó el kit *Genome Walking™ Universal Kit* de la casa comercial Clontech (METODOS 4.3.8.) que permite conocer la secuencia en una región del genoma adyacente a otra previamente conocida. Cabe mencionar que en este punto ya se conocía la secuencia de la región intergénica *hpxU-hpxW* y las primeras 95bp del gen *hpxW*.

Para comenzar el *Genome Walking* se digirió el DNA genómico de la cepa KC2653 con diferentes enzimas de restricción que permiten la obtención de extremos

romos y las cuales tenían una diana localizada al menos a 100bp del final de la secuencia conocida. Las enzimas utilizadas fueron *EcoRV*, *StuI* y *SmaI*. Cada una de las librerías obtenidas fue posteriormente ligada con los adaptadores proporcionados en el kit. En el siguiente paso, se realizó una primera PCR utilizando un oligonucleótido que hibrida con el adaptador (AP1) y otro específico del gen *hpxW* localizado a 95bp (GSP1) del final de la secuencia conocida hasta ese momento. De las tres librerías ensayadas, solo se amplificó un fragmento de DNA de aproximadamente 1500bp a partir de la librería *EcoRV*. El fragmento obtenido fue secuenciado y los resultados confirmaron la presencia de los genes *hpxW*, *hpxX* y de las primeras 90bp del gen *hpxY* en el genoma de KC2653 y sin diferencias respecto a la secuencia publicada de *K. pneumoniae* MGH78578. En este primer estudio, no fue posible avanzar más en el genoma ya que a 100 bp del inicio de *hpxY* se encuentra una diana para la enzima *EcoRV*. Es así que se diseñó un segundo primer (GSP1.2) específico del gen *hpxY*, pero esta vez a 20bp después de la diana *EcoRV* identificada previamente. Con GSP1.2, AP1 y la librería *EcoRV*, se realizó una nueva PCR de la cual se amplificó un fragmento de 2000bp. El análisis de la secuencia del fragmento de 2000bp, confirmó la presencia del resto de nucleótidos del gen *hpxY* que no se habían determinado en el primer estudio así como del gen *hpxZ* completo, más 100bp adyacentes a él.



**FIGURA 5.1. Sistemas genéticos implicados en la degradación de alantoína en la cepa KC2653.** La longitud de cada gen corresponde a la establecida en el GenBank para la cepa MGH78578. El primer *cluster* corresponde a los genes KPN\_01787 a KPN\_01791, el segundo a los genes KPN\_01771 a KPN\_01761. En gris se indican los genes estructurales, en negro los reguladores transcripcionales y en blanco los genes que codifican proteínas transportadoras.

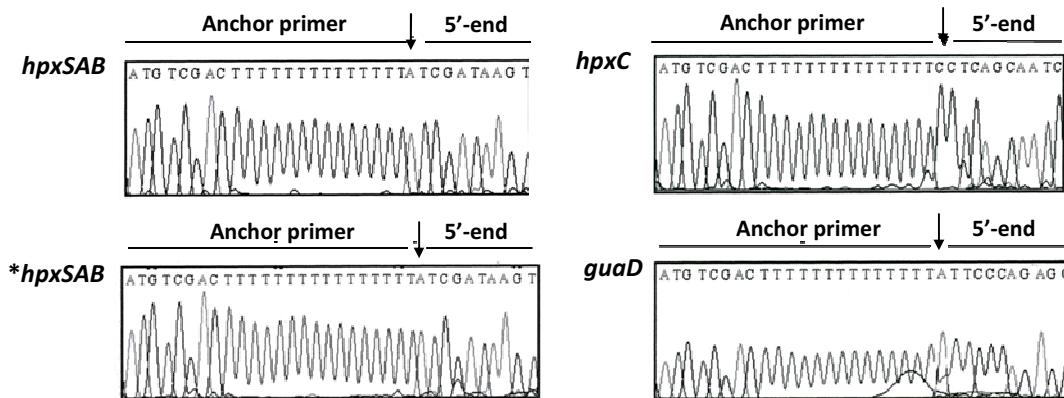
## 5.2. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA GÉNICO IMPLICADO EN LA DEGRADACIÓN DE ALANTOINA A ALANTOATO EN LA CEPA KC2653

### 5.2.1. ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE *hpxSAB-hpxC-guaD*

Según lo descrito en la TABLA 5.1, el *cluster* que comprende los genes KPN\_01787 a KPN\_01790 codifica una alantoinasa (*hpxB*), una alantoína racemasa (*hpxA*), una proteína reguladora de la familia GntR (*hpxS*), una alantoína permeasa (*hpxC*) y una guanina deaminasa (*guaD*). Sin embargo no hay evidencias experimentales que demuestren dicha función.

La organización génica de *hpxSAB-hpxC-guaD*, permite proponer la existencia de al menos dos unidades transcripcionales. La distancia de 110bp entre el codón de *stop* de *hpxC* y el inicio de *guaD* sugiere además la existencia de un probable promotor en posición 5' del gen *guaD*. De confirmarse la existencia de un promotor delante de *guaD*, existirían tres unidades transcripcionales en dicho *cluster*, una formada por *hpxSAB*, otra por *hpxC* y otra por *guaD*. Las unidades transcripcionales *hpxC* y *guaD* se

transcribirían independientemente en la misma dirección y de forma divergente respecto a la unidad transcripcional *hpxSAB* (FIGURA 5.1.). El inicio de transcripción de cada unidad transcripcional se determinó mediante la técnica RACE (METODOS 4.5.2.). El RNA total provenía de cultivos de la cepa KC2653 crecidos aeróbicamente en un medio en condiciones limitantes de nitrógeno (glucosa-glutamina,GGln), los resultados se presentan en la FIGURA 5.2. Para *hpxSAB*, *hpxC* y *guaD*, el inicio de transcripción se identificó a 26, 46 y 31 nucleótidos, respectivamente, del codón ATG de cada gen.



**FIGURA 5.2. Identificación de los inicios de transcripción de las unidades transcripcionales *hpxSAB*, *hpxC* y *guaD* mediante RACE (Rapid Amplificación of cDNA Ends)** Los fragmentos de cDNA se obtuvieron por PCR utilizando un cebador complementario al *PCR anchor primer* y un oligonucleótido complementario a la región promotora. Los fragmentos de cDNA fueron clonados en el vector pGEMT. Los clones obtenidos se analizaron mediante secuenciación. Se muestran los resultados de la secuenciación, indicando la localización del cebador *PCR anchor primer* y del inicio de transcripción identificado. \*El mismo inicio de transcripción fue identificado en células crecidas en un medio glucosa-alantoina.

El análisis *in silico* de la zona intergénica entre *hpxSAB* y *hpxC*, así como de la región localizada a 5' de *guaD*, utilizando los programas Footprint y Promscan ([www.promscan.uklinux.ntr/home.html](http://www.promscan.uklinux.ntr/home.html)), permitió identificar en los promotores posibles cajas de unión para las subunidades  $\sigma^{70}$  y  $\sigma^{54}$  de la RNA polimerasa (TABLA 5.2.).

**TABLA 5.2. Secuencias reconocidas por las subunidades  $\sigma^{70}$  y  $\sigma^{54}$  de la RNA polimerasa identificadas en los promotores  $P_{hpxSAB}$ ,  $P_{hpxC}$  y  $P_{guaD}$ .** En rojo se indican los nucleótidos idénticos a la secuencia consenso. En azul los elementos más característicos de la secuencia reconocida por  $\sigma^{54}$ . NI: no identificado.

	Caja $\sigma^{70}$			Caja $\sigma^{54}$	Localización
	-10	-35	Distancia entre secuencias		
<b>Consenso</b>	TATAAT	TTGACA	17bp +/- 1	TGGCACGGCTCTTGCT	-11 a -26
$P_{hpxSAB}$	TATACG	TATACA	16bp	NI	NI
$P_{hpxC}$	GATCCT	TATACA	20bp	TGGCCTGGATCCTGCA	-3 a -20
$P_{guaD}$	NI	NI	NI	TGGACCAATCTTGCT	-11 a -26

El análisis de la región promotora de *hpxSAB* ( $P_{hpxSAB}$ ), reveló la presencia de dos secuencias localizadas a -10 (TATACG) y -35 (TATACA), respecto de su inicio de transcripción (+1) identificado previamente (FIGURA 5.22.), muy similares a la secuencia consenso reconocida por la subunidad  $\sigma^{70}$  de la RNA polimerasa y separadas entre sí por 16bp (los nucleótidos subrayados concuerdan con los de la secuencia consenso). En cuanto al promotor de *hpxC* ( $P_{hpxC}$ ), se identificó una secuencia similar a la secuencia consenso establecida para la subunidad  $\sigma^{54}$ , sin embargo dicha secuencia obtenida en el análisis *in silico* (TGGCCTGGATCCTGCA) está localizada entre las posiciones -20 y -3 del inicio de transcripción de este gen, lo cual no concuerda con la óptima posición para este tipo de secuencias en un promotor  $\sigma^{54}$  (-11 a -26), sugiriendo que probablemente no sea funcional. En este mismo promotor se identificaron las cajas -10 (GATCCT) y -35 (TATACA), las cuales están separadas por 20bp. Aunque esta distancia entre ellas no concuerda con la distancia óptima (17±1 bp), han sido descritas cajas de unión para  $\sigma^{70}$  con una separación entre sí de 15 y 21bp (Huerta *et al.* 2006). En lo que respecta al promotor de *guaD* ( $P_{guaD}$ ), una secuencia compatible (TGGCACCAATCTTGCT) con la secuencia consenso de reconocimiento para la subunidad  $\sigma^{54}$  de la RNA polimerasa (YTGGCACGNNNNTTGCW donde: Y=pirimidina, W= A o T) se identificó entre las posiciones -11 y -26 respecto al inicio de transcripción del gen, esta secuencia identificada presenta los elementos característicos -24(GG) y -12(GC). Este análisis indica que sólo la transcripción del gen *guaD* depende de la subunidad  $\sigma^{54}$  de la RNA polimerasa. Ello sugiere una probable regulación a través del sistema NTR por lo que se buscaron secuencias consenso de unión de la proteína NtrC. Las cajas identificadas en dicho promotor, mediante los programas Promscan y Virtual Footprint, se muestran en la FIGURA 5.3.

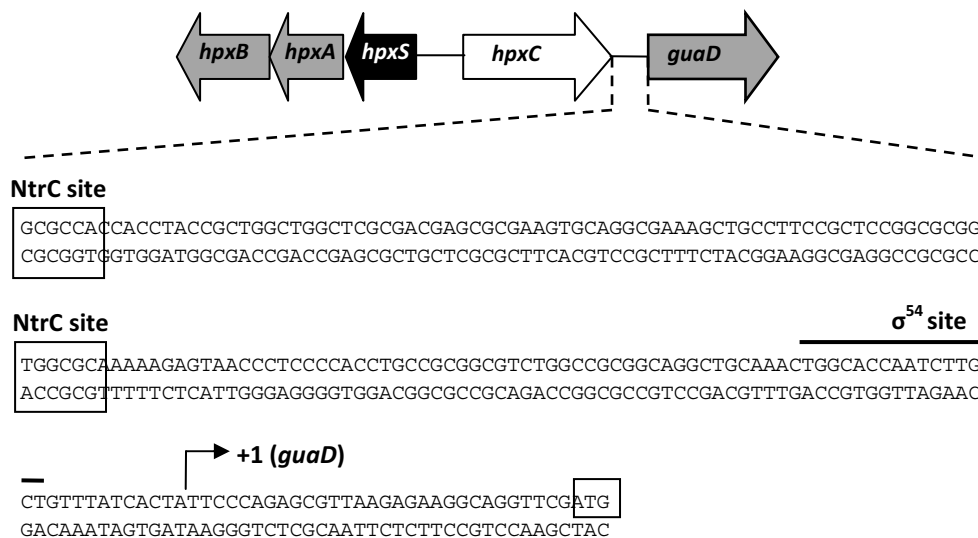


FIGURA 5.3. Posibles secuencias de unión de NtrC en la región promotora  $P_{guaD}$ .

Por tanto, la identificación experimental de inicios de transcripción apoya la organización de este *cluster* en tres unidades transcripcionales. Siendo los promotores  $P_{hpxSAB}$  y  $P_{hpxC}$  reconocidos por la subunidad  $\sigma^{70}$  de la RNA polimerasa, mientras que  $P_{guaD}$  estaría bajo el control de la subunidad  $\sigma^{54}$ .

### 5.2.2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS PRODUCTOS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES *hpxSAB-hpxC-guaD*

Una vez identificados los genes *hpxSAB-hpxC-guaD*, nos planteamos caracterizarlos funcionalmente. La secuencia de los genes y de sus productos génicos, se analizó utilizando los programas Blast-n y Blast-p.

#### 5.2.2.1 Asignación de función a GuaD.

El análisis de la secuencia de GuaD de *K. pneumoniae* MGH78578, mostró que esta proteína mantiene un 86% de similitud respecto a la guanina desaminasa de *K. oxytoca* y un 58% con la de *E. coli*.

Estas guanina desaminasas pertenecen a la subfamilia de proteínas aminohidrolasas y son responsables de la conversión de guanina a xantina y amonio. En su mayoría dependen de cationes divalentes para llevar a cabo esta desaminación oxidativa. El zinc es el ión predominante en muchas de las estructuras depositadas en la base de datos *Protein Data Bank*, aunque también puede estar presente el hierro. Existe una secuencia consenso entre los miembros de esta familia, implicada en la unión de estos metales (PGFVDAHVH), la cual ha sido también identificada en el análisis *in silico* que realizamos a GuaD de la cepa KC2653, entre las posiciones 73 y 81 de esta proteína.

Aunque la degradación de guanina a xantina ocurre al inicio de la ruta catabólica de las purinas, el gen *guaD* de *K. pneumoniae* ha sido estudiado en este trabajo por estar localizado en posición adyacente a los genes involucrados en la degradación de alantoína a alantoato.

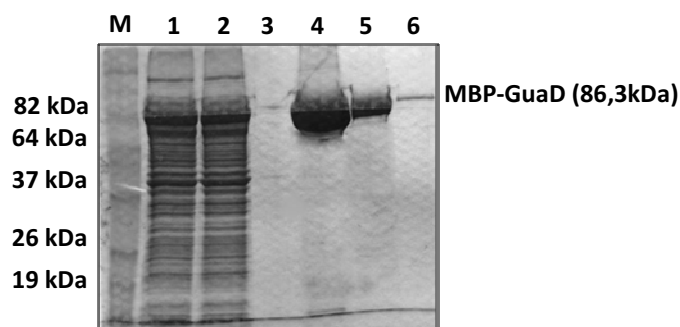
Para confirmar que la proteína GuaD presentaba actividad enzimática guanina desaminasa, nos propusimos clonar el gen *guaD* y posteriormente purificar su producto de expresión para caracterizarlo.

El gen *guaD* se amplificó por PCR a partir de DNA genómico de la cepa KC2653. Los oligonucleótidos utilizados para tal fin, contenían en sus extremos dianas para enzimas de restricción compatibles con las del vector a utilizar en la clonación posterior (ANEXO 1). El fragmento de 1312bp resultante, fue clonado en el vector pMal-c2x a fin de obtener GuaD fusionada a la proteína de unión a maltosa (MBP; METODOS 4.2.3.). La proteína recombinante MBP-GuaD fue posteriormente purificada por cromatografía de afinidad en una columna de amilosa (FIGURA 5.4.).

La proteína de fusión MBP-GuaD se sometió a una digestión con el Factor Xa a fin de separar ambas proteínas, sin embargo no fue posible su digestión. Probablemente el plegamiento de ambas proteínas puede enmascarar el lugar de corte para el factor Xa. Por este motivo para la caracterización de GuaD se utilizó la proteína de fusión.

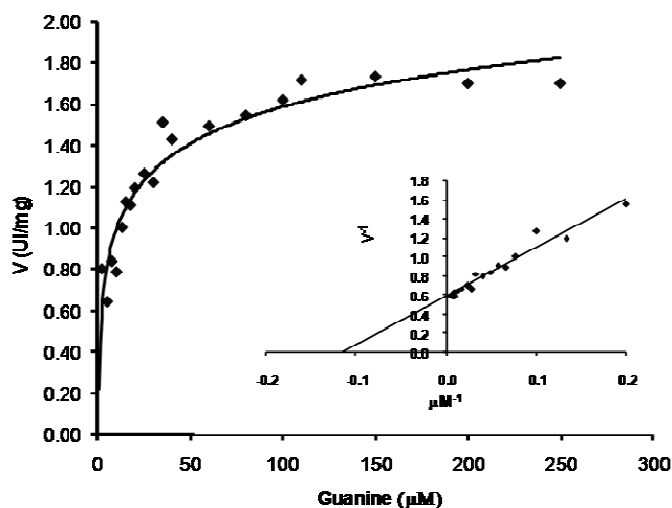
La determinación de la actividad guanina desaminasa a partir de la proteína recombinante MBP-GuaD, se realizó mediante un sistema de reacciones acopladas ya descrito en METODOS 4.2.6.2. La actividad de la enzima purificada se determinó

utilizando guanina o adenina como sustrato, los resultados obtenidos mostraron que esta enzima solamente puede utilizar guanina como sustrato.



**FIGURA 5.4.** SDS-PAGE de muestras correspondientes al proceso de purificación de MBP-GuaD. Se indican los tamaños correspondientes a las proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular (carril M). Carril 1: extracto celular. Carril 2: lavado, Carril 3-6: fracciones correspondientes a la elución de la proteína de fusión con amilosa 10mM.

Una vez confirmado que la proteína GuaD presenta actividad guanina desaminasa, se procedió a calcular los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$ . Las constantes cinéticas fueron determinadas experimentalmente bajo condiciones estándar de reacción (pH 7,4; 37°C), mediante una cinética con diferentes concentraciones de guanina como sustrato (FIGURA 5.5.). Los resultados obtenidos muestran que GuaD presenta una  $K_m = 8,9\mu M$  y  $V_{max} = 1,13 \mu mol \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . Estos parámetros han sido calculados por regresión lineal de la curva de saturación, siendo el coeficiente de correlación de 0,96.



**FIGURA 5.5.** Cinética de concentración de la actividad guanina desaminasa de la cepa KC2653. La actividad específica en U ( $\mu mol$  de ácido úrico producido/min/mg proteína) es representada frente a la concentración de sustrato. También se muestra la representación de los dobles recíprocos.

Dado que GuaD pertenece a la familia de las amidohidrolasas y el análisis *in silico* de su secuencia reveló la presencia de un dominio de unión a metales, se realizaron pruebas de actividad enzimática utilizando diferentes cofactores, entre ellos

Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y Fe<sup>2+</sup>, sin embargo la presencia de dichos iones no incrementó, ni modificó la actividad enzimática de GuaD.

La proteína GuaD de la cepa KC2653 mantiene una identidad del 95% con respecto a la equivalente en la cepa MGH78578. Puesto que el dominio PGFVDAHVH de GuaD de la cepa KC2653 es igual al identificado en otras amidohidrolasas, es posible que las trazas de zinc presentes en el medio pudieran ser suficientes para la actividad de la enzima. En este sentido, para poder confirmar la dependencia o no de metales se debería proceder previamente a descargar la enzima de los mismos o a mutar la caja de unión a metales.

### 5.2.2.2. Asignación de función a HpxB

El análisis *in silico* de la proteína codificada por el gen *hpxB* (KPN\_01787) de *K. pneumoniae* MGH78578, mostró un 89% de similitud con la proteína HpxB de *K. oxytoca* (Pope *et al.* 2009) y 58% con la alantoinasa independiente de metales codificada por *puuE* en *Pseudomonas fluorescens*, gen que también está presente en *S. pombe* (Ramazzina *et al.* 2008).

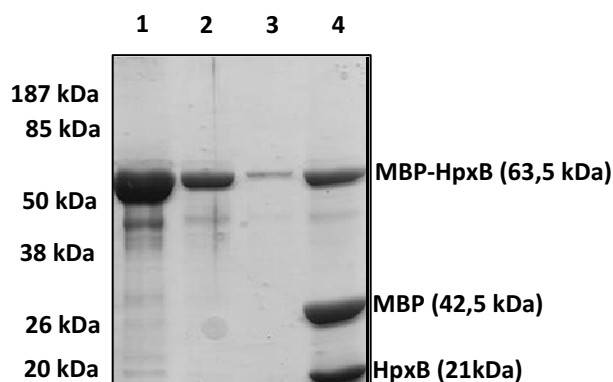
La proteína PuuE es análoga a la enzima DAL1 de *S. cerevisiae*. Dada su estructura y secuencia ha sido clasificada dentro de las polisacárido deacetilasas, tomando como base para ello su similitud con enzimas que eliminan grupos acetilo unidos a nitrógeno o carbono de los polisacáridos de la pared celular. Existen indicios de que muchos microorganismos, como *K. pneumoniae*, que carecen de la alantoinasa DAL1, pero son capaces de utilizar alantoina como fuente de nitrógeno, expresan una proteína homóloga a PuuE.

En *K. oxytoca*, se propone que el gen ortólogo a *hpxB* podría codificar una alantoinasa dado que mutantes por inserción de un transposón en dicho gen no fueron capaces de crecer en alantoina pero si en alantoato (Pope *et al.* 2009). La hidrólisis del anillo de hidantoína de la alantoina para formar alantoato, catalizada por la alantoinasa, es requerido para la utilización del nitrógeno presente en los compuestos derivados de purinas.

Para confirmar la función de la proteína codificada por el gen *hpxB* en *K. pneumoniae*, se amplificó dicho gen por PCR a partir de DNA genómico de la cepa KC2653. Los oligonucleótidos utilizados para tal fin, contenían en sus extremos dianas para enzimas de restricción compatibles con las del vector a utilizar en la clonación posterior (ANEXO 1). El fragmento de 932bp obtenido fue clonado en el vector pMal-c2x a fin de obtener HpxB fusionada a la proteína de unión a maltosa (MBP; METODOS 4.2.3.). La proteína MBP-HpxB fue purificada por cromatografía de afinidad en una columna de amilosa y posteriormente sometida a digestión con el Factor Xa a fin de separar ambas proteínas. Las diferentes etapas del proceso de purificación se muestran en la FIGURA 5.6.

La actividad de la enzima purificada se determinó utilizando alantoina como sustrato según el procedimiento detallado en METODOS 4.2.6.3. HpxB presentó una actividad específica de 390 U/mg. El ensayo se realizó también en presencia de diferentes metales bivalentes, Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>; ninguno de ellos modificó la

actividad enzimática. Este resultado es compatible con el hecho de que la proteína HpxB presenta similitud con PuuE, la nueva alantoinasa identificada en *Pseudomonas fluorescens* que tampoco es dependiente de metales (Ramazzina *et al.* 2008).



**FIGURA 5.6. SDS-PAGE de la purificación de HpxB.** Se indican los tamaños correspondientes a las bandas del marcador de peso molecular. Carril 1-3: diferentes eluciones de la proteína de fusión. Carril 4: productos de la digestión llevada a cabo por Factor Xa.

HpxB, al igual que otras enzimas de la ruta metabólica para la degradación de purinas en *K. pneumoniae*, como la xantina oxidasa (HpxDE) y la uricasa (HpxO), no presentan similitud con otras enzimas reportadas previamente (de la Riva *et al.* 2008). La falta de identidad con proteínas con actividades equivalentes en otras bacterias, parece ser una característica de enzimas implicadas en el metabolismo de purinas en *K. pneumoniae*. Este hecho, aunado a la distribución de los genes implicados en este metabolismo en tres agrupaciones distintas, sugiere que la vía de asimilación de purinas en esta bacteria pudo haber tenido un origen evolutivo diferente respecto al de otras enterobacterias.

### 5.2.2.3. Asignación de función a HpxA

La secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por *hpxA* fue analizada mediante el programa Blast-p. Los resultados muestran que HpxA se asemeja a hidantoina racemasas, presentando 93% de similitud con respecto a la propuesta en *K. oxytoca* y un 45% con la identificada en varias especies de *Pseudomonas*. La proteína HpxA de la cepa KC2653 es idéntica a la presente en la cepa MGH78578. Por tanto, la enzima HpxA debería catalizar la formación de (S)-alantoina a partir de su enantiómero (R). Simultáneamente a la realización de este trabajo, se ha publicado la resolución de la estructura cristalina de la alantoina racemasa de *K. pneumoniae*, confirmando de esta manera la función propuesta para HpxA (French *et al.* 2011). El sitio activo de esta proteína incluye un centro que mediante uniones polares interactúa con el extremo ureido de la alantoina y sirve para controlar la orientación del anillo de hidantoina.

El estudio realizado por Ramazzina *et al.* 2008 demostró que la alantoinasa PuuE presenta estereoespecificidad por el enantiómero (S) de la alantoina. Dada su similitud con la alantoinasa de la cepa KC2653, HpxB presentaría también especificidad por la (S)-alantoina. Lo anterior es congruente con el hecho de que el producto de la degradación del ácido úrico, por tres enzimas que actúan sucesivamente (uricasa, HIU



hidrolasa, OHCU descarboxilasa), parece ser únicamente el enantiómero (S)-alantoina (French and Ealick 2010). Sin embargo, se ha observado que puede existir una degradación no enzimática y no estereoespecífica de HIU, OHCU y alantoina, aunque muy lentamente (Kahn and Tipton 2000). De ser así, la (R)-alantoina producto de la degradación no enzimática del ácido úrico podría utilizarse también como sustrato de la alantoinasa tras la acción previa de una racemasa.

Dada la especificidad de las alantoinasas, la presencia de una racemasa es necesaria para que la alantoina que se incorpore al interior de la célula desde el medio extracelular, se transforme en (S)-alantoina y así pueda ser metabolizada eficientemente.

#### **5.2.2.4. Función del gen *hpxC*, asignada por análisis *in silico***

La secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *hpxC* fue analizada mediante el programa Blast-p. Los resultados muestran que HpxC se asemeja a hidantoina permeasas, presentando 91% de identidad con la propuesta en *K. oxytoca* y 90% con la alantoina permeasa de *Enterobacter cloacae*. Por lo que la proteína HpxC podría tener actividad alantoina permeasa. Cabe mencionar que la alantoina es un metabolito intermediario de la vía de degradación de purinas que tiene una estructura de 5'-ureido-hidantoina.

Entre los genes implicados en el metabolismo de hidantoina en diferentes especies, como *Pseudomonas sp.*, *Arthrobacter aurescens* y *Microbacterium liquefaciens*, se propone que algunos de ellos podrían codificar proteínas transportadoras. Aunque ninguno de estos genes ha sido caracterizado, son similares entre sí y presentan homología de secuencia con el transportador de alantoina de *S. cerevisiae* (Suzuki and Henderson 2006).

#### **5.2.2.5. Función del gen *hpxS*, asignada por análisis *in silico***

Hasta ahora se han presentado los resultados que han permitido la caracterización inicial de los genes estructurales del conjunto de genes *hpxSAB-hpxC-guaD*. Queda por confirmar la función propuesta para el gen *hpxS*, cuyo producto génico es una proteína reguladora de la familia GntR que podría estar implicada en la regulación de las unidades transcripcionales *guaD*, *hpxC* y *hpxSAB*.

La secuencia de aminoácidos del producto del gen *hpxS* de la cepa KC2653 es idéntica a la del producto ortólogo (KPN\_01789) de la cepa MGH78578 y comparte un 86% de similitud con el regulador transcripcional de este conjunto de genes propuesto en *K. oxytoca*.

El análisis *in silico* indicó que HpxS pertenece a la familia de reguladores GntR y dentro de esta familia a la subfamilia FadR. Los reguladores miembros de esta subfamilia comparten un dominio *hélix-turn-hélix* (HTH) altamente conservado en su extremo amino terminal, el cual reconoce una secuencia de DNA consenso (5'-(N)<sub>y</sub>GT(N)<sub>x</sub>AC(N)<sub>y</sub>-3'.) presente en los promotores de los genes que regulan. Por otra parte, el extremo C-terminal de estos reguladores es muy heterogéneo en secuencia y puede estar implicado en la unión de posibles moléculas efectoras que modularían su actividad.

La asignación de función mediante evidencias experimentales de la proteína HpxS se presenta más adelante en este trabajo (RESULTADOS 5.2.3.4.).

### 5.2.3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE *hpxSAB-hpxC-guaD*

Una vez asignadas las funciones a los genes de este sistema, procedimos al estudio de su regulación. Existen trabajos que describen como el metabolismo de determinados compuestos nitrogenados, utilizados como fuentes de nitrógeno, está sometido a una doble regulación, la llevada a cabo por el regulador del propio sistema y la ejercida por el sistema de regulación global por nitrógeno (García-González *et al.* 2005; de la Riva *et al.* 2008). Por ello se procedió a estudiar la regulación del cluster *hpxSAB-hpxC-guaD* por disponibilidad de nitrógeno y por el regulador específico.

#### 5.2.3.1. Efecto de la disponibilidad de nitrógeno

La implicación del sistema NTR en la regulación del cluster *hpxSAB-hpxC-guaD*, fue evidenciada mediante el estudio de las fusiones transcripcionales de los promotores  $P_{hpxSAB}$ ,  $P_{hpxC}$  y  $P_{guaD}$  al gen reportero *lacZ*, las cuales fueron transferidas como monocopia al genoma de la cepa KC2353 mediante recombinación homóloga en el operón de la ribosa, según el procedimiento establecido en METODOS 4.4.1. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar por PCR los tres promotores se detallan en el ANEXO 1.

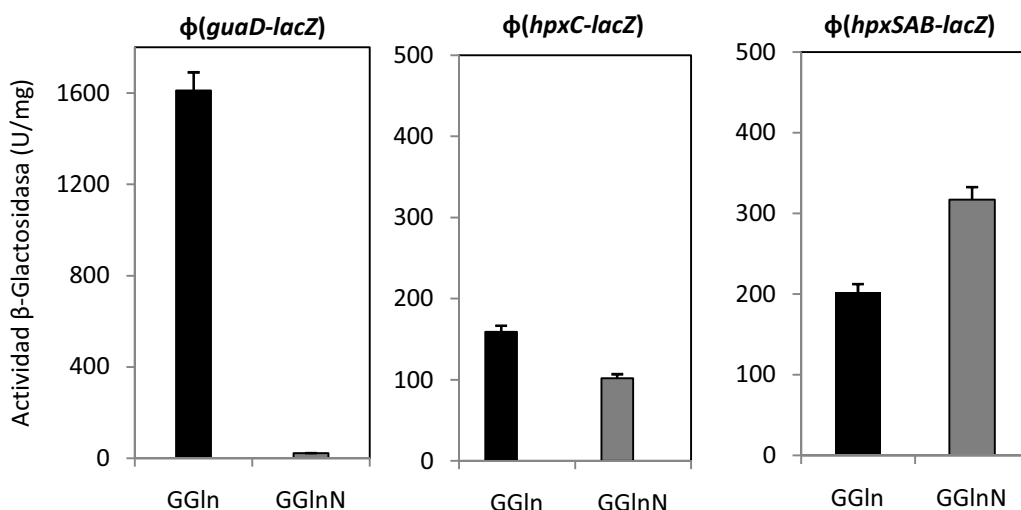
El fragmento utilizado para la obtención de las fusiones transcripcionales de los promotes de los genes *hpxS* y *hpxC* tenía un tamaño de 360 nucleótidos y abarcaba desde la posición +92 de HpxS hasta la posición +200 correspondiente a HpxC (ver FIGURA 5.21). El fragmento utilizado para el estudio de la región promotora del gen *guaD* era de 240 pb y abarcaba desde la posición +83 hasta la posición -156 respecto de su inicio de transcripción.

En una primera aproximación, la actividad  $\beta$ -galactosidasa se determinó a partir de la cepa KC2653 que contiene las fusiones transcripcionales  $\phi(hpxSAB-lacZ)$ ,  $\phi(hpxC-lacZ)$  y  $\phi(guaD-lacZ)$ , crecida en medios con un exceso (GGlnN) o limitación (GGln) de nitrógeno.

La actividad  $\beta$ -galactosidasa en el caso de la fusión  $\phi(guaD-lacZ)$  en bajo amonio (GGln) es aproximadamente 100 veces superior que la obtenida en alto amonio (GGlnN). En el caso de la fusión  $\phi(hpxC-lacZ)$ , los niveles de actividad bajo condiciones limitantes de nitrógeno son aproximadamente 1,5 veces superiores a los registrados en exceso de amonio. Por otra parte, el análisis de la fusión  $\phi(hpxSAB-lacZ)$ , mostró un patrón diferente de expresión ya que parece estar ligeramente reprimido en condiciones de nitrógeno limitante (FIGURA 5.7.).

Los resultados indican que el gen *guaD* está regulado por limitación de nitrógeno, lo cual es compatible con el análisis *in silico* que identificó en su región promotora una secuencia de unión para al subunidad  $\sigma^{54}$  de la RNA polimerasa. Esta regulación puede estar mediada por la proteína NtrC.

La expresión de las unidades transcripcionales *hpxC* y *hpxSAB* no parece estar regulada por estas condiciones de nitrógeno.



**FIGURA 5.7.** Análisis de la expresión de *hpxSAB*, *hpxC* y *guaD* en condiciones de exceso o limitación de nitrógeno. Las tres fusiones transcripcionales se encuentran como monocopia en el fondo genómico de la cepa KC2653. Los medios de cultivo GGln y GGlnN corresponden a limitación y exceso de nitrógeno respectivamente.

### 5.2.3.2. Efecto de la presencia de purinas o derivados en la expresión de las fusiones transcripcionales *hpxSAB*, *hpxC* y *guaD*

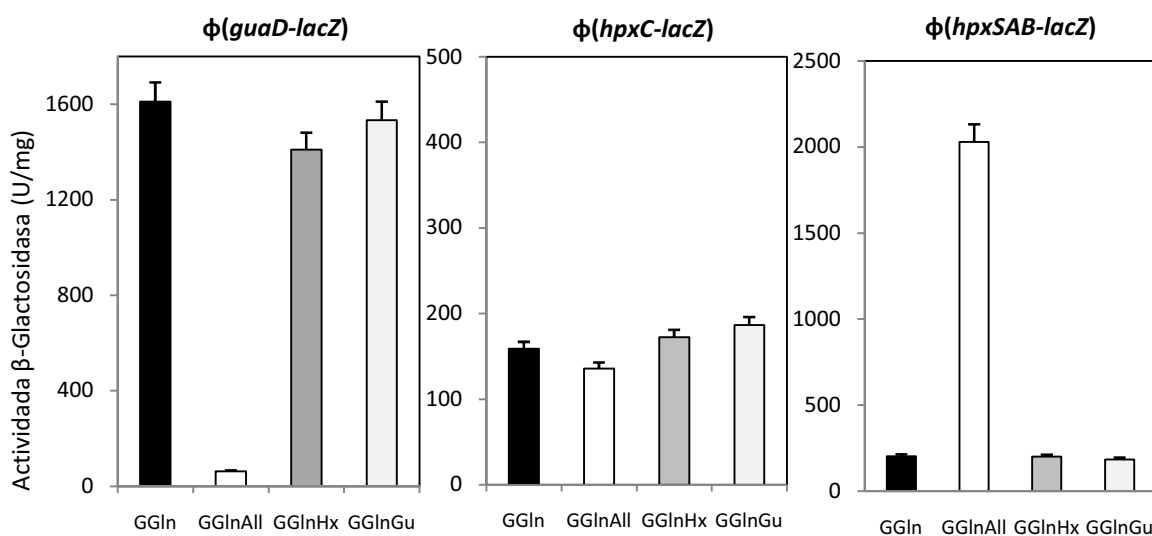
Dado que los operones *hpxSAB* y *hpxC* están implicados en la degradación de alantoina hasta alantoato y el gen *guaD* en la transformación de guanina a xantina, en una primera aproximación nos propusimos analizar si alantoina ó guanina ó sus derivados podrían ser efectores implicados en la regulación de la expresión de esas unidades transcripcionales. Es así que analizamos el efecto de la disponibilidad de alantoina, hipoxantina o guanosina sobre la expresión de las tres unidades transcripcionales de este sistema génico.

Las fusiones transcripcionales fueron analizadas en el fondo genómico de la cepa KC2653. La actividad  $\beta$ -galactosidasa fue determinada a partir de células provenientes de cultivos de esta cepa conteniendo las fusiones  $\phi(hpxSAB-lacZ)$ ,  $\phi(hpxC-lacZ)$  y  $\phi(guaD-lacZ)$ , crecidos en medios con limitación de nitrógeno más alantoina, hipoxantina o guanosina. Los resultados se presentan en la FIGURA 5.8.

La expresión de  $\phi(guaD-lacZ)$  en condiciones de nitrógeno limitante más hipoxantina o guanosina, no resultó en un incremento de la actividad  $\beta$ -galactosidasa respecto al nivel obtenido en cultivos en condiciones limitantes de nitrógeno (GGln). Estos resultados indican que la expresión de *guaD* está regulada principalmente por la disponibilidad de nitrógeno en el medio. Bajo estas condiciones, la desaminación de la guanina proveería amonio para el crecimiento. Cuando la alantoina fue utilizada como fuente de nitrógeno o añadida a cultivos en condiciones limitantes de nitrógeno, se observó una represión de  $\phi(guaD-lacZ)$  a niveles cercanos a los observados en cultivos crecidos en condiciones de exceso de nitrógeno (GGlnN; FIGURA 5.7.). Esto puede ser debido a que la alantoina es mejor fuente de nitrógeno que la glutamina a la concentración utilizada o al efecto aditivo de ambas fuentes de nitrógeno. Resultados similares han sido reportados en *Bacillus subtilis*, aunque en dicho organismo la adición de alantoina a cultivos en medios limitantes de nitrógeno induce la mayoría de

los genes de la ruta metabólica para la degradación de purinas, la expresión de aquellos que codifican las subunidades de la xantina deshidrogenasa son reprimidos (Schultz *et al.* 2001). Esta represión podría ser importante para reducir la utilización de purinas como fuente nitrógeno cuando la alantoina está presente en el medio.

Respecto al análisis de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión transcripcional  $\phi(hpxC-lacZ)$  en presencia de diferentes intermediarios de la vía como fuente de nitrógeno, los resultados muestran que ninguno de ellos (alantoina, hipoxantina o guanosina) modificó significativamente los niveles de dicha actividad. Lo cual confirma que la expresión del gen *hpxC* es constitutiva. En este caso la proteína HpxC estaría siempre presente para poder introducir la alantoina desde el medio de cultivo al interior celular.



**FIGURA 5.8. Análisis de la expresión de *hpxSAB*, *hpxC* y *guaD* en diferentes fuentes de nitrógeno.** Las tres fusiones transcripcionales se encuentran como monocopia en el fondo genómico de la cepa KC2653. Los medios de cultivo GGln, GGlnAll, GGlnHx y GGlnGu corresponden a limitación de nitrógeno y limitación de nitrógeno más alantoina, hipoxantina y guanosina, respectivamente.

En el caso de la fusión  $\phi(hpxSAB-lacZ)$ , la máxima inducción se alcanzó en condiciones de bajo amonio más alantoina, o con alantoina como única fuente de nitrógeno (FIGURA 5.8.). Estos resultados sugieren un control adicional de  $\phi(hpxSAB-lacZ)$  por alantoina o algún metabolito derivado. Sin embargo, guanosina o hipoxantina cuyo catabolismo produce alantoina, o alantoato, el siguiente intermediario metabólico en el catabolismo de alantoina, no indujeron la expresión de  $\phi(hpxSAB-lacZ)$ . Con alantoato los resultados de la actividad  $\beta$ -galactosidasa fueron similares a los obtenidos en presencia de hipoxantina o guanosina. Estos resultados sugieren que el nivel basal de expresión en guanosina o hipoxantina, puede ser suficiente para tener una actividad alantoinasa (producto del gen *hpxB*) que permita metabolizar la alantoina endógena generada a partir de la oxidación del ácido úrico o de las purinas. Sin embargo, en esa situación los niveles intracelulares de alantoina o algún derivado metabólico podrían no ser suficientes para producir una inducción del operón *hpxSAB*. Nuestra hipótesis es que cuando la alantoina, en el medio de cultivo es utilizada como fuente de nitrógeno, se alcanza una mayor concentración intracelular que cuando se genera como intermediario en el metabolismo de purinas. En este caso, la alantoina

por si misma o algún derivado metabólico aun no identificado, podría actuar como la molécula inductora de la expresión del operón *hpxSAB*.

En base a los resultados obtenidos para  $\phi(hpxSAB-lacZ)$ , lo siguiente que nos planteamos fue examinar si esta regulación específica por alantoina se veía modificada por la disponibilidad de nitrógeno. Para este fin, se añadió alantoina a cultivos en condiciones de exceso de nitrógeno (GGInAll). En esta situación de exceso de nitrógeno, la alantoina no indujo la expresión de *hpxSAB* (valores de  $\beta$ -galactosidasa alrededor de 300U/mg).

Tomando en consideración todos los resultados obtenidos hasta el momento, parece ser que son necesarias dos señales para la activación transcripcional de  $\phi(hpxSAB-lacZ)$ , que son: 1) condiciones de nitrógeno limitante y 2) la presencia de alantoina (o algún metabolito derivado de la misma).

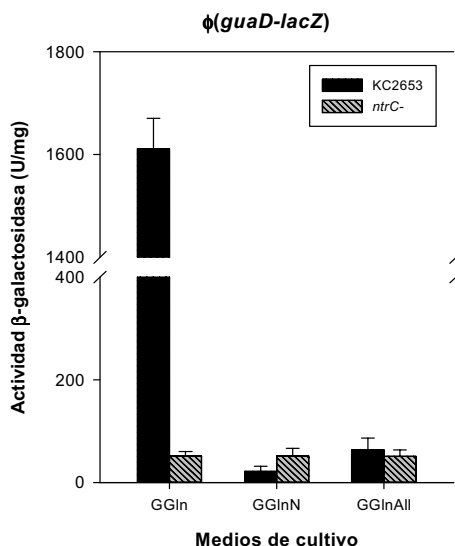
### 5.2.3.3. Análisis de la expresión de *hpxSAB-hpxC-guaD* en mutantes *nac* o *ntrC*

Para examinar si la regulación de las unidades transcripcionales *hpxSAB*, *hpxC* y *guaD* esta mediada por alguno de los componentes del sistema NTR, las mutaciones *nac-2* y *ntrC::Tn5-131* fueron introducidas por transducción generalizada con el fago P1 desde las cepas KC5249 y KC2738, respectivamente, al fondo genético de cepa KC2653 conteniendo como monocopia en el genoma cada una de las fusiones transcripcionales de los genes objeto de estudio (ver METODOS 4.1.2.).

En base a los resultados presentados en el apartado anterior donde parece ser que la transcripción del gen *guaD* sólo está regulada por la disponibilidad de nitrógeno, se analizó la expresión de la fusión  $\phi(guaD-lacZ)$  en el mutante *ntrC*. Aunque la expresión del gen *hpxC* parece ser independiente de la disponibilidad de nitrógeno, la fusión  $\phi(hpxC-lacZ)$  se analizó en el fondo genómico de ambos mutantes (*ntrC* y *nac*) para confirmarlo.

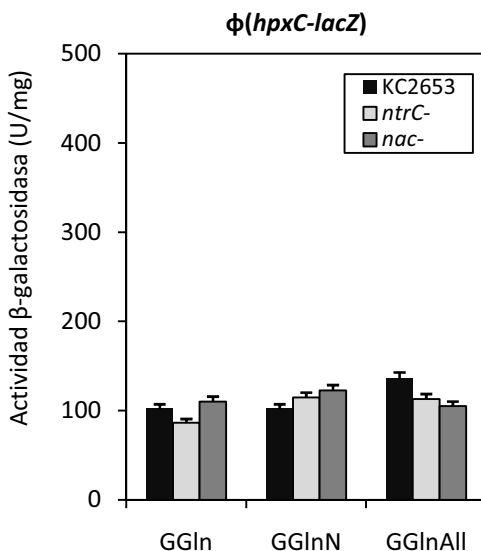
En el caso de *hpxSAB*, los resultados previos sugirieron que su expresión no estaba directamente controlada por NtrC, ya que se trata de un promotor reconocido por la subunidad  $\sigma^{70}$  de la RNA polimerasa. Sin embargo, esta descrito que NtrC regula indirectamente muchos promotores dependientes de  $\sigma^{70}$  mediante la proteína NAC, por lo que no se descarta que la expresión del operón *hpxSAB* pudiera estar sujeta a este tipo de regulación. Por ello la fusión  $\phi(hpxSAB-lacZ)$  se estudió en el fondo genómico de un mutante *nac*. En todos los casos se ensayaron diferentes condiciones de nitrógeno y presencia de alantoina (GGIn, GGInN, GGInAll).

Los resultados de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión  $\phi(guaD-lacZ)$ , su expresión bajo condiciones limitantes de nitrógeno se redujo considerablemente en el mutante *ntrC* (FIGURA 5.9.). En este mutante, los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa fueron similares a aquellos obtenidos en condiciones de exceso de nitrógeno. Estos resultados son congruentes con la presencia de las cajas de unión para NtrC identificadas previamente en la región promotora de *guaD* y confirman la participación de dicha proteína en su regulación.



**FIGURA 5.9. Análisis de la expresión de *guaD* en diferentes fondos genómicos.** La cepas KC2653 y la mutante KC2653 *ntrC* contienen la fusión  $\phi(guaD-lacZ)$  integrada en el genoma. GGln, GGlnN y GGlnAll corresponden a medios de cultivo con limitación de nitrógeno, exceso de nitrógeno y limitación de nitrógeno más alantoina respectivamente.

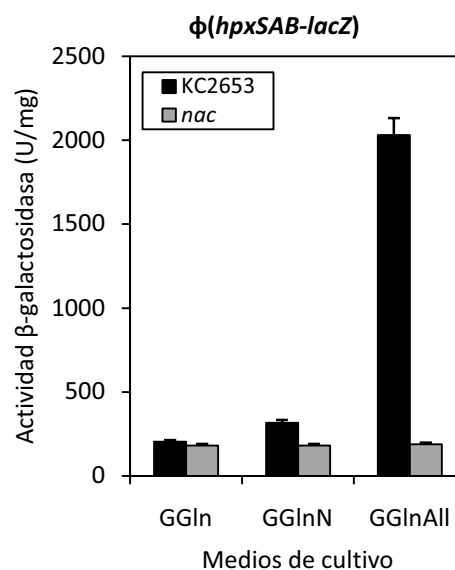
En el caso de la fusión  $\phi(hpxC-lacZ)$ , su expresión no se modificó en el fondo genómico del mutante *ntrC* ó *nac* (FIGURA 5.10.). Esto concuerda con la falta de regulación por la disponibilidad de nitrógeno observada en los primeros experimentos y refuerza la idea de que la transcripción de este gen es constitutiva.



**FIGURA 5.10. Análisis de la expresión de *hpxC* en diferentes fondos genómicos.** La cepas KC2653 y las mutantes KC2653 *ntrC* y KC2653 *nac*, contienen la fusión  $\phi(hpxC-lacZ)$  integrada en el genoma. GGln, GGlnN y GGlnAll corresponden a medios de cultivo con limitación de nitrógeno, exceso de nitrógeno y limitación de nitrógeno más alantoina.

Respecto a la fusión  $\phi(hpxSAB-lacZ)$ , tal como se muestra en la FIGURA 5.11., no se registraron diferencias significativas entre el mutante *nac* y la cepa parental en condiciones de exceso o limitación de nitrógeno. La inducción de la expresión de

*hpxSAB* mediada por alantoina en el fondo genómico KC2653 quedó anulada en el mutante *nac*. Dado que la transcripción de *hpxSAB* es dependiente de la subunidad  $\sigma^{70}$  de la RNA polimerasa, estos resultados sugieren que NtrC regula la expresión de esta unidad transcripcional de manera indirecta mediante NAC. En este sentido, paralelamente a nuestros experimentos se publicaron los resultados de un estudio realizado en *K. pneumoniae* por inmunoprecipitación de la cromatina en presencia de NAC, en los cuales se sugería que la región promotora del operón *hpxSAB* podía ser una diana de unión para la proteína NAC (Frisch and Bender 2010). Es posible que para inducir la expresión de *hpxSAB*, sea necesaria la presencia de NAC, pero que ésta por sí misma no sea suficiente.



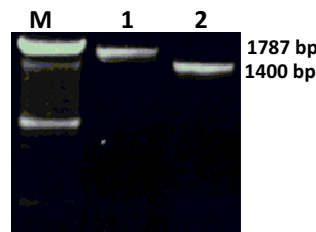
**FIGURA 5.11. Análisis de la expresión de *hpxSAB* en diferentes fondos genómicos.** La cepas KC2653 y la mutante KC2353 *nac* contienen la fusión  $\phi(hpxSAB-lacZ)$  integrada en el genoma. GGIIn, GGIInN y GGIInAll corresponden a medios de cultivo con limitación de nitrógeno, exceso de nitrógeno y limitación de nitrógeno más alantoina respectivamente.

#### 5.2.3.4. Función de HpxS en la regulación del sistema génico *hpxSAB-hpxC-guaD*

Para evaluar el papel de HpxS como regulador transcripcional de este conjunto de genes, se construyó un mutante *knockout* en el cual el gen *hpxS* fue interrumpido por un casete que confiere resistencia a kanamicina, obteniéndose al final de este proceso la cepa KB17K (METODOS 4.1.6.1.).

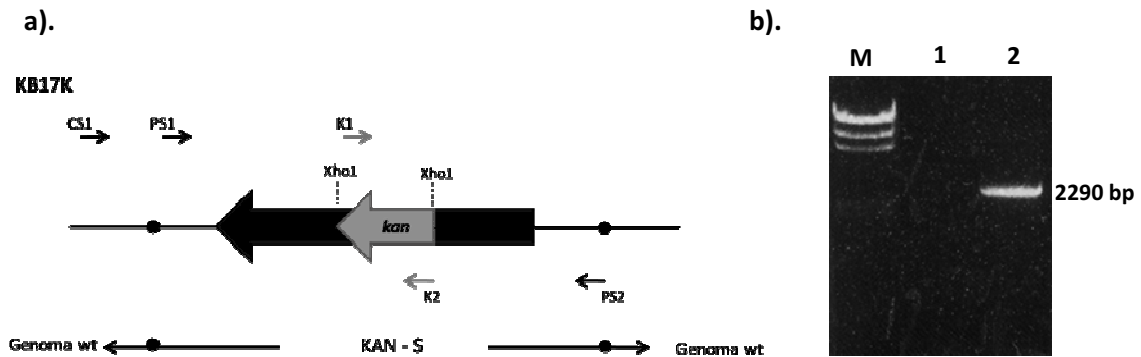
En primer lugar, se amplificó un fragmento de 1787bp que contiene el gen *hpxS* con oligonucleótidos que contenían en su extremo 5' la diana *EcoRI* (FIGURA 5.12.). Este fragmento fue clonado en el vector pGEM-T. Por otra parte se amplificó por PCR el gen de resistencia a kanamicina a partir del vector pKD4. A continuación se construyó el casete KAN-S, para ello, se llevó a cabo el clonaje del gen *kan* a 430bp del codón de inicio de la traducción de *hpxS*, utilizando la diana del enzima de restricción *XhoI* localizada en dicha posición. El casete KAN-S fue subclonado en el vector suicida pKAS32 como un fragmento *EcoRI*. De todos los clones obtenidos se seleccionó el clon pKSK en el que el gen *kan* se había insertado en el mismo sentido que *hpxS* (FIGURA 5.13.a.).

Seguidamente, la cepa *E. coli* S17-1  $\lambda$  *pir* fue transformada con pKSK para utilizarla como donadora en un proceso de conjugación con la cepa receptora KC2653. Al final del proceso, detallado en METODOS 4.1.6.1.1., se seleccionó el transconjugante KB17K, el cual mostró un fenotipo  $Km^r Sm^r Ap^s$  que es compatible con la introducción de la mutación por recombinación homóloga en el genoma de la cepa.



**FIGURA 5.12. Análisis de los fragmentos obtenidos por PCR para la construcción del mutante *hpxS::kan*.** M: marcador 100bp DNA ladder. Carril 1: fragmento amplificado de 1787bp correspondiente al gen *hpxS*. Carril 2: fragmento amplificado que corresponde al gen *kan* (1400bp). El tamaño de los fragmentos se indica a la derecha de la imagen.

La recombinación del gen *hpxS* con el casete KAN-S se comprobó mediante PCR a partir de colonia en la cepa KB17K. En este caso, uno de los cebadores corresponde al gen *kan* del casete KAN-S, mientras que el otro es externo a dicho casete. De esta manera, solamente fue posible amplificar por PCR cuando se ha producido la recombinación homóloga entre *hpxS* y el casete KAN-S (FIGURA 5.13.b.).



**FIGURA 5.13. Mutación *hpxS::kan* en la cepa KB17K.** a). Esquema del casete KAN-S. Se representa el sentido del gen *kan*, así como de *hpxS*. La diana Xho1 se utilizó para insertar *kan* en *hpxS*. K1 y K2 representan los primers utilizados para amplificar el gen *kan*, PS1 y PS2 a los primers utilizados para amplificar el fragmento que contiene *hpxS*. CS1 y K2 fueron la pareja de primers utilizados para comprobar la inserción del casete KAN-S. b). Comprobación por PCR de la correcta recombinación entre el gen *hpxS* y el casete KAN-S. M: marcador  $\lambda$ -hindIII. El tamaño del fragmento amplificado se indica a la derecha de la imagen. Carril 1: control negativo con los oligonucleótidos CS2 y K2. Carril 2: fragmento amplificado con los oligonucleótidos CS1 y K2.

Aunque la recombinación homóloga se realizó exitosamente, el análisis fenotípico del mutante KB17K reveló que la deficiencia de la proteína HpxS no anuló la capacidad de la cepa KC2653 de utilizar alantoina como fuente de nitrógeno. Este resultado sugería que HpxS podría actuar como represor transcripcional.

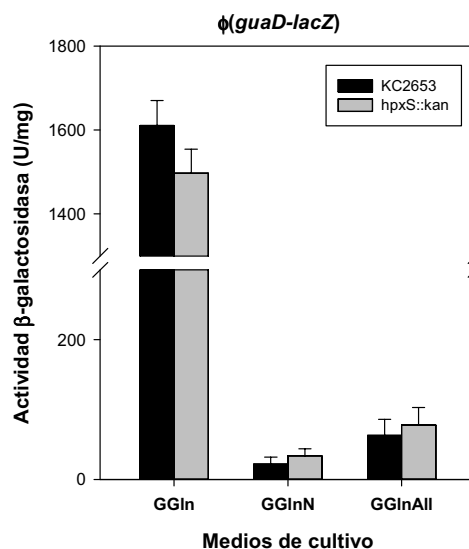


#### 5.2.3.4.1. Análisis de la expresión de *hpxSAB-hpxC-guaD* en el mutante *hpxS::kan*

Para evaluar el efecto de HpxS como regulador transcripcional de *hpxSAB-hpxC-guaD*, se analizaron las fusiones de los promotores de las tres unidades transcripcionales al gen reportero *lacZ* en el fondo genómico de la cepa mutante en el gen *hpxS* (cepa KB17K), en diferentes condiciones de nitrógeno.

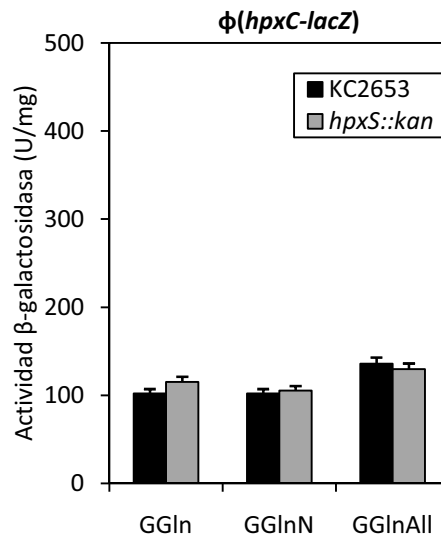
Las fusiones transcripcionales  $\phi(guaD-lacZ)$ ,  $\phi(hpxC-lacZ)$  y  $\phi(hpxSAB-lacZ)$ , fueron introducidas como monocopia en el fondo genómico del mutante *hpxS::kan* por conjugación entre la cepa receptora KB17K y la donadora *E. coli* S17  $\lambda$ -*pir* que contenía dichas fusiones en el vector pCB1583, el cual permite la recombinación homóloga en el operón de la ribosa (METODOS 4.4.1.2.).

Los resultados obtenidos con las fusiones  $\phi(guaD-lacZ)$  y  $\phi(hpxC-lacZ)$ , presentados en las FIGURAS 5.14 y 5.15 respectivamente, no mostraron cambios significativos en su patrón de expresión en el fondo genómico del mutante *hpxS::kan* respecto a los de la cepa parental KC2653. Esto indica que la proteína HpxS no participa en el control transcripcional de los genes *hpxC* y *guaD*.

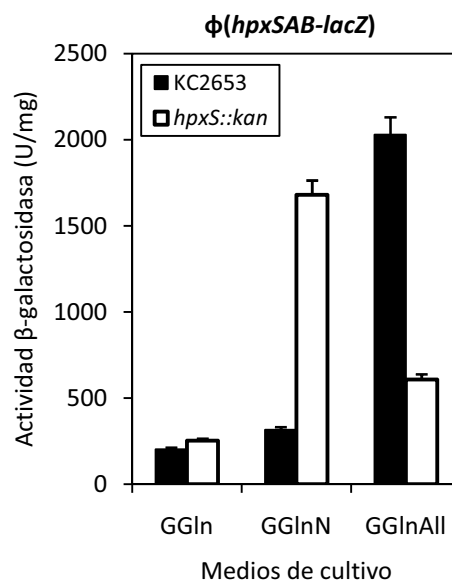


**FIGURA 5.14. Análisis de la expresión de *guaD* en diferentes fondos genómicos.** La cepas KC2653 y la mutante *hpxS::kan* (KB17K) contienen la fusión  $\phi(guaD-lacZ)$  integrada en el genoma. Los medios de cultivo GGIIn, GGIInN y GGIInAll corresponden a limitación de nitrógeno, exceso de nitrógeno y limitación de nitrógeno mas alantoina.

Respecto a la fusión  $\phi(hpxSAB-lacZ)$ , los resultados presentados en la FIGURA 5.16., muestran que la inducción por alantoina se reduce aproximadamente 3 veces en este mutante, sugiriendo que la función de HpxS en presencia de alantoina es la activación transcripcional del operón *hpxSAB*. En condiciones de alto amonio (GGIInN), los valores de la actividad  $\beta$ -galactosidasa fueron cuatro veces mayores en la cepa mutante que los registrados en la cepa parental, lo cual sugiere que HpxS podría actuar como represor en ausencia de alantoina. En condiciones de nitrógeno limitante (GGIIn), no se observó ningún cambio significativo entre la cepa parental y la mutante.



**FIGURA 5.15. Análisis de la expresión de *hpxC* en el mutante HpxS.** La cepas KC2653 y el mutante *hpxS::kan* (KB17K) contienen la fusión  $\phi(hpxC-lacZ)$  integrada en el genoma. Los medios de cultivo GIn, GInN y GInAll corresponden a limitación de nitrógeno, exceso de nitrógeno y limitación de nitrógeno mas alantoina.



**FIGURA 5.16. Análisis de la expresión de *hpxSAB* en diferentes fondos genómicos.** La cepas KC2653 y el mutante *hpxS::kan* (KB17K) contienen la fusión  $\phi(hpxSAB-lacZ)$  integrada en el genoma. Los medios de cultivo GIn, GInN y GInAll corresponden a limitación de nitrógeno, exceso de nitrógeno y limitación de nitrógeno mas alantoina.

El similar nivel de expresión en GIn tanto en la cepa parental como en el mutante KB17K (FIGURA 5.16) podría sugerir que en ausencia de HpxS, NAC podría actuar como represor de la transcripción de *hpxSAB* en condiciones de nitrógeno limitante. El nivel intermedio de actividad  $\beta$ -galactosidasa observado en el mutante *hpxS* en condiciones limitantes de nitrógeno más alantoina (GInAll), podría ser atribuido a un efecto ocurrido paralelamente por los niveles intracelulares de NAC en esta condición de crecimiento. Cabe recordar que la alantoina es una buena fuente de

nitrógeno para *K. pneumoniae*, incluso mejor que la propia glutamina a la concentración utilizada.

Este estudio llevado a cabo mediante fusiones transcripcionales reveló que de los genes *hpxSAB-hpxC-guaD*, solo el operón *hpxSAB* está regulado por HpxS. Esta proteína podría tener un papel dual, actuando como represor en ausencia de alantoina y como activador cuando la molécula inductora está presente en el medio. De cualquier forma, la completa activación de la expresión de *hpxSAB* por alantoina parece requerir la participación de NAC.

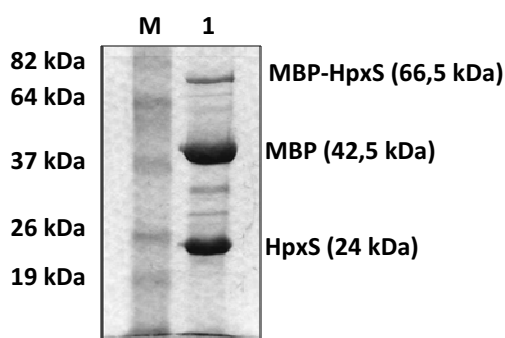
#### 5.2.4. INTERACCIÓN DE HpxS Y NAC CON LOS PROMOTORES DE *hpxSAB-hpxC-guaD*

Hasta ahora, los resultados indican que HpxS y NAC únicamente regulan la expresión de la unidad transcripcional *hpxSAB* y que además la presencia de alantoina o algún metabolito derivado desempeña un papel importante en la expresión de dicho operón. Por ello, nos planteamos llevar a cabo estudios de retardación de la movilidad electroforética en gel (EMSA) utilizando como sondas fragmentos correspondientes a las regiones promotoras de las unidades transcripcionales *hpxSAB*, *hpxC*, *guaD* y las proteínas purificadas HpxS y NAC, con la finalidad de analizar la formación de determinados complejos DNA-proteína implicados en la regulación.

##### 5.2.4.1. Análisis de la unión de HpxS a las regiones promotoras de *hpxSAB-hpxC-guaD*

Para llevar a cabo estos estudios, en primer lugar se expresó y purificó la proteína HpxS fusionada a la proteína de unión a maltosa (MBP; METODOS 4.2.3.). Los oligonucleótidos utilizados para amplificar por PCR el fragmento que fue clonado en el vector pMALc2x, se detallan en el ANEXO 1.

La proteína de fusión MBP-HpxS, fue posteriormente tratada con Factor Xa. Tal como se muestra en la FIGURA 5.17 aunque la digestión no fue total esta es superior al 95%. La preparación obtenida tras la digestión fue utilizada en los estudios de retardación. Se realizó previamente un control negativo, para comprobar que la proteína MBP presente en la mezcla no se unía a ninguna de las sondas utilizadas. También se comprobó que la proteína de fusión tenía el mismo comportamiento en los estudios realizados.

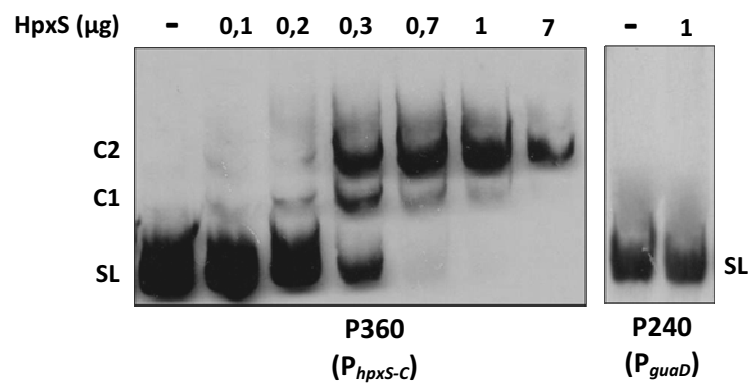


**FIGURA 5.17. SDS-PAGE de muestras correspondientes a la digestión de la proteína MBP-HpxS.** Se indican los tamaños correspondientes a las bandas del marcador de peso molecular (carril M). Carril 1: productos de la digestión de MBP-HpxS llevada a cabo por Factor Xa.

La unión de HpxS a la región intergénica de *hpxSAB-hpxC* ( $P_{hpxS-C}$ ) y al promotor de *guaD* ( $P_{guaD}$ ), se analizó mediante EMSAs, según lo descrito en METODOS 4.4.2. Las sondas utilizadas abarcaban diferentes zonas de  $P_{hpxS-C}$  y  $P_{guaD}$ , las cuales una vez purificadas, fueron marcadas con digoxigenina.

En primer lugar se analizó la capacidad de unión de HpxS a la región intergénica *hpxS-hpxC* y a la región promotora de *guaD* (sondas P360 y P240 respectivamente), utilizando diferentes cantidades de proteína a fin de determinar la concentración óptima a utilizar en los siguientes experimentos. Los resultados obtenidos mostrados en la FIGURA 5.18., indican que existe interacción entre HpxS y la sonda P360 correspondiente a la región intergénica *hpxSAB-hpxC*, no siendo así con la sonda P240 correspondiente a la región promotora de *guaD*. Dado que en P360 hay dos promotores divergentes, estos resultados por si solos no permitirían indicar que unidad, *hpxC* o *hpxSAB*, es regulada por HpxS. Sin embargo, el análisis de las actividades  $\beta$ -galactosidasa realizadas anteriormente, nos permitió concluir que la unión de la proteína HpxS a la región intergénica *hpxS-hpxC* regula la expresión únicamente de la unidad transcripcional *hpxSAB*. Así mismo, la no interacción de HpxS con la sonda P240, confirma los resultados obtenidos en el análisis de las actividades  $\beta$ -galactosidasa de la fusión transcripcional  $\phi(guaD-lacZ)$ , que indican que HpxS no regula la transcripción del gen *guaD*.

Los dos complejos de unión observados con la sonda P360 en la FIGURA 5.18, podrían deberse a diferentes formas de oligomerización de la proteína o a la posible existencia de más de un sitio de unión para HpxS con diferente afinidad.

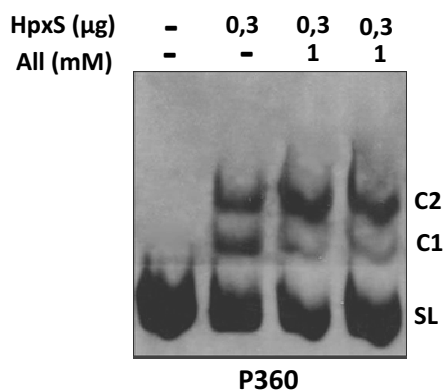


**FIGURA 5.18. Unión de HpxS a los promotores  $P_{hpxS-C}$  y  $P_{guaD}$ .** EMSAs realizados con HpxS purificada y las sondas P360 y P240 marcadas con digoxigenina, las cuales contienen las regiones promotoras  $P_{hpxS-C}$  y  $P_{guaD}$  respectivamente. C1: complejo de retardación 1. C2: complejo de retardación 2. SL: sonda libre. Las mezclas de reacción contenían un exceso de 500mM de poli(dI-dC), fueron incubadas a 30°C durante 15 minutos y sometidas posteriormente a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%.

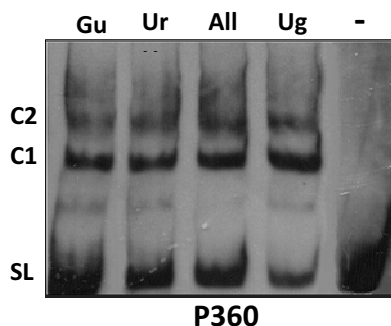
Por otra parte, el análisis de la actividad  $\beta$ -galactosidasa realizado, sugería que la alantoina, o algún metabolito derivado, podría ser la molécula inductora de HpxS. Para analizar la regulación de la transcripción de *hpxSAB* por alantoina, se realizaron EMSAs utilizando la sonda P360 y la proteína reguladora en presencia de este compuesto nitrogenado (FIGURA 5.19.). Los resultados obtenidos, ensayados con la misma cantidad de HpxS en todos los casos pero a diferentes concentraciones de

alantoina, muestran que al incrementar la concentración de este compuesto nitrogenado el patrón de los complejos de retardación cambia, el complejo C1 disminuye. Esto sugiere que la unión de la alantoina a la proteína HpxS podría cambiar la conformación de este regulador alterando su grado de oligomerización o bien modificar su afinidad por alguno de los sitios de unión al DNA.

Para confirmar que la molécula efectora de HpxS es la alantoina, se realizaron experimentos similares a los anteriormente detallados en presencia de diferentes metabolitos de la vía de degradación de purinas, entre ellos guanina, ácido úrico, alantoato y ureidoglicolato. Sin embargo, ninguno de los compuestos anteriores modificó el patrón de unión de HpxS a la sonda P360 (región intergénica *hpxS-hpxC*), tal como se muestra en la FIGURA 5.20.



**FIGURA 5.19. Efecto de la alantoina en la unión de HpxS a la región intergénica *hpxS-hpxC*.** EMSAs realizados con HpxS purificada y la sonda P360 marcada con digoxigenina con diferentes concentraciones de alantoina. C1: complejo de retardación 1, C2: complejo de retardación 2. SL: sonda libre. Las mezclas de reacción contenían un exceso de 500mM de poli(dI-dC), fueron incubadas a 30°C durante 15 minutos y sometidas posteriormente a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%.

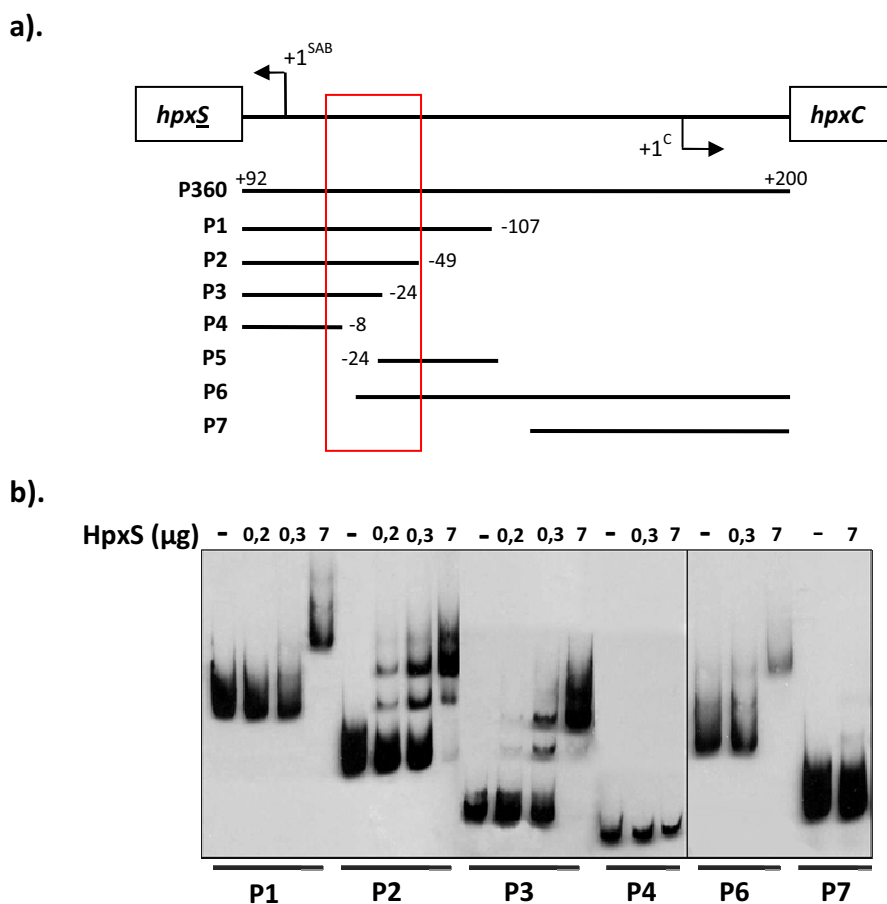


**FIGURA 5.20. Efecto de metabolitos de la vía de degradación de purinas en la unión de HpxS a  $P_{hpxS-C}$ .** EMSAs realizados con HpxS purificada y la sonda P360 marcada con digoxigenina con diferentes metabolitos de la vía de degradación de purinas. Gu: guanina, Ur: ácido úrico, All: alantoato, Ug: ureidoglicolato. En todos los casos se utilizaron 0.3 $\mu$ g de HpxS y los metabolitos a una concentración de 2mM. Las mezclas de reacción contenían un exceso de 500mM de poli(dI-dC), fueron incubadas a 30°C durante 15 minutos y sometidas posteriormente a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%.

Lo siguiente que nos planteamos fue localizar con mayor precisión el sitio de unión de HpxS en la región intergénicas de *hpxSAB-hpxC*, para ello, se obtuvieron por

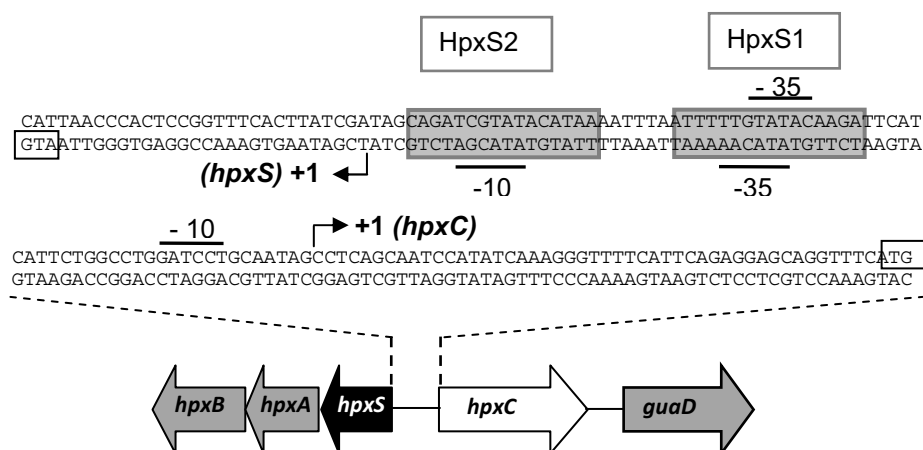
PCR seis fragmentos de dicha región (FIGURA 5.21.a.), los cuales fueron marcados con digoxigenina y utilizados como sondas en subsecuentes EMSAs. Los oligonucleótidos utilizados para tal fin se detallan en el ANEXO 1.

Los resultados presentados en la FIGURA 5.21.b., muestran que HpxS se une a las sondas P1, P2, P3 y P6 pero no a P4 ni P7. De esta forma pudimos identificar la existencia de una zona de unión de HpxS en la región intergénica *hpxSAB-hpxC*, la cual está comprendida entre la posición -8 y -29 respecto al inicio de transcripción de *hpxS*.



**FIGURA 5.21. Unión de HpxS a diferentes fragmentos de la región intergénica *hpxS-hpxC*.** a). Diagrama de las diferentes sondas utilizadas. Las posiciones se indican respecto al +1 de *hpxS*, excepto la posición +200 que está dada respecto al +1 de *hpxC*. El recuadro rojo indica la zona de unión identificada b). EMSAs realizados con HpxS purificada y diferentes fragmentos de la región intergénica *hpxS-hpxC*. Las mezclas de reacción contenían un exceso de 500mM de poli(dI-dC), fueron incubadas a 30°C durante 15 minutos y sometidas posteriormente a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%.

Una vez acotada la región de unión al promotor de *hpxSAB*, un análisis *in silico* más detallado de esta zona, reveló la presencia de dos secuencias palindrómicas (5'-TTTAT**GTATAC**GATCT-3') y (5'-ATCTT**GTATAC**AAAAA-3'), a las cuales denominamos S1 y S2 respectivamente. Estos palíndromos están muy conservados respecto a la secuencia consenso propuesta para los reguladores de la familia GntR (5'-(N)<sub>y</sub>GT(N)<sub>x</sub>AC(N)<sub>y</sub>-3'), los nucleótidos consenso están en negrita y en ambos casos separados entre sí por la misma distancia. S1 está localizado entre las posiciones -4 y -19 respecto del inicio de transcripción de *hpxS*, mientras que S2 entre las posiciones -26 y -41 (FIGURA 5.22.).



**FIGURA 5.22. Región intergénica *hpxS-hpxC*.** Se indican las secuencias -10 y -35 para los dos promotores identificados en esta región así como su inicio de transcripción y el inicio de la zona codificante. En el recuadro gris se indican las secuencias S1 y S2.

A fin de elucidar si los dos palíndromos identificados eran funcionales, utilizamos dos estrategias: 1) realizar EMSAs con una nueva sonda P5 (FIGURA 5.21.a.) que no se solapara con P3 de tal forma que cada una de las sondas tuviera únicamente uno de los palíndromos identificados, 2) analizar mediante EMSAs el efecto de mutaciones en los nucleótidos consenso en las cajas de unión de HpxS al promotor de *hpxSAB*. Paralelamente se realizaron experimentos de competencia utilizando sondas P3 y P5 no marcadas para demostrar la especificidad de la unión HpxS-DNA.

Los resultados obtenidos utilizando las sondas P3 y P5 presentados en la FIGURA 5.23.a., muestran que la unión de HpxS es específica en ambas secuencias palindrómicas identificadas ya que el complejo de retardación desaparece cuando se añade el fragmento P3 o P5 no marcado, pero no se modifica cuando se añade el fragmento P4 que no contiene dichas secuencias. La presencia de más de un complejo de retardación puede deberse a diferentes grados de oligomerización de la proteína.

Cabe destacar que se necesitó una cantidad 3 veces mayor de HpxS en los EMSA realizados con la sonda P3 respecto a P5, lo cual sugiere que esta proteína puede tener mayor afinidad por S2 que por S1 (FIGURA 5.23). La adición de alantoina a las mezclas de reacción, no modificó el patrón de los complejos de unión de HpxS con S1 (P3), sin embargo, redujo significativamente el complejo menos retardado a favor del mayor en el caso de S2 (P5) (FIGURA 5.23.b). Lo anterior sugiere que la alantoina podría ocasionar un cambio conformacional en HpxS unido a S2 que modificaría su estado de oligomerización, reforzando así la idea de que la alantoina es la molécula efectora de HpxS.

Las mutaciones de P3\* y P5\*, se introdujeron mediante los oligonucleótidos utilizados para obtener la sonda mediante PCR. En ambos palíndromos, los nucleótidos consenso **GT** y **AC** fueron sustituidos por TC y GG respectivamente. Los resultados del EMSA (FIGURA 5.23.b) mostraron que estas mutaciones eliminan la unión de HpxS, confirmando de esta manera la funcionalidad de la dos secuencias palindrómicas de unión (S1 y S2) identificadas en la región promotora de *hpxSAB*.

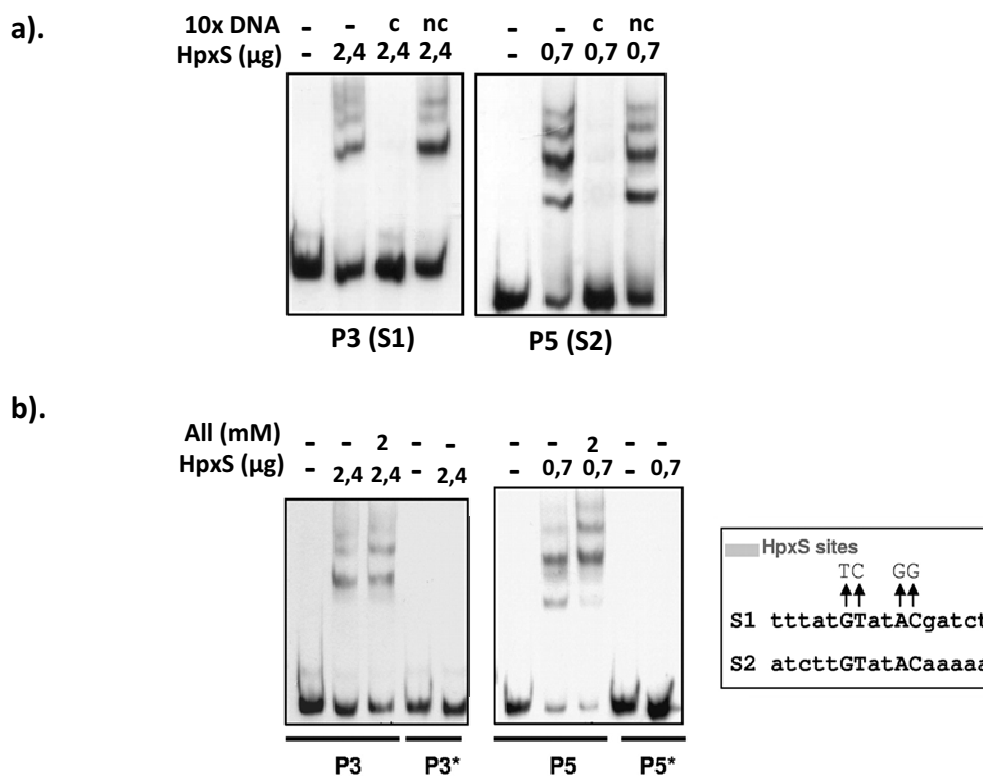


FIGURA 5.23. Unión de HpxS a S1 y S2 a). EMSA correspondiente a los complejos de retardación HpxS-S1 y HpxS-S2 en presencia de DNA competitivo (c) y no competitivo (nc) b). EMSAs de HpxS con P3 y P5 en presencia de alantoina. P3\* y P5\* contienen las mutaciones en los nucleótidos consenso indicadas en el cuadro anexo.

Existen otros reguladores ya descritos, pertenecientes a la subfamilia FadR, que se unen a más de un lugar dentro de la misma secuencia promotora desempeñando una regulación dual como activadores y represores. Tal es el caso del regulador LldR, en *E. coli*, que reprime la expresión del operón *lldPRD* en ausencia de L-lactato, pero en presencia del mismo compuesto LldR se comporta como activador. En este modelo, la proteína reguladora se une a dos secuencias en el operón *lldPRD*, favoreciendo la curvatura del DNA a través de la interacción de moléculas de LldR unidas a los centros distantes, de esta manera reprime la transcripción. La unión del inductor L-lactato a LldR favorece un cambio conformacional que rompe dicha interacción y elimina la curvatura en el DNA abriendo el complejo de transcripción (Aguilera *et al.* 2008). En el caso de HpxS, la pequeña distancia existente entre los dos sitios de unión reconocidos por HpxS (S1 y S2) no permitiría la curvatura del DNA, sin embargo, es probable que la interacción lado a lado de las moléculas de HpxS unidas a S1 y S2 pudiera mediar la represión de *hpxSAB*. El papel activador de HpxS en presencia de alantoina, podría depender de los cambios conformacionales inducidos por esta molécula efectora. Sin embargo, la alantoina por sí misma no es suficiente para suprimir la represión de *hpxSAB*. En este sentido, los resultados de las fusiones transcripcionales presentados en el apartado RESULTADOS 5.2.3.3 indican que NAC es requerido para la activación de la transcripción del operón *hpxSAB*.

Aunque la secuencia consenso de unión de las proteínas FadR está muy conservada, una proteína con la misma función entre una especie bacteriana y otra,



puede presentar un patrón de unión al DNA diferente. Tal es el caso del regulador LldR implicado en la utilización de lactato en *Pseudomonas aureginosa*, que a diferencia del descrito en *E. coli*, solo reconoce un palíndromo para unirse al DNA (Gao *et al.* 2012).

#### 5.2.4.2. Análisis de la unión de NAC a las regiones promotoras de *hpxSAB-hpxC-guaD*

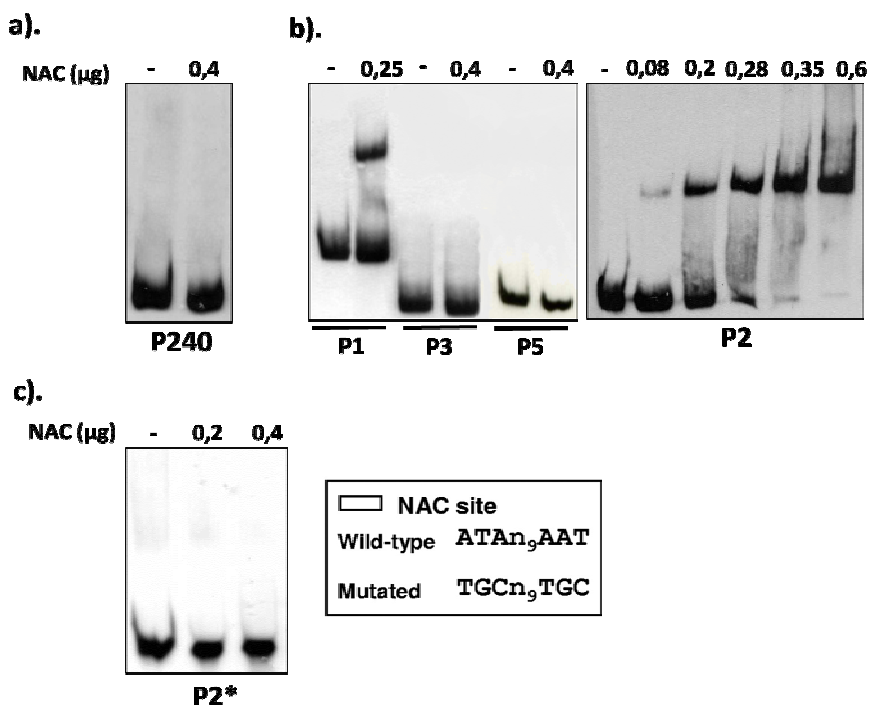
Los resultados obtenidos del análisis de la expresión de las fusiones transcripcionales, particularmente aquellos observados en el fondo genómico del mutante *nac*, sugirieron que la transcripción del operón *hpxSAB* podría estar regulada indirectamente por NtrC a través de la proteína NAC, no siendo así en el caso de *guaD* ni *hpxC*. Es por ello que nos planteamos estudiar mediante EMSAs la existencia de una interacción entre NAC y la región intergénica *hpxS-hpxC* y descartar la unión de esta proteína con la región promotora de *guaD*. Además como ya se ha comentado, en un estudio realizado recientemente, mediante inmunoprecipitación de la cromatina, para identificar genes diana de la regulación por NAC en el genoma de *K. pneumoniae*, se ha identificado la región intergénica *hpxS-hpxC*, como uno de los fragmentos de DNA que coimmunoprecipita con NAC (Frisch and Bender 2010).

Para nuestro estudio, la proteína NAC fue sobreexpresada en la cepa EB4335 la cual contiene los plásmidos pCB1026 y pCB1083, el primero codifica la proteína NAC fusionada a una cola de histidinas que permite su posterior purificación por afinidad a una columna de níquel, y el segundo plásmido mantiene la expresión de NAC reprimida hasta que se añade IPTG al medio de cultivo (Rosario and Bender 2005). La posterior purificación de la proteína sobreexpresada se realizó según lo descrito en METODOS 4.2.4.

En esta primera parte, los EMSAs realizados con la proteína NAC purificada y la sonda P240 correspondiente al promotor del gen *guaD*, mostraron que no se forma complejo de retardación con esta sonda (FIGURA 5.24.). Lo anterior, nos permitió confirmar que tal como esperábamos, para un promotor dependiente de la subunidad  $\sigma^{54}$  de la RNA polimerasa, NAC no se une a  $P_{guaD}$ . Respecto al análisis efectuado con los diferentes fragmentos de la región intergénica *hpxS-hpxC*, con las sondas P1, P2, P3 y P5, solo se observó la formación del complejo de retardación con las sondas P1 y P2, acotando de esta manera la región de unión al DNA por parte de NAC. Paralelamente, para caracterizar un poco más dicha unión, se utilizaron diferentes concentraciones de NAC en ensayos de retardación realizados con P2. Los resultados presentados en la FIGURA 5.24., muestran que las concentraciones a las que se une NAC son similares a las descritas para otros promotores regulados por esta proteína, dentro del rango de 1 a 5 pmol (Rosario and Bender 2005).

Un análisis *in silico* más detallado de la región de unión de NAC a  $P_{hpxS-C}$  permitió identificar una secuencia de unión a NAC muy conservada (5'-ATAN<sub>9</sub>AAT-3') entre las posiciones -20 y -34 respecto del inicio de transcripción del operón *hpxSAB* (FIGURA 5.26.). A fin de confirmar su papel en la interacción de NAC con el promotor, se realizó mutagénesis dirigida del palíndromo identificado mediante PCR. Dicha mutación (5'-TGCN<sub>9</sub>TGC-3') anuló la unión de NAC a P2, tal como se muestra en la FIGURA 5.24.c. La ubicación de la caja de unión identificada para NAC, es congruente con lo observado en otros promotores donde NAC también se une muy cerca del inicio de transcripción de los genes que regula (Goss *et al.* 2002; Liu and Bender 2007), lo

cual podría sugerir que las regiones promotoras dependientes de NAC sufren alteraciones menos drásticas que aquellas controladas directamente por el regulador global NtrC. Dado que las cajas de unión para NtrC están localizadas distantes respecto al inicio de transcripción se requiere de otras proteínas que curven el DNA como IHF.



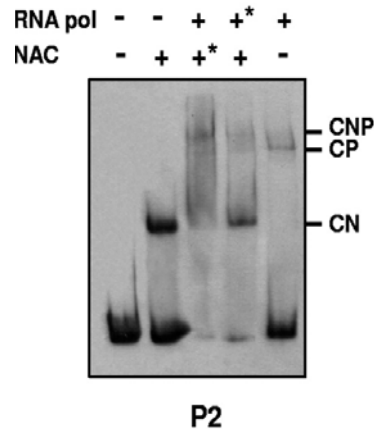
**FIGURA 5.24. Unión de NAC a los promotores del sistema *hpxSAB-hpxC-guaD*** a). EMSA con la región promotora de *guaD* (P240). b) EMSA con sondas (P1,P2,P3,P5) obtenidas con diferentes fragmentos de la región intergénica *hpxS-hpxC* (ver figura 5.21). c). EMSA con la sonda P2 mutada. Las mezclas de reacción contenían un exceso de 500mM de poli(dI-dC), fueron incubadas a 30°C durante 15 minutos y sometidas posteriormente a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%.

Dado que el sitio de unión de NAC en la región intergénica *hpxSAB-hpxC* se solapa parcialmente con la secuencia reconocida por la subunidad  $\sigma^{70}$  de la RNA polimerasa ubicada a -35 respecto del inicio de transcripción de *hpxSAB*, nos planteamos analizar el efecto de la unión de NAC sobre la unión de la RNA polimerasa. Para ello se realizaron EMSA utilizando RNA polimerasa comercial (Sigma-Aldrich, Alemania) y la sonda P2 en presencia y ausencia de NAC (FIGURA 5.25).

El complejo de retardación formado con P2 tanto con NAC (CN) como con la RNA polimerasa (CP) demuestran la interacción de ambas proteínas con el promotor de *hpxSAB* (FIGURA 5.25.). Paralelamente, en una de las mezclas de reacción se preincubó la sonda P2 con NAC antes de añadir la RNA polimerasa. El resultado fue la formación de un nuevo complejo de retardación (CNP) de mayor peso molecular que CP o CN.

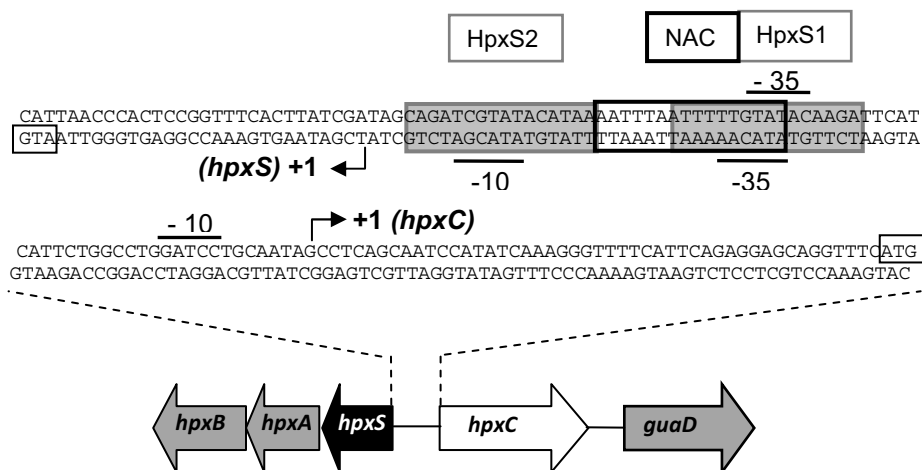
Estos resultados sugieren que NAC y la RNA polimerasa se unen simultáneamente a la sonda P2. Además, la preincubación con NAC también aumentó la intensidad de la banda correspondiente al complejo CNP en comparación con la observada cuando la RNA polimerasa se añadió a otra mezcla de reacción antes que

NAC. Estos resultados nos hacen pensar que NAC tiene un efecto positivo en la unión de la RNA polimerasa al promotor de *hpxSAB in vitro*. Sin embargo, el análisis de las fusiones transcripcionales realizado previamente en el mutante *hpxS*, mostró que NAC expresado en condiciones limitantes de nitrógeno, reprime la transcripción de *hpxSAB*.



**FIGURA 5.25. Unión de NAC en presencia de RNA polimerasa.** EMSA de NAC con la sonda P2 en presencia y ausencia de RNA polimerasa. \* indica que la mezcla de reacción de reacción se preincubó con esa proteína. CNP: complejo de retardación DNA-NAC-RNA polimerasa, CN: complejo de reacción DNA-NAC, CP: complejo de retardación DNA-RNA polimerasa.

Tomando en consideración los resultados obtenidos hasta el momento, podemos sugerir que *in vivo* la función activadora de NAC depende de su interacción con HpxS en presencia de alantoina. En el promotor de *hpxSAB*, el sitio de unión de NAC (centrado en la posición -27) está localizado entre S1 (posición -12) y S2 (posición -33) y se solapa parcialmente con S2 (FIGURA 5.26.).



**FIGURA 5.26. Secuencia de unión para NAC en la región intergénica *hpxS-hpxC*.** Se indican las cajas -10 y -35 para los dos promotores identificados en esta región así como su inicio de transcripción y el codón de inicio para cada gen. Los recuadros grises indican las secuencias de unión S1 y S2.

Dado que NAC se uniría en el lado opuesto de la hélice con respecto a HpxS, es posible especular que NAC podría contactar con HpxS unida a S2 eliminado así la

interacción entre las moléculas de HpxS unidas a S1 y S2. Aunque NAC puede favorecer la interacción de la RNA polimerasa con el promotor *hpxSAB*, la activación transcripcional de este operón requiere la presencia de alantoína. Esta molécula efectora se une a HpxS, probablemente en su extremo C-terminal como ha sido descrito para otros miembros de la familia de reguladores GntR, ocasionando un cambio conformacional que modifica la función de HpxS. En este contexto, es probable que el cambio conformacional producido en HpxS unido a S2 pudiera modificar la conformación de NAC y su interacción con la RNA polimerasa permitiendo la formación de un complejo de transcripción abierto y por ende la activación de la transcripción de *hpxSAB*.

### 5.3. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA GÉNICO IMPLICADO EN LA DEGRADACIÓN DE ALANTOATO EN LA CEPA KC2653

#### 5.3.1. ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE *hpxFGHIJK-hpxU-hpxWXYZ*

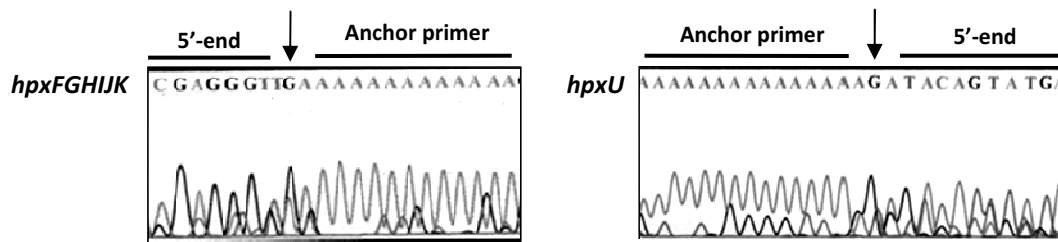
Tal como se ha comentado en el apartado RESULTADOS 5.1, se ha confirmado la existencia de un sistema génico en *K. pneumoniae* análogo al involucrado en el metabolismo de alantoato en *K. oxytoca*. El *cluster* que comprende los genes KPN\_01761 a KPN\_01771 se ha propuesto codifica una alantoato amidohidrolasa (*hpxK*), una ureidoglicina aminotransferasa (*hpxJ*), un sistema de transporte tipo ABC (*hpxFGHI*), un regulador transcripcional de la familia RpiR (*hpxU*), una oxamato amidohidrolasa (*hpxW*), una oxalurato amidohidrolasa (*hpxY*) y una proteína que podría estar implicada en la degradación de oxalurato (*hpxZ*). Sin embargo, no hay evidencias experimentales de dicha función. La organización génica de este conjunto de genes se presenta en la FIGURA 5.1.

La organización génica de *hpxFGHIJK-hpxU-hpxWXYZ*, permite proponer la existencia de al menos dos unidades transcripcionales. Además la distancia de 215pb que hay entre el codón de *stop* del gen *hpxU* y el codón de inicio del gen *hpxF* hace pensar en la existencia de un promotor que dirija la expresión de los genes *hpxFGHIJK*. De confirmarse la existencia de un promotor delante de *hpxFGHIJK*, existirían tres unidades transcripcionales en este *cluster*, una formada por *hpxFGHIJK*, otra por *hpxU* y otra por *hpxWXYZ*. Las unidades transcripcionales *hpxFGHIJK* y *hpxU* se transcribirían independientemente en la misma dirección y de forma divergente respecto a la unidad transcripcional *hpxWXYZ*.

El inicio de transcripción se determinó mediante la técnica RACE (METODOS 4.5.2.). El RNA total provenía de cultivos de la cepa KC2653 crecidos aeróbicamente en un medio con nitrógeno limitante (glucosa-glutamina, GGln). En el caso de *hpxFGHIJK* y *hpxU*, el inicio de transcripción se identificó a 88 y 50 nucleótidos, respectivamente, del codón ATG de cada gen (FIGURA 5.27.).

Por otra parte, aunque se realizaron numerosos intentos en diferentes condiciones de crecimiento para identificar el inicio de transcripción del operón *hpxWXYZ*, no fue posible determinarlo experimentalmente. Dado que ya hemos confirmado la presencia de los genes de este operón en la cepa KC2653, es posible que en las condiciones de crecimiento de los cultivos utilizados para obtener RNA, algún tipo de regulación epigenética como por ejemplo la metilación del DNA, pudiese estar

reprimiendo la transcripción de este operón. De ser así, el RNA total utilizado en los experimentos no contendría la región correspondiente al operón *hpxWXYZ*. Algunos estudios han demostrado que el estado de metilación del DNA bacteriano puede ocasionar cambios transcripcionales en algunos operones de manera específica (Casadesús and Low 2006). Esto ocurre cuando una metilasa y otra proteína compiten por ocupar el sitio de metilación en un promotor. La unión de la proteína impide el acceso de la metilasa, lo cual permite la transcripción de los genes dependientes de ese promotor. Si los cambios del medio ocasionan la degradación o inhibición de la proteína que protege el sitio de metilación, entonces el sitio será metilado impidiendo de esta manera la transcripción de esos genes (Güell *et al.* 2011).



**FIGURA 5.27. Identificación de los inicios de transcripción de las unidades transcripcionales *hpxFGHIJK* y *hpxU* mediante amplificación de extremos de cDNA (RACE).** Los fragmentos de cDNA se obtuvieron por PCR utilizando un cebador complementario *PCR anchor primer* y un oligonucleótido complementario a la región promotora. Los fragmentos de cDNA fueron clonados en el vector pGEMT. Los clones obtenidos se analizaron mediante secuenciación con oligonucleótidos complementarios al propio plásmido. Se muestran los resultados de la secuenciación, indicando la localización del cebador *PCR anchor primer* y del inicio de transcripción identificado.

Como no fue posible determinar experimentalmente el inicio de transcripción para el operón *hpxWXYZ*, realizamos un análisis *in silico* de la región promotora mediante el programa Neural Network Promoter Prediction (Reese 2001), disponible en la página web [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html). El inicio de transcripción sugerido, se localiza a 20 nucleótidos respecto del ATG del gen *hpxW*.

El análisis *in silico* de la región promotora de *hpxFGHIJK* ( $P_{hpxF}$ ), *hpxU* ( $P_{hpxU}$ ) y *hpxWXYZ* ( $P_{hpxW}$ ), utilizando los programas Footprint y Promscan, permitió identificar posibles cajas de unión para la subunidad  $\sigma^{70}$  ó  $\sigma^{54}$  de la RNA polimerasa (TABLA 5.3.).

**TABLA 5.3. Cajas reconocidas por las subunidades  $\sigma^{70}$  y  $\sigma^{54}$  de la RNA polimerasa en los promotores  $P_{hpxF}$ ,  $P_{hpxU}$  y  $P_{hpxW}$ .** En rojo se indican los nucleótidos idénticos a la secuencia consenso. NI: no identificado. En azul se indican los elementos característicos -24(GG) y -12(GC).

	Caja $\sigma^{70}$			Caja $\sigma^{54}$	Localización
	-10	-35	Distancia entre secuencias		
<b>Consenso</b>	TATAAT	TTGACA	17bp +/-1	TGGCACGGCTCTTGCT	-11
$P_{hpxF}$	TTTATT	TTGTCC	16bp	NI	NI
$P_{hpxU}$	TGTAAG	TTTTCC	16bp	TGGCACGCTATGTGGA	-10
$P_{hpxW}$	TGTTCT	TTCAGA	18bp	NI	NI

En el promotor  $P_{hpxF}$  se localizaron las secuencias -10 (TTTATI) y -35 (TTGTCC), separadas entre sí por 16bp, muy similares a la secuencia consenso de unión de la subunidad  $\sigma^{70}$  de la RNA polimerasa. Respecto al promotor  $P_{hpxW}$ , se identificaron cajas -10 (TGTTCT) y -35 (TTCAGA) separadas entre sí por 18bp y ninguna secuencia de unión para la subunidad  $\sigma^{54}$  de la RNA polimerasa. Por lo anterior, proponemos que los promotores  $P_{hpxF}$  y  $P_{hpxW}$  son reconocidos por la subunidad  $\sigma^{70}$  de la RNA polimerasa. En el caso del promotor  $P_{hpxU}$ , se encontraron secuencias de unión tanto para la subunidad  $\sigma^{70}$  como para la subunidad  $\sigma^{54}$  de la RNA polimerasa. Las cajas -10 (TGTAAG) y -35 (TTTTCC) están separadas entre sí por 16bp y son muy similares a la secuencia consenso establecida. La secuencia identificada para la subunidad  $\sigma^{54}$  (TGGCACGCTATGTGCA) también es muy similar a la secuencia consenso establecida, sin embargo el elemento característico -12(GC) no está conservado.

Los inicios de transcripción identificados experimentalmente confirman la existencia de dos unidades transcripcionales,  $hpxFGHIJK$  y  $hpxU$ , mientras que la tercera unidad transcripcional de este *cluster* correspondiente al operón  $hpxWXYZ$  ha sido identificada en base a la organización génica y al análisis *in silico*. Los promotores  $P_{hpxF}$  y  $P_{hpxW}$  serían reconocidos por la subunidad  $\sigma^{70}$  de la RNA polimerasa, respecto a  $P_{hpxU}$  los resultados obtenidos hasta este momento no permiten establecer si es un promotor dependiente de la subunidad  $\sigma^{70}$  ó  $\sigma^{54}$ .

### 5.3.2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS PRODUCTOS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES $hpxFHGIJK$ - $hpxU$ - $hpxWXYZ$

Una vez identificados los genes  $hpxFHGIJK$ - $hpxU$ - $hpxW$  en *K. pneumoniae*, nos planteamos profundizar en la asignación de función a los mismos. La secuencia de los genes y de sus productos génicos, se analizó utilizando los programas Blast-n y Blast-p.

#### 5.3.2.1. Asignación de función a HpxK

El análisis de la secuencia de HpxK de *K. pneumoniae* MGH78578, mostró que esta proteína mantiene un 84% de similitud respecto a la alantoato amidohidrolasa propuesta en *K. oxytoca*, 50% con la de *Xanthomonas campestris* y 34% con la de *E. coli* (AIIc). En *E. coli*, la alantoato amidohidrolasa (AAH) es una metaloproteína dependiente de zinc que cataliza la degradación de alantoato. En un inicio se consideró que la AAH catalizaba dos reacciones sucesivas, en la primera convertía el alantoato en ureidoglicina liberando amonio y  $\text{CO}_2$ , mientras que en la segunda reacción formaba ureidoglicolato a partir de ureidoglicina (Xu *et al.* 1995; Agarwal *et al.* 2007). Sin embargo, estudios recientes indican que la alantoato amidohidrolasa de *E. coli* (AIIc) cataliza únicamente la primera reacción, siendo la ureidoglicina su producto final (FIGURA 5.28) (Serventi *et al.* 2009; Werner *et al.* 2010). Una segunda enzima, la ureidoglicina aminohidrolasa (AIIe) formaría el ureidoglicolato.

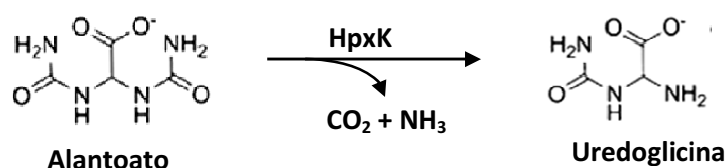


FIGURA 5.28. Reacción catalizada por la alantoato amidohidrolasa producto del gen  $hpxK$

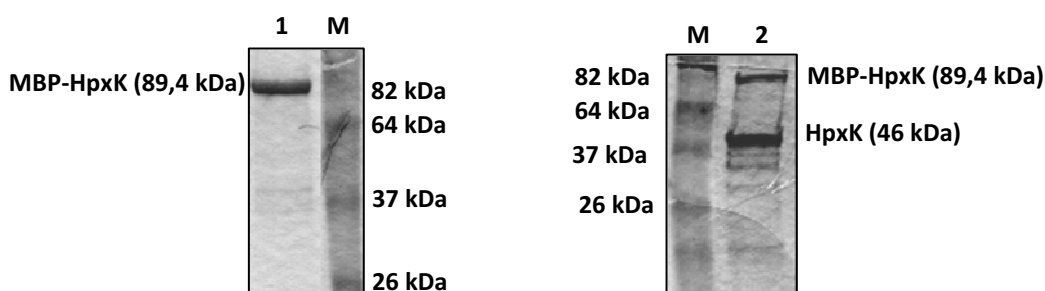
En la proteína AIIc, se han identificado cuatro residuos que están implicados en la unión a alantoato, los cuales son: His228, Asn277, Arg290, e His384 (Agarwal *et al.* 2007). El alineamiento de secuencia entre AIIc y HpxK, reveló la presencia de estos cuatro residuos conservados también en la proteína HpxK de *K. pneumoniae* (FIGURA 5.29.).

HpxK	29	SETADALTRVYLSPEHLUANQLVGQWMQAAGMMVWQDSVGNICGRYEGQQEGAPALLLGS	88
		++ A +TR+ SPE L+ Q + M A+G+ D VGN+ GR G + +L GS	
AIIc	21	ADPAGMTRLLYSPEWLETQQQFKRMAASGLETRFDEVGNLYGRLNGTEYPQEVVLSGS	80
HpxK	89	HLDIVRNAGRYDGMGLVLA AEIVVQRLHQQRRLAKAIEIVGFGDEEGTRFGITLLGSRG	148
		H+DTV N G DG G LAA + L Q + +E+V +EEG+RF GS+	
AIIc	81	HIDIVVNGNLDGQFGALAAWL AIDWLKTQYGAPLRTVEVVAMAE EGSFRFPYVFWGSKN	140
HpxK	149	VTG-TWPESWLSQC DADGVSVAQALVNAGLDPARIAHAARHPR-DIAAYLELHIEQGPCL	206
		+ G P+ + CDA G S A+ G + +A PR DI A++ELHIEQG L	
AIIc	141	IFGLNAPDDVRNICDAKGN SFVDAMKACGF---TLPNAPLTPRQDIKAFVELHIGQGCVL	197
HpxK	207	EQAGLALGVVEAINGARRLNCRFTGEAGHAGTVPMLHRKTALAAAAEWNVQVENLTRQRG	266
		E G ++GVV AI G RR GE+ HAGT PM +R+D + A + Q ++ G	
AIIc	198	ESNGQSIGVVNAIVGQRRYTVTLMGESNHAGTTPMGYRRDVTYAFSRICHQSVEKAKRMG	257
HpxK	267	GNLVATVGTLRCAPGAVNVIPGEVQLTLDIRGPQDAPLTALLDELLGQAUAIAGRRQLSF	326
		LV T G + P VNV+PG+ T+D R A L +L +AI +	
AIIc	258	DPLVLTFGKVEPRPMTVNVVPGKTTFTIDCRHTDAAVLRDFTQQLENDMRAICDEMDIGI	317
HpxK	327	AAEYYRIAATAACD SHLQAVLSEAVAAVQGRSLTLP SGAGHDAIAIAERWPSAMLFVRCL	386
		+ + + L A L+E + + SGAGHDA A R P+ M+F+ +	
AIIc	318	DIDLWMDEEPVPMNKELVATLTEL CEREKLNRYVMHSGAGHDAQIFAPRVPTCMIFIPSI	377
HpxK	387	GGVSHPAESVTAADVGLAIDAFSRAVEKVA	417
		G+SH+PAE D+ + + ++A	
AIIc	378	NGISHNPAERTNITDLAEGVKTLALMLYQLA	408

**FIGURA 5.29. Alineamiento de secuencias de AIIc y HpxK.** En rojo se muestran los aminoácidos que están implicados en la unión a alantoato.

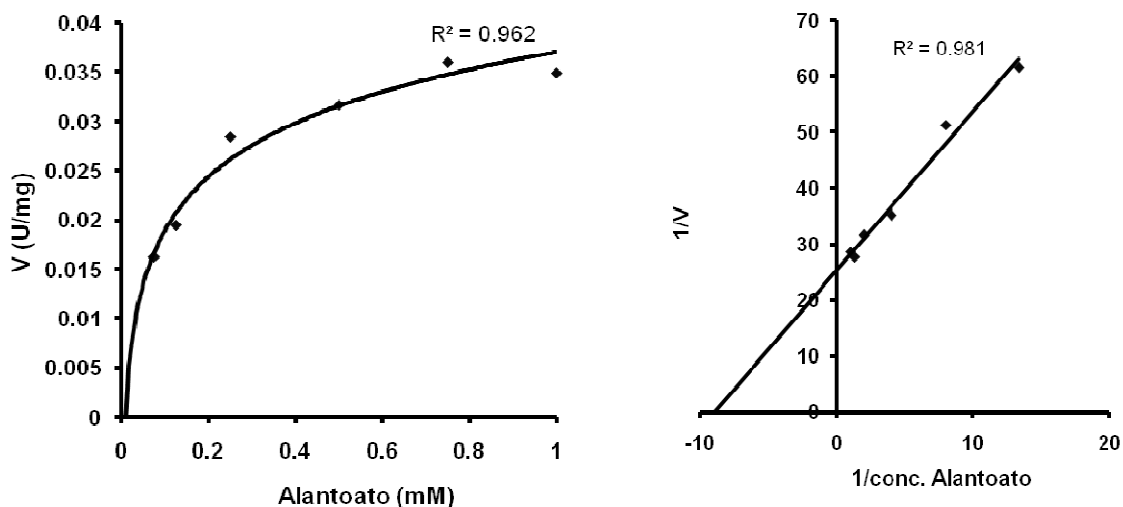
A fin de confirmar la actividad alantoato amidohidrolasa que el análisis *in silico* sugería para esta proteína, el gen *hpxK* fue clonado y su producto de expresión posteriormente purificado y caracterizado. El gen *hpxK* se amplificó por PCR a partir de DNA genómico de la cepa KC2653, los oligonucleótidos usados para tal fin, contenían en sus extremos dianas para enzimas de restricción compatibles con las del vector a utilizar en la clonación posterior (ANEXO 1). El fragmento de 1300bp obtenido, fue clonado en el vector pMal-c2x a fin de obtener HpxK fusionada a la proteína de unión a maltosa (MBP; METODOS 4.2.3.). La proteína MBP-HpxK fue posteriormente purificada por cromatografía de afinidad en una columna de amilosa, cabe mencionar que el peso de la proteína MBP (42.5kDa) es muy similar al de la proteína HpxK (46kDa) por lo cual en la FIGURA 5.30 solo se observa una banda correspondiente a este peso molecular ya que ambas proteínas se sobrepone. Los ensayos de actividad se realizaron con la proteína recombinante digerida.

La actividad enzimática de HpxK purificada a partir de la cepa KC2653 se determinó mediante un sistema de reacciones acopladas utilizando alantoato como sustrato, tal como está descrito en METODOS 4.2.6.4. Una vez confirmada la actividad alantoato amidohidrolasa de HpxK, los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  fueron determinados experimentalmente mediante una cinética enzimática en la que se utilizaron concentraciones de sustrato entre 0,025 mM y 1 mM (FIGURA 5.31.). Los resultados obtenidos muestran una  $K_m = 0,11\text{mM}$  y la  $V_{max} = 4 \times 10^{-2} \text{ U/mg}$  (donde U corresponde a  $\mu\text{mol}$  de amonio producido por minuto). Estos parámetros han sido calculados mediante la representación de los dobles recíprocos o de Lineweaver-Burk, siendo el coeficiente de correlación de 0,98.



**FIGURA 5.30. SDS-PAGE de muestras correspondientes al proceso de purificación de HpxK.** Se indican los tamaños correspondientes a las bandas del marcador de peso molecular (carril M). Carril 1: proteína de fusión MBP-HpxK purificada. Carril 2: producto de la digestión llevada a cabo por Factor Xa. HpxK (46 kDa) y MBP (42,5 kDa) tienen un tamaño similar, por lo cual solo se ve una banda.

Cabe resaltar que previamente a la determinación de los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  se realizaron ensayos de actividad enzimática en diferentes condiciones de pH y presencia de iones ( $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ) a fin de determinar las condiciones óptimas. Los resultados mostraron que el pH óptimo de HpxK es 8,5 y que su actividad enzimática es seis veces mayor en presencia de manganeso 0,1 mM respecto a la registrada en ausencia de metales divalentes. La presencia de  $\text{Zn}^{+2}$  o de  $\text{Mg}^{+2}$  en el medio inactivó por completo a la enzima (datos no mostrados).



**FIGURA 5.31. Cinética enzimática de la actividad alantoato amidohidrolasa codificada por *hpxK*.** A la derecha se muestra la representación de los dobles recíprocos o de Lineweaver-Burk.



Hasta el momento, solo se han caracterizado alantoato amidohidrolasas de *Bacillus fastidious*, *E. coli* y de algunas plantas como *Arabidopsis thaliana* (Xu *et al.* 1995; Todd and Polacco 2006; Agarwal *et al.* 2007; Werner *et al.* 2008). Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que HpxK comparte algunas características con las alantoato amidohidrolasas descritas, ya que todas ellas, excepto la de *E. coli*, son dependientes de manganeso y el pH óptimo para su actividad oscila entre 8,5-8,8.

### 5.3.2.2. Asignación de función a HpxJ

Los resultados del análisis de la secuencia de HpxJ de *K. pneumoniae* MGH78578, mostraron que esta proteína comparte un 51% de similitud con la ureidoglicina-glioxilato aminotransferasa (PucG) identificada y caracterizada en *Bacillus subtilis* (Ramazzina *et al.* 2010). Además, HpxJ tiene un 93% de similitud con la proteína que en *K. oxytoca* se propone como homóloga a PucG.

La ureidoglicina, producto de la hidrólisis del alantoato por la alantoato amidohidrolasa (HpxK), puede degradarse espontáneamente. Sin embargo, el análisis genético de algunos genomas bacterianos indica la presencia de una aminotransferasa que catalizaría esta reacción enzimática.

Mientras se obtenía la proteína recombinante HpxJ fusionada a MBP para realizar la correspondiente caracterización enzimática, han sido publicados estudios que presentan evidencia de que HpxJ en *K. pneumoniae* es una aminotransferasa que convierte la ureidoglicina y un  $\alpha$ -cetoácido en oxalurato y el correspondiente aminoácido (FIGURA 5.32) (French and Ealick 2010).

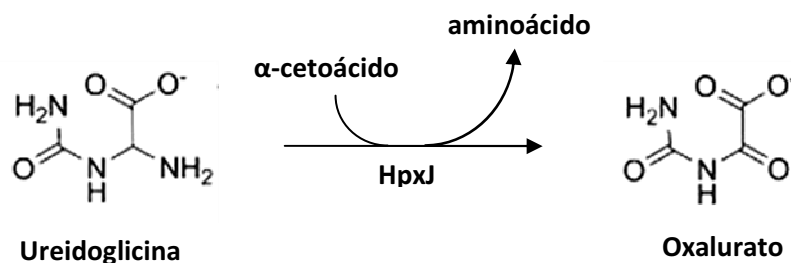


FIGURA 5.32 Reacción catalizada por HpxJ.

En el estudio realizado por French and Ealick 2010, la actividad ureidoglicina aminotransferasa de HpxJ se analizó utilizando diferentes  $\alpha$ -cetoácidos como aceptores del grupo amino, tal es el caso del piruvato y el oxaloacetato. Cuando la reacción de transaminación se realizó entre la ureidoglicina y el piruvato, se formó oxalurato y el correspondiente aminoácido alanina. También se observó entre los productos una pequeña cantidad de glicina tanto en presencia como ausencia de piruvato, lo cual puede ser atribuido a la degradación no enzimática de la ureidoglicina. La degradación espontánea de la ureidoglicina produce además glioxilato que podría ser utilizado como sustrato de la reacción de transaminación, en este caso los productos de la reacción serían oxalurato y glicina. De manera análoga, cuando se utilizó oxaloacetato como aceptor del grupo amino de la ureidoglicina, se formó oxalurato y el correspondiente aminoácido aspartato.

Se sabe que algunas aminotrasferasas no son muy específicas ya que pueden reconocer diferentes sustratos como donadores de grupos amino. Por ello, en dicho estudio se examinó la especificidad de HpxJ sobre diferentes sustratos como: ureidoglicina, asparagina, aspartato y alanina. Los resultados mostraron que el sustrato preferido por la ureidoglicina aminotransferasa de *K. pneumoniae* es la ureidoglicina. La cristalización de HpxJ y el análisis de su estructura tridimensional pusieron de manifiesto como la conformación espacial del sitio activo de la proteína favorece su interacción con la ureidoglicina más que con las otras moléculas ensayadas.

### 5.3.2.3. Función de los genes *hpxFGHI*, asignada por análisis *in silico*

Por comparación de secuencia, se propone que los genes *hpxFGHI* de *K. pneumoniae* MGH78578 podrían codificar proteínas transportadoras tipo ABC, las cuales podrían estar implicadas en la entrada de alantoato al interior celular.

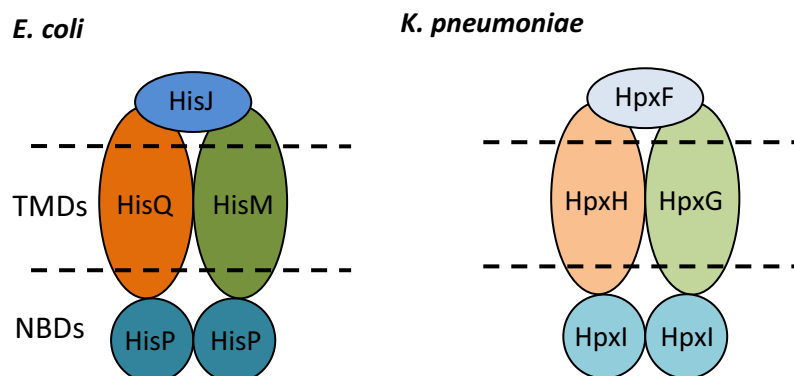
Los sistemas de transporte tipo ABC presentan una organización estructural similar entre sí, la cual comprende dos dominios transmembrana (TMDs) que forman el poro de translocación, dos dominios para unión de ATP (NBDs) y una proteína periplasmática que reconoce al sustrato. Se ha descrito que las proteínas pertenecientes a esta familia están implicadas en diversos procesos fisiológicos que van desde la incorporación de nutrientes, al exporte de toxinas en procariontes (Campbell *et al.* 2004). El soluto es capturado por la proteína periplasmática para pasar posteriormente por el poro de translocación formado por los dos TMDs, la hidrólisis del ATP catalizada por las NBDs proporciona energía para comenzar el transporte. La mayoría de los transportadores tipo ABC son específicos de sustrato, sin embargo, hay algunos que son capaces de transportar moléculas con estructuras diferentes, tal es el caso del transportador de histidina/lisina y arginina de algunas enterobacterias o en *Streptococcus mutans* el transportador de varios azúcares, denominado Msm (Tao *et al.* 1993).

HpxF comparte un 23% de similitud con la proteína periplasmática de unión a histidina de *E. coli* K-12 (HisJ), la secuencia de HpxG y HpxH presenta similitud con el transportador transmembrana de histidina (HisM), mientras que HpxI tiene un 54% de similitud con la proteína de unión a ATP del transportador de histidinas (HisP). Dado que HpxG y HpxH comparten identidad con la misma proteína, se analizó el grado de homología existente entre ambas, los resultados mostraron que HpxG y HpxH comparten un 32% de identidad. Una situación similar se observó al comparar la secuencia de HisM y HisQ de *E. coli*, el resultado fue un 32% de identidad. Es posible que de manera análoga a HisM-HisQ, en *K. pneumoniae* HpxG-HpxH sean las dos proteínas transmembrana que formen el poro de translocación para el transporte de alantoato (FIGURA 5.33.).

Además, los genes *hpxFGHI* comparten 95, 91, 97 y 98%, respectivamente, de similitud con genes propuestos en *K. oxytoca* implicados en el transporte de alantoato al interior celular.

Por tanto se ha identificado la presencia en *K. pneumoniae*, de sistemas separados que permiten internalizar a la célula diferentes compuestos como alantoato

(HpxFGHI), alantoína (HpxC) y purinas (HpxP), lo que sugiere que esta bacteria ha evolucionado para que cuando las condiciones de nitrógeno sean limitantes, pueda utilizar dichos compuestos extracelulares como fuente de nitrógeno y no únicamente los metabolitos generados de manera endógena como producto del catabolismo de purinas.



**FIGURA 5.33. Sistemas de transporte tipo ABC.** A la izquierda se esquematiza el transportador de la histidina en *E. coli*. A la derecha el transportador de alantoato propuesto para *K. pneumoniae* donde las proteínas transmembrana (TMDs) serían HpxH y HpxG, HpxI el dominio de unión a ATP (NBD). HpxF podría unirse al alantoato.

#### 5.3.2.4. Función del gen *hpxU*, asignada por análisis *in silico*

El análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de HpxU de *Klebsiella pneumoniae* MGH78578, reveló que esta proteína mantiene un 91% de similitud con el regulador transcripcional HpxU propuesto en *K. oxytoca* y un 34% con otro identificado en *Pseudomonas aeruginosa*.

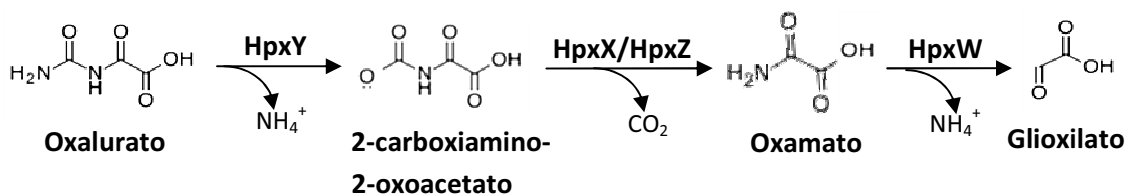
Dicho análisis de HpxU reveló además la presencia de dos dominios característicos de los reguladores RpiR. El dominio HTH en el extremo N-terminal responsable de la unión con el DNA y el dominio SIS en el extremo C-terminal que interacciona con la molécula efectora. El dominio SIS es común en muchas proteínas que están implicadas en la isomerización de azúcares o que reconocen azúcares como moléculas efectoras. Aunque en este tipo de proteínas el dominio SIS está muy conservado, generalmente el resto de su estructura no guarda similitud (Gourlay *et al.* 2010). Recientemente se han identificado en *Staphylococcus aureus* tres reguladores transcripcionales de la familia RpiR (RpiRA, RpiRB y RpiRC) que contienen el dominio SIS en su extremo C-terminal y están implicados en la regulación de la vía de las pentosas fosfato (Zhu *et al.* 2011).

El análisis experimental realizado con la proteína HpxU se presenta más adelante en este trabajo (RESULTADOS 5.3.4.). En este sentido, los ensayos de retardación de la movilidad electroforética de la proteína purificada, permitieron confirmar la función de HpxU como regulador transcripcional.

#### 5.3.2.5. Función de los genes *hpxWXYZ*, asignada por análisis *in silico*

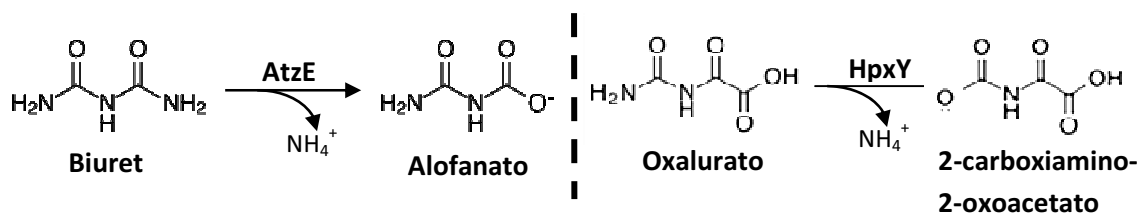
La aproximación de *Genome Walking* realizada en la cepa KC2653 (RESULTADOS 5.1.) confirmó la presencia de los genes *hpxWXYZ* en el locus comprendido entre

KPN\_01768 a KPN\_1771 en esta cepa. Los resultados obtenidos del análisis *in silico* proponen una función para estos genes en base a similitud con otras proteínas en diferentes especies bacterianas como *K. oxytoca*, *Erwinia caratovora* y *Yersinia pseudotuberculosis*. Las reacciones catalizadas por las proteínas codificadas por estos genes se esquematizan en la FIGURA 5.34.



**FIGURA 5.34. Posible vía de degradación de oxalurato en la cepa KC2653.** El esquema muestra en que parte de la vía de degradación podrían estar implicados los genes *hpxWXYZ* según el análisis *in silico* realizado. El oxalurato es producto de la reacción de transaminación ente la ureidoglicina y glioxilato llevada a cabo por HpxJ.

La secuencia de HpxY comparte un 85% de similitud con amidohidrolasas (pertenecientes a la familia AtzE) presentes en diferentes cepas de *K. oxytoca*, además de un 82% con una probable oxalurato amidohidrolasa identificada en *Enterobacter cloacae*. La primera proteína identificada de la familia AtzE, a la cual se debe su nombre, fue la biuret hidrolasa. AtzE es parte de la vía de degradación de la atrazina en *Pseudomonas* y cataliza la hidrólisis de biuret hasta alofanato y amonio (Martinez *et al.* 2001). Dado que la estructura del biuret (ureidofórmamida) es similar a la del oxalurato, es muy probable que la proteína HpxY hidrolice el oxalurato para formar amonio y el intermediario 2-carboxiamino-2-oxoacetato (FIGURA 5.35.)



**FIGURA 5.35. Función de HpxY propuesta por comparación con la biuret hidrolasa (AtzE).**

Respecto a HpxX y HpxZ, el análisis de su secuencia reveló que existen proteínas muy similares a ellas presentes en diferentes especies bacterianas, entre las que destacan *Erwinia* y *Klebsiella*, sin embargo, hasta el momento no se ha propuesto función para ninguna de ellas. En el caso de HpxZ, esta proteína presenta además un 80% de similitud con una proteína identificada en *Enterobacter asburiae* que se propone puede estar implicada en la utilización de oxalurato. Dicho lo anterior, es probable que la proteína HpxZ o incluso HpxX pudiera participar en la hidrólisis del intermediario 2-carboxiamino-2-oxoacetato, de la cual se obtendría CO<sub>2</sub> y oxamato.

HpxW, mostró un 83% de similitud con la probable oxamato amidohidrolasa propuesta en *K. oxytoca*, mientras que un 73 y 67% de identidad, respectivamente, con la gamma-glutamyltranspeptidasa de *Erwinia caratovora* y *Yersinia pseudotuberculosis*.

La gamma-glutamyltranspeptidasa cataliza la hidrólisis del enlace amida del glutatión y otros gamma-glutamyl compuestos generando aminoácidos o polipéptidos (Inoue *et al.* 2000). En base a lo anterior es probable que la proteína HpxW de *K. pneumoniae*, presente actividad oxamato amidohidrolasa ya que el oxamato contiene un grupo amida cuya hidrólisis libera amonio y glioxilato. Esta reacción no solo permitiría la obtención de nitrógeno, sino también proveería el glioxilato necesario para la reacción de transaminación efectuada por HpxJ, lo cual a su vez impediría que al utilizarse alantoato como fuente de nitrógeno se acumularan altas concentraciones de glioxilato, compuesto que es tóxico para la célula. Un mecanismo similar de detoxificación tiene lugar en el catabolismo de purinas en *Bacillus subtilis* (Ramazzina *et al.* 2010).

### 5.3.3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE *hpxFGHIJK-hpxU-hpxWXYZ*

Además de la caracterización funcional de los genes *hpxFGHIJK-hpxU-hpxWXYZ*, nos interesamos en la regulación de su expresión. En este sentido, procedimos a estudiar si la expresión de estos genes podría estar también sometida a una doble regulación tal como ya habíamos visto en el *cluster hpxSAB-hpxC-guaD*. La llevada a cabo por el regulador del propio sistema, que en este caso podría estar mediada por HpxU y la ejercida por el sistema de regulación global de nitrógeno.

#### 5.3.3.1. Efecto de la disponibilidad de nitrógeno

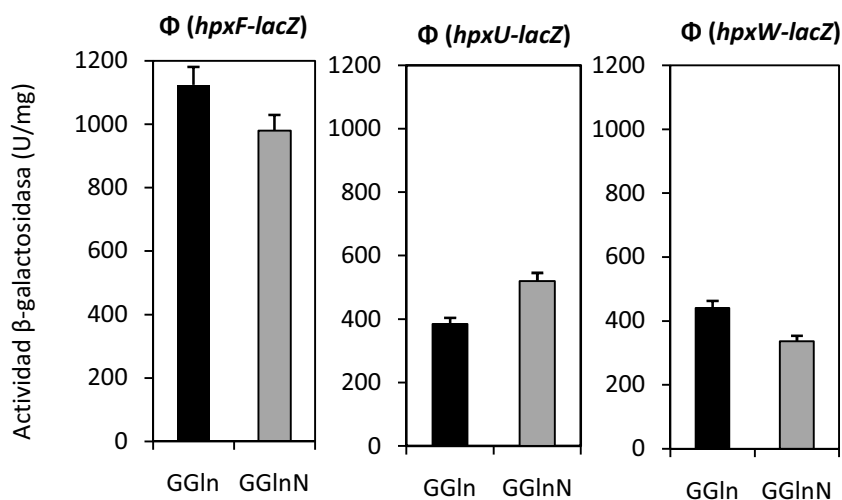
La implicación del sistema NTR en la regulación del *cluster hpxFGHIJK-hpxU-hpxWXYZ* se comprobó mediante el estudio de las fusiones transcripcionales de los promotores  $P_{hpxF}$ ,  $P_{hpxU}$  y  $P_{hpxW}$  al gen reportero *lacZ* las cuales fueron integradas como monocopia en el genoma de la cepa KC2653 por recombinación homóloga con el operón de la ribosa.

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar por PCR los tres promotores se detallan en el ANEXO 1. El fragmento utilizado para la obtención de las fusiones transcripcionales de los promotes de los genes *hpxU* y *hpxW* tenía un tamaño de 300bp y abarcaba desde la posición +105 a -194 respecto al inicio de transcripción del gen *hpxU* (ver FIGURA 5.45). El fragmento utilizado para el estudio de la región promotora del gen *hpxF* era de 320bp y abarcaba desde la posición +140 hasta la posición -180 respecto de su inicio de transcripción (ver FIGURA 5.42).

En una primera aproximación, la actividad  $\beta$ -galactosidasa se determinó a partir de cultivos de la cepa KC2653 conteniendo cada una de las fusiones transcripcionales  $\phi(hpxF-lacZ)$ ,  $\phi(hpxU-lacZ)$  y  $\phi(hpxW-lacZ)$  en medios de cultivo que contenían un exceso (GGlnN) o limitación (GGln) de nitrógeno.

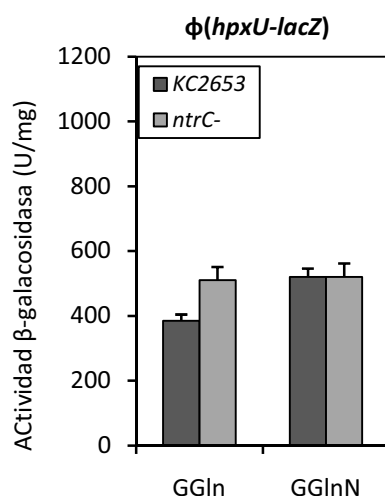
La actividad  $\beta$ -galactosidasa de las tres fusiones transcripcionales  $\phi(hpxF-lacZ)$ ,  $\phi(hpxW-lacZ)$  y  $\phi(hpxU-lacZ)$  en diferentes condiciones de disponibilidad de nitrógeno (GGln y GGlnN) se muestra en la FIGURA 5.36. La expresión de *hpxF* y *hpxW* presenta una ligera disminución en condiciones de alto amonio (GGlnN) respecto a la limitación de nitrógeno (GGln). Dado que en los promotores  $P_{hpxF}$  y  $P_{hpxW}$  no se identificaron secuencias de unión para la subunidad  $\sigma^{54}$  de la RNA polimerasa, estos resultados de actividad  $\beta$ -galactosidasa sugieren que la regulación transcripcional de estas unidades transcripcionales no está directamente controlada por la proteína NtrC.

En el caso del gen *hpxU* su nivel de expresión basal presenta un incremento de aproximadamente 25% en alto amonio, lo cual sugiere que podría estar regulado por la disponibilidad de nitrógeno. Cabe mencionar que la regulación transcripcional de los genes que codifican proteínas reguladoras suele presentar niveles bajos. La fusión transcripcional  $\phi(hpxU-lacZ)$  fue también analizada en el fondo genómico de un mutante *ntrC*. La mutación *ntrC::Tn5-131* fue introducida por transducción generalizada con el fago P1 desde la cepa KC2738 al fondo genético de cepa KC2653 conteniendo como monocopia esta fusión transcripcional.



**FIGURA 5.36.** Análisis de la expresión de *hpxF*, *hpxU* y *hpxW*, mediante fusiones transcripcionales, en condiciones de exceso o limitación de nitrógeno. Las fusiones transcripcionales se encuentran como monocopia en el genoma de la cepa KC2356. Los medios de cultivo GGlN y GGlN corresponden a limitación y exceso de nitrógeno respectivamente.

Los resultados de la FIGURA 5.37 muestran que el nivel de actividad  $\beta$ -galactosidasa en condiciones limitantes de nitrógeno (GGln) en el mutante *ntrC* incrementó respecto al registrado en la cepa parental, alcanzando un nivel de expresión similar al observado en condiciones de alto amonio (GGln).



**FIGURA 5.37.** Análisis de la expresión de *hpxU* en la cepa mutante *ntrC*. Las cepas KC2653 y la mutante KC2653 *ntrC* contienen la fusión transcripcional  $\phi(hpxU-lacZ)$  como monocopia en el genoma. Los medios de cultivo GGlN y GGlN corresponden a limitación y exceso de nitrógeno respectivamente.

Lo anterior sugiere la implicación del sistema NTR en la regulación transcripcional del gen *hpxU*. En el análisis previo del promotor  $P_{hpxU}$  se identificó una secuencia de unión para la subunidad  $\sigma^{54}$  (TABLA 5.3), sin embargo no conserva el elemento característico -12(GC). En este sentido cabe mencionar que en el regulón NifA de *Bradyrhizobium japonicum* se ha identificado el gen *fdxN* que es dependiente de la subunidad  $\sigma^{54}$  y en cuyo promotor los nucleótidos ubicados en la posición -12 son GA en lugar de los característicos GC (Hauser *et al.* 2007). Por otra parte, dado que además se encontró una secuencia de unión para la subunidad  $\sigma^{70}$  de la RNA polimerasa en el promotor  $P_{hpxU}$ , pudiera ser también que la regulación de la transcripción del gen *hpxU* estuviera mediada por la proteína NAC que actuaría como represor transcripcional de manera similiar a como se observó con el gen *hpxS*.

### 5.3.3.2. Efecto de la presencia de purinas o derivados en la expresión de las fusiones transcripcionales *hpxFGHIJK*, *hpxU* y *hpxWXYZ*

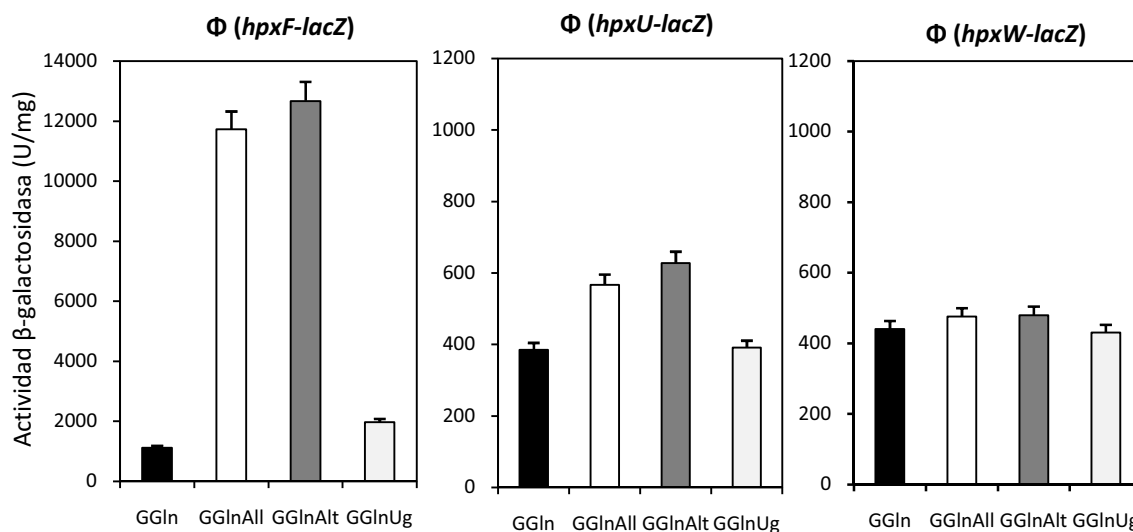
El operón *hpxFGHIJK* está implicado en la degradación de alantoato, por ello en un inicio propusimos que el alantoato o incluso la alantoina podrían ser necesarias para la expresión de esta y las otras dos unidades transcripcionales de este sistema. En el caso del operón *hpxWXYZ*, dado que podría ser el responsable de la degradación de oxalurato, realizamos además pruebas con metabolitos posteriores a la degradación de alantoato como el oxamato y oxalurato.

La expresión de las fusiones transcripcionales fue analizada en el fondo genómico de la cepa KC2653. La actividad  $\beta$ -galactosidasa fue determinada a partir de células provenientes de cultivos de esta cepa conteniendo las fusiones  $\phi(hpxF-lacZ)$ ,  $\phi(hpxU-lacZ)$  y  $\phi(hpxW-lacZ)$ , crecidos en medios con limitación de nitrógeno al cual se le añadió alantoina, alantoato o ureidoglicolato. Los resultados se presentan en la FIGURA 5.38.

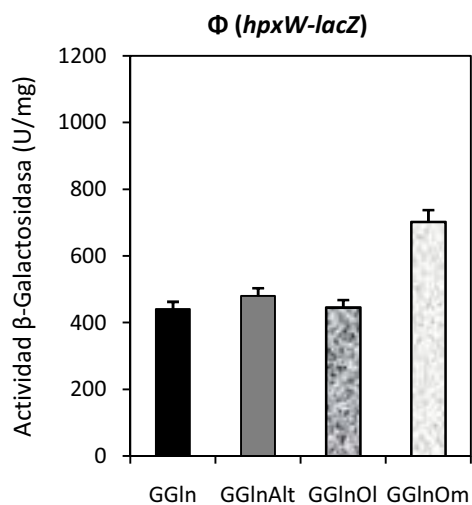
La expresión de la fusión transcripcional  $\phi(hpxF-lacZ)$  se ve incrementada por la presencia de alantoato o alantoina en el medio. La máxima inducción se alcanzó en condiciones de bajo amonio más alantoato (actividad  $\beta$ -galactosidasa de 12670 U/mg). Estos resultados sugieren que la expresión del operón *hpxFGHIJK* depende de la presencia de alantoato en el medio. La inducción observada en presencia de alantoina podría ser debida a que el producto de su metabolismo es alantoato. En el caso de la fusión  $\phi(hpxU-lacZ)$ , la actividad  $\beta$ -galactosidasa incrementó aproximadamente un 30% cuando el alantoato o alantoina están presentes en el medio. El gen *hpxU* si bien presenta una expresión basal elevada, el incremento observado puede ser debido a una regulación transcripcional en presencia de estos metabolitos.

La actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión  $\phi(hpxW-lacZ)$ , no fue afectada significativamente por la presencia de alantoina, ni de alantoato respecto a la registrada en limitación de nitrógeno. Ya que se propone que las proteínas codificadas en esta unidad transcripcional podrían estar implicadas en el metabolismo de oxalurato, producto de la reacción de transaminación catalizada por HpxJ, se analizó la expresión de esta fusión transcripcional utilizando oxalurato y oxamato como fuentes de nitrógeno. Los resultados presentados en la FIGURA 5.39 muestran que la expresión de  $\phi(hpxW-lacZ)$  cuando el oxamato está presente en el medio (GGInOm), es 1,5 veces mayor que aquella registrada en condiciones limitantes de nitrógeno (GGIn). El nivel de

expresión alcanzado cuando el oxalurato está presente en el medio es similar al observado en el resto de las condiciones de nitrógeno ensayadas.



**FIGURA 5.38.** Análisis de la expresión de *hpxF*, *hpxU* y *hpxW* en diferentes fuentes de nitrógeno. Las tres fusiones transcripcionales se encuentran en el fondo genómico KC2653. Los medios de cultivo GGlN, GGlNAll, GGlNAlt y GGlNUg corresponden a limitación de nitrógeno y limitación de nitrógeno más alantoina, alantoato y ureidoglicolato, respectivamente.



**FIGURA 5.39.** Análisis de la expresión de *hpxW* en diferentes fuentes de nitrógeno. La fusión transcripcional se encuentra en el fondo genómico KC2653. Los medios de cultivo GGlN, GGlNAlt, GGlNOI y GGlNOm corresponden a limitación de nitrógeno y limitación de nitrógeno más alantoato, oxalurato y oxamato, respectivamente.

A diferencia de los operones *hpxSAB* y *hpxFGHIJK*, no se encontró ningún sistema de transporte asociado al operón *hpxWXYZ* que pudiera estar implicado en la entrada de oxalurato u oxamato al medio intracelular. Por ello es posible que el oxamato y oxalurato presentes en el medio extracelular no entren de manera eficiente a la célula.



Los resultados sugieren que el alantoato es la molécula inductora de la expresión de las unidades transcripcionales *hpxFGHIJK* y *hpxU*. Respecto al operón *hpxWXYZ*, la inducción de su expresión se observó en presencia de oxamato pero no de alantoína, alantoato, ureidoglicolato u oxalurato.

#### 5.3.4. INTERACCIÓN DE HpxU CON LOS PROMOTORES DE *hpxFGHIJK-hpxU-hpxWXYZ*

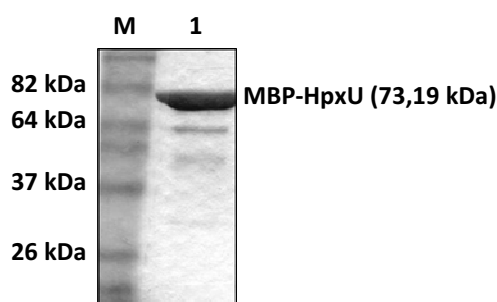
Dado que la proteína HpxU es un regulador transcripcional, es probable que se unió al promotor del operón *hpxFGHIJK* o a la región intergénica *hpxU-hpxW* controle la expresión de estos genes e incluso su propia transcripción. Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren además que el alantoato es la molécula inductora de este sistema génico.

Por lo anterior, nos planteamos llevar a cabo estudios de retardación de la movilidad electroforética en gel (EMSA) con la proteína purificada HpxU y con sondas correspondientes a la región promotora de los genes *hpxFGHIJK* y de la región intergénica *hpxU-hpxW*, con la finalidad de analizar la formación de determinados complejos DNA-proteína implicados en la regulación.

##### 5.3.4.1. Análisis de la unión de HpxU a las regiones promotoras de *hpxFGHIJK-hpxU-hpxWXYZ*

Para llevar a cabo estos estudios, en primer lugar se purificó la proteína HpxU fusionada a la proteína de unión a maltosa (MBP; METODOS 4.2.3.). Los oligonucleótidos utilizados para amplificar por PCR el fragmento que fue clonado en el vector pMALc2x, se detallan en el ANEXO 1.

Los estudios de retardación se realizaron con la proteína MBP-HpxU ya que no fue posible digerirla con el Factor Xa (FIGURA 5.40.). Se realizó previamente un ensayo con la proteína MBP para comprobar que no se unía a ninguna de las sondas utilizadas.



**FIGURA 5.40. SDS-PAGE de la proteína de fusión MBP-HpxU purificada.** Se indican los tamaños correspondientes a las bandas del marcador de peso molecular (carril M). Carril 1: productos de la digestión de MBP-HpxS llevada a cabo por Factor Xa.

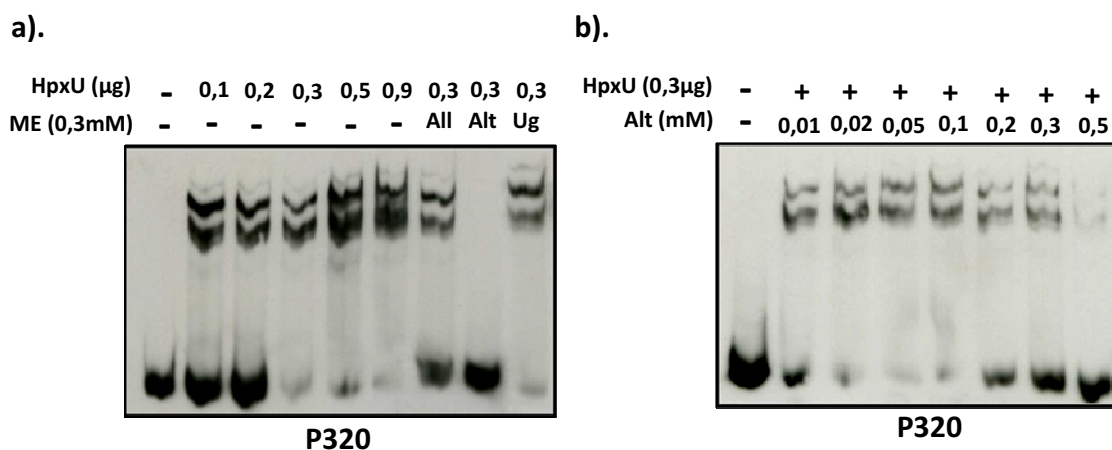
La unión de HpxU al promotor de *hpxFGHIJK* ( $P_{hpxF}$ ) y a la región intergénica de *hpxU-hpxW* ( $P_{hpxU-W}$ ) se analizó mediante EMSA, según lo descrito en METODOS 4.4.2. Las sondas utilizadas abarcaban diferentes zonas de  $P_{hpxU-W}$  y  $P_{hpxF}$ , las cuales una vez purificadas, fueron marcadas con digoxigenina.

### 5.3.4.1.1. Unión de HpxU a la región promotora de *hpxFGHIJK*

Con la proteína MBP-HpxU purificada y el fragmento de DNA que comprende la región promotora del operón *hpxFGHIJK* (sonda P320) se realizaron ensayos de retardación de la movilidad electroforética en gel en ausencia y presencia de diferentes metabolitos intermediarios de la vía de degradación de alantoína que pudiesen actuar como moléculas efectoras (ME).

Los resultados obtenidos con diferentes concentraciones de proteína (FIGURA 5.41.a.), confirman la unión del regulador HpxU al promotor de los genes *hpxFGHIJK*. Se analizó también el efecto de alantoína, alantoato y ureidoglicolato sobre esta unión. Los resultados muestran que la alantoína o el ureidoglicolato no tienen ningún efecto sobre la unión HpxU-P320, sin embargo, la presencia de alantoato provoca la disociación total del complejo de retardación formado.

A fin de confirmar que el alantoato era la molécula efectora, se analizó la unión de la proteína HpxU a la sonda P320 en presencia de diferentes concentraciones de este compuesto. Los resultados presentados en la FIGURA 5.41.b muestran que la disociación del complejo de retardación DNA-proteína es directamente proporcional a la cantidad de alantoato en la mezcla de reacción. En este sentido, es posible que la unión del alantoato al extremo C-terminal de la proteína HpxU, provoque un cambio conformacional que afecte su capacidad de unión al DNA.



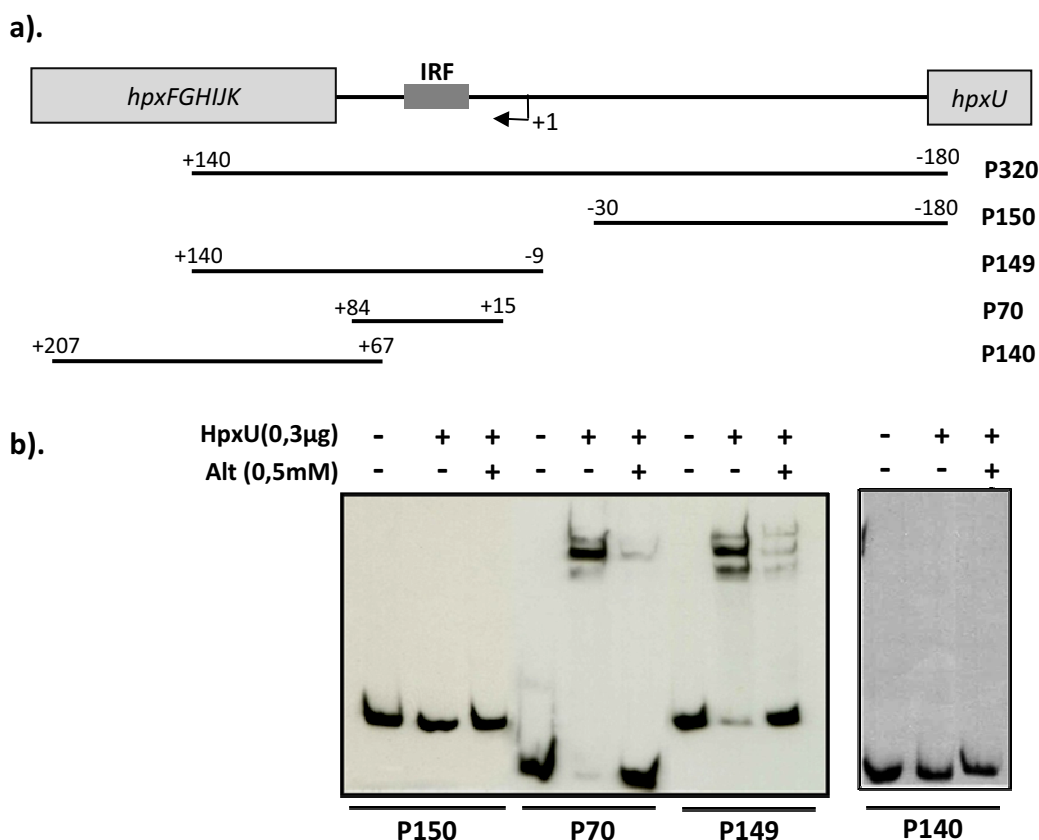
**FIGURA 5.41. Unión de HpxU al promotor  $P_{hpxF}$ .** EMSAs realizados con MBP-HpxU purificada y la sonda P320 marcada con digoxigenina, la cual contiene la región promotora  $P_{hpxF}$ . Las mezclas de reacción contenían un exceso de 500mM de poli(dI-dC), fueron incubadas a 30°C durante 15 minutos y sometidas posteriormente a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%.

Estos resultados concuerdan con el análisis de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión transcripcional  $\phi(hpxF-lacZ)$ , donde se observaba una clara inducción de la expresión del operón *hpxFGHIJK* en presencia de alantoato. Los datos no solo confirman que el alantoato es la molécula efectora de la expresión del operón *hpxFGHIJK*, sino que además indican que HpxU actúa como represor de la transcripción hasta que el alantoato está disponible en el medio.

A continuación nos planteamos identificar con mayor precisión la zona de unión del regulador HpxU al DNA. Con la proteína purificada y diferentes sondas de la región

promotora de *hpxFGHIJK* se llevaron a cabo ensayos retardación de la movilidad electroforética para acotar la región de unión de HpxU al promotor. Los fragmentos de DNA utilizados como sondas así como los resultados de los ensayos de retardación realizados se muestran en la FIGURA 5.42. La proteína HpxU forma un complejo de retardación con las sondas P70 y P149 pero no con P150 y P140. Lo cual indica que la región de unión de HpxU se encuentra entre las posiciones +84 y +15 respecto al inicio de transcripción identificado para el operón *hpxFGHIJK*.

Una vez acotada la región de unión de HpxU al promotor de *hpxFGHIJK*, un análisis *in silico* más detallado de esta zona, reveló la presencia de un *inverted repeat* (5'-TGAAACAAAAGATTCTTTGAATCTGTTTTGCA-3') al cual denominamos IRF. Esta secuencia palindrómica se localiza entre las posiciones +30 y +67 con respecto del inicio de transcripción de este operón y podría ser el sitio de unión de HpxU.



**FIGURA 5.42. Unión de HpxU a fragmentos del promotor  $P_{hpxF}$ .** a). Diagrama de las diferentes sondas utilizadas. Sus posiciones se indican respecto al +1 de *hpxF*. b). EMSAs realizados con MBP-HpxU purificada y sondas correspondientes a fragmentos de la región promotora  $P_{hpxF}$ . Las mezclas de reacción contenían un exceso de 500mM de poli(dI-dC), fueron incubadas a 30°C durante 15 minutos y sometidas posteriormente a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%.

A fin de elucidar si la proteína HpxU se unía a ambos extremos de IRF, se construyeron dos sondas más, P92 y P249 (FIGURA 5.43.a), donde cada una de ellas contenía únicamente uno de los brazos del *inverted repeat*. Los resultados que se presentan en la FIGURA 5.43.b indican que HpxU se une a cada uno de los brazos de la secuencia palindrómica identificada (IRF) y el complejo de retardación es disociado en presencia de alantoato.



miembros de la familia RpiR han sido del orden de 14bp, analizamos la posible presencia de palíndromos dentro de IRF. Así fue posible identificar dos *inverted repeats* en tándem, uno en cada brazo de IRF, el primero formado por TGAA-N<sub>8</sub>-TTCT y el segundo por TGAA-N<sub>8</sub>-TGCA. Cabe resaltar que ambos palíndromos tendrían conservados una secuencia TGAA que estaría situada a 8 nucleótidos de una secuencia TTC o TGC. Por todo ello la secuencia consenso de unión reconocida por HpxU puede ser GAA-N<sub>8</sub>-Tt/gC.

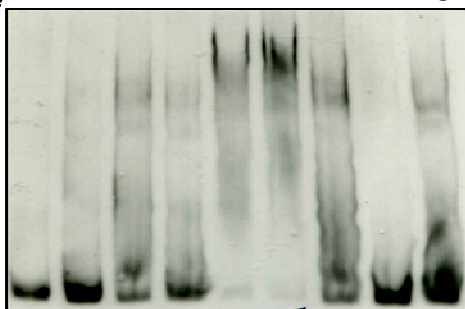
#### 5.3.4.1.2. Unión de HpxU a la región intergénica *hpxU-hpxW*

Una vez confirmada la regulación del operón *hpxFGHIJK* por parte de HpxU, nos planteamos estudiar si la proteína reguladora también se unía a la región intergénica *hpxU-hpxW* de tal forma que pudiera controlar la expresión del operón *hpxWXYZ* o autoregular su propia expresión.

La primera aproximación, fue realizar un estudio mediante EMSA de la unión de la proteína de fusión MBP-HpxU a un fragmento correspondiente a la región intergénica *hpxU-hpxW* (P300). Tal como en otros experimentos similares, el fragmento fue amplificado por PCR y se marcó con digoxigenina. Así mismo, dados los resultados anteriores, se utilizó el alantoato como posible molécula efectora.

Los resultados de la FIGURA 5.44 muestran que HpxU se une a la región intergénica *hpxU-hpxW* (sonda P300) y que el complejo de retardación formado se disocia cuando el alantoato está presente en el medio, no siendo así con alantoina o ureidoglicolato. Para acotar la zona de unión del regulador HpxU a la región intergénica *hpxU-hpxW* se diseñaron diferentes sondas correspondientes a deleciones del fragmento utilizado en la sonda P300. Paralelamente se analizó la secuencia de dicha región en busca de palíndromos que pudieran estar implicados en la unión de la proteína al DNA.

HpxU (µg)	-	0,2	0,3	0,5	0,9	1,2	0,5	0,5	0,5
ME (0,3 mM)	-	-	-	-	-	-	All	Alt	Ug

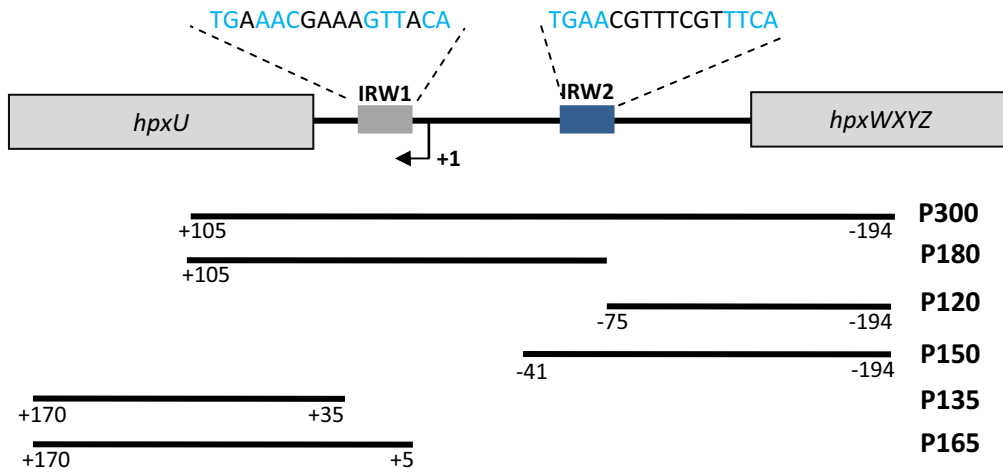


P300

**FIGURA 5.44. Unión de HpxU a P<sub>hpxU-W</sub> en presencia de posibles moléculas efectoras.** EMSAs realizados con MBP-HpxU purificada y la sonda P300 marcada con digoxigenina, la cual contiene la región intergénica *hpxU-hpxW*. ME: posibles moléculas efectoras, All: alantoina, Alt: alantoato y Ug: ureidoglicolato. Las mezclas de reacción contenían un exceso de 500mM de poli(dI-dC), fueron incubadas a 30°C durante 15 minutos y sometidas a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%.

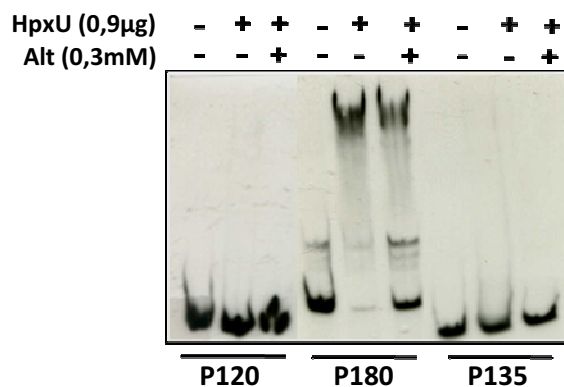
En este análisis más detallado de la secuencia se identificaron dos *inverted repeats* separados entre sí por 84bp. El primero de ellos, al cual hemos denominado

IRW1 (5'-TGAAACGAAAGTTACA-3'), se encuentra entre las posiciones +26 y +41 respecto del inicio de transcripción del gen *hpxU*. El segundo *inverted repeat* denominado IRW2 (5'-TGAACGTTTCGTTTCA-3') está localizado entre las posiciones -57 y -73 respecto al inicio de transcripción de *hpxU* y a 56bp del inicio de traducción del gen *hpxW* (FIGURA 5.45.).



**FIGURA 5.45. Diagrama de la región intergénica *hpxU-hpxW* y las sondas construidas.** Las posiciones se indican respecto al inicio de transcripción del gen *hpxU*. IRW1 e IRW2 corresponden a las dos posibles secuencias de unión de HpxU identificadas en esta región. En azul se indican los nucleótidos que forman el *inverted repeat*.

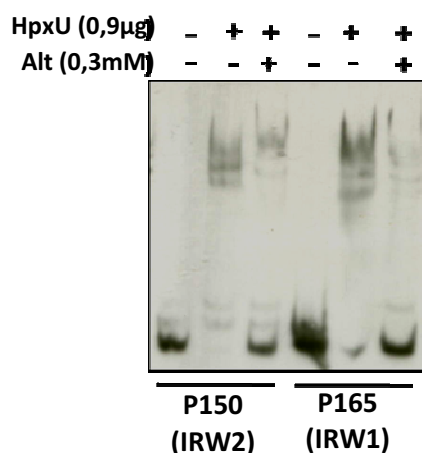
Lo primero que nos planteamos fue saber si la región en la que habían sido identificadas IRW1 e IRW2 estaba implicada en la unión de HpxU al DNA. Para ello realizamos EMSAs con las sondas P180, P120 y P135. Los resultados presentados en la FIGURA 5.46 muestran que HpxU se une a la sonda P180, que contiene las dos secuencias palindrómicas IRW2 e IRW1, pero no a las sondas P120 y P135 que no contienen ninguno de los dos *inverted repeats*. Cabe mencionar que la posición de las cajas de unión de HpxU con respecto al inicio de transcripción de los genes controlados es compatible con la acción de un represor.



**FIGURA 5.46. Unión de HpxU a diferentes sondas de *hpxU-hpxW*.** EMSAs realizados con MBP-HpxU purificada y diferentes sondas de la región intergénica *hpxU-hpxW*, en presencia y ausencia de alantoato. Las mezclas de reacción contenían un exceso de 500mM de poli(di-dC), fueron incubadas a 30°C durante 15 minutos y sometidas a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%.

Una vez confirmado que la región que contiene los *inverted repeats* IRW1 e IRW2 está involucrada en la unión del regulador al DNA, había que determinar si ambas secuencias eran reconocidas como dianas de unión o no. Para ello se utilizaron sondas que solo contenían uno de los palíndromos identificados, la sonda P150 que contiene únicamente IRW2 y la sonda P165 que contiene IRW1.

Los resultados de la FIGURA 5.47 muestran que tanto la sonda P150 (IRW2) como la sonda P165 (IRW1) forman un complejo de retardación proteína-DNA que es disociado en presencia de alantoato. De esta forma se confirma la participación de ambos *inverted repeats* en la unión de HpxU a la región intergénica *hpxU-hpxW*. La unión del regulador HpxU a esta zona es anulada cuando la molécula efectora está presente en el medio, lo cual sugiere que HpxU podría reprimir su propia transcripción y quizá regular también la expresión del operón *hpxWXYZ*.



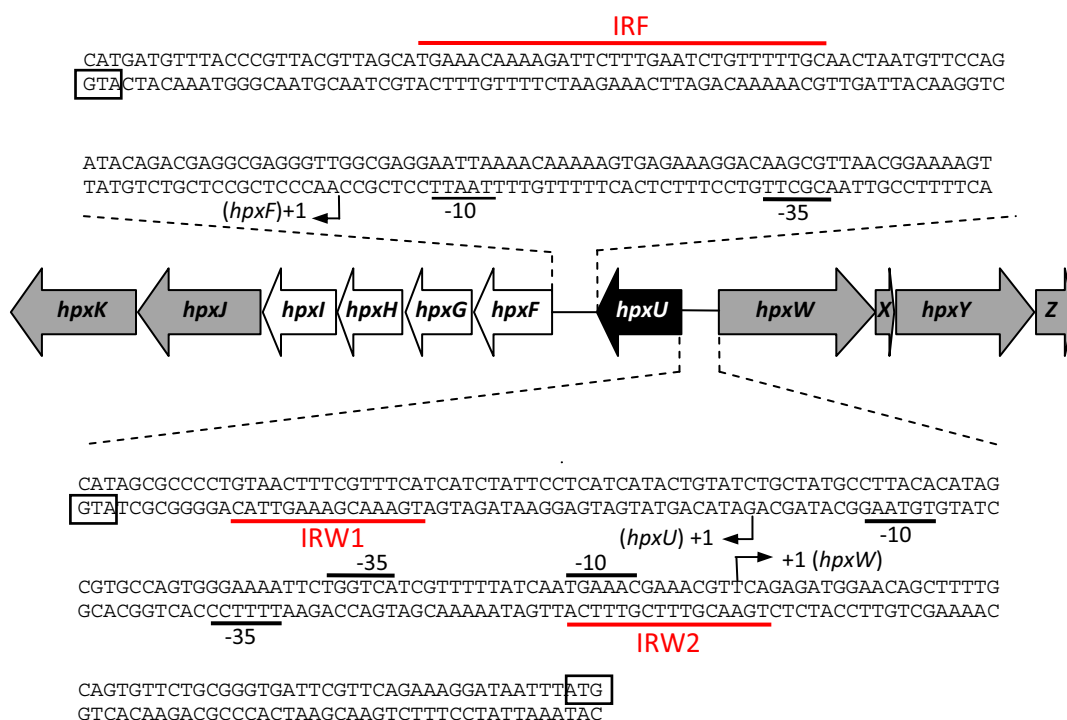
**FIGURA 5.47. Unión de HpxU a IRW2 e IRW1.** EMSAs realizados con MBP-HpxU purificada y diferentes sondas de la región intergénica *hpxU-hpxW*, en presencia y ausencia de alantoato. Las mezclas de reacción contenían un exceso de 500mM de poli(dI-dC), fueron incubadas a 30°C durante 15 minutos y sometidas posteriormente a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%.

Estos resultados podrían sugerir que el ligero incremento de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión transcripcional  $\phi(hpxU-lacZ)$  observado en la FIGURA 5.38 cuando el alantoato está presente en el medio de cultivo, se deba a que esta molécula elimina la autorepresión llevada a cabo por HpxU. En el caso de la fusión transcripcional  $\phi(hpxW-lacZ)$ , el hecho de no observar variación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en presencia de alantoato o alantoina (FIGURA 5.38), sugiere que puede ser necesaria la presencia adicional de otra molécula o proteína aun no identificada para inducir la expresión del operón *hpxWXYZ*.

Una de las características en común observada entre los pocos reguladores estudiados de la familia RpiR, es que su unión al DNA parece efectuarse en zonas ricas en AT. El regulador RpiR de *E. coli* se une a las regiones promotoras de los genes *rpiB* y *rpiR*, las cuales tienen como característica común poseer cada una de ellas un *inverted repeat* y varios *direct repeats* ricos en AT. En su estudio Sorensen and Hove-Jensen 1996, sugieren que dichas características de los promotores podrían ser importantes para la unión al DNA. Por otra parte el regulador MurR de *E. coli*, también de la familia RpiR, forma un multímero que se une a dos *inverted repeats* adyacentes entre sí, de

esta forma reprime la expresión de la N-acetilmurámico esterasa e interfiere con su propia transcripción (Jaeger and Mayer 2008). Es probable que la proteína HpxU se comporte de una manera similar y pueda formar un multímero al unirse a las cajas IRW1 e IRW2, de esta forma podría controlar su propia transcripción y la del operón *hpxWXYZ*. En este sentido, la distancia existente de 84bp entre IRW1 e IRW2 correspondería a 8 vueltas de hélice del DNA, de tal forma que la interacción entre las moléculas de HpxU podría estar facilitada por la formación de un bucle de DNA.

Una vez identificadas las secuencias de unión del regulador HpxU tanto en el promotor del operón *hpxFGHIJK* como de la región intergénica *hpxU-hpxW* (FIGURA 5.48), realizamos un análisis comparativo a fin de identificar elementos comunes entre estas secuencias que pudieran estar implicados en el reconocimiento de HpxU al DNA.



**FIGURA 5.48. Secuencias de unión de la proteína HpxU al promotor del operón *hpxGHIJK* y a la región intergénica *hpxU-hpxW*. Los *inverted repeats* a los que se une la proteína HpxU se indican en rojo.**

El alineamiento de los dos palíndromos en tandem identificados en el promotor del operón *hpxFGHIJK* (IRF) con los otros dos *inverted repeats* de la región intergénica *hpxU-hpxW* (IRW1-IRW2), reveló similitud entre ellos permitiendo establecer una secuencia consenso de unión al DNA para la proteína HpxU de la cepa KC2653. Los cuatro *inverted repeats* son muy ricos en AT y todos tienen al inicio la secuencia TGAA seguida de ocho nucleótidos después de los cuales está presente otra secuencia conservada en tres de ellos TtCA (FIGURA 5.49.).

En base al alineamiento de los palíndromos proponemos la secuencia consenso 5'-TGAA-N<sub>8</sub>-TtCA-3' para HpxU. Esta secuencia propuesta es muy similar a la reconocida por la proteína lolR, otro miembro de la familia RpiR. lolR regula varios genes implicados en el metabolismo de inositol en *Sinorhizobium melioidi*, la comparación de las secuencias de unión identificadas permitió establecer como



consenso la secuencia 5'-GGAA-N<sub>6</sub>-TTCC-3' (Kohler *et al.* 2011). La comparación de las secuencias consenso establecidas para IolR y HpxU permitió identificar algunos elementos en común que podrían ser importantes para la unión al DNA de reguladores de la familia RpiR. En ambos casos se conserva la secuencia GAA y después de un espacio de seis u ocho nucleótidos hay otra secuencia conservada TTC. En el caso del regulador HpxU se observó un elemento adicional muy conservado entre IRF, IRW1 e IRW2 que es la presencia de una T al inicio del palíndromo y una A al final, este hecho podría estar asociado a la especificidad de HpxU para unirse a estos sitios en el genoma de la cepa KC2653.

<b>Consenso:</b>	<b>TGAA</b>	<b>-N<sub>6</sub>-</b>	<b>TtCA</b>
<b>IRF:</b>	<b>TGAA</b> ACAAAAGATTCT		
	TGAATCTGTTTTTGCA		
<b>IRW:</b>	<b>TGAA</b> ACGAAAGTTACA		
<b>IRW2:</b>	<b>TGAACG</b> TTTTCGTTTCA		

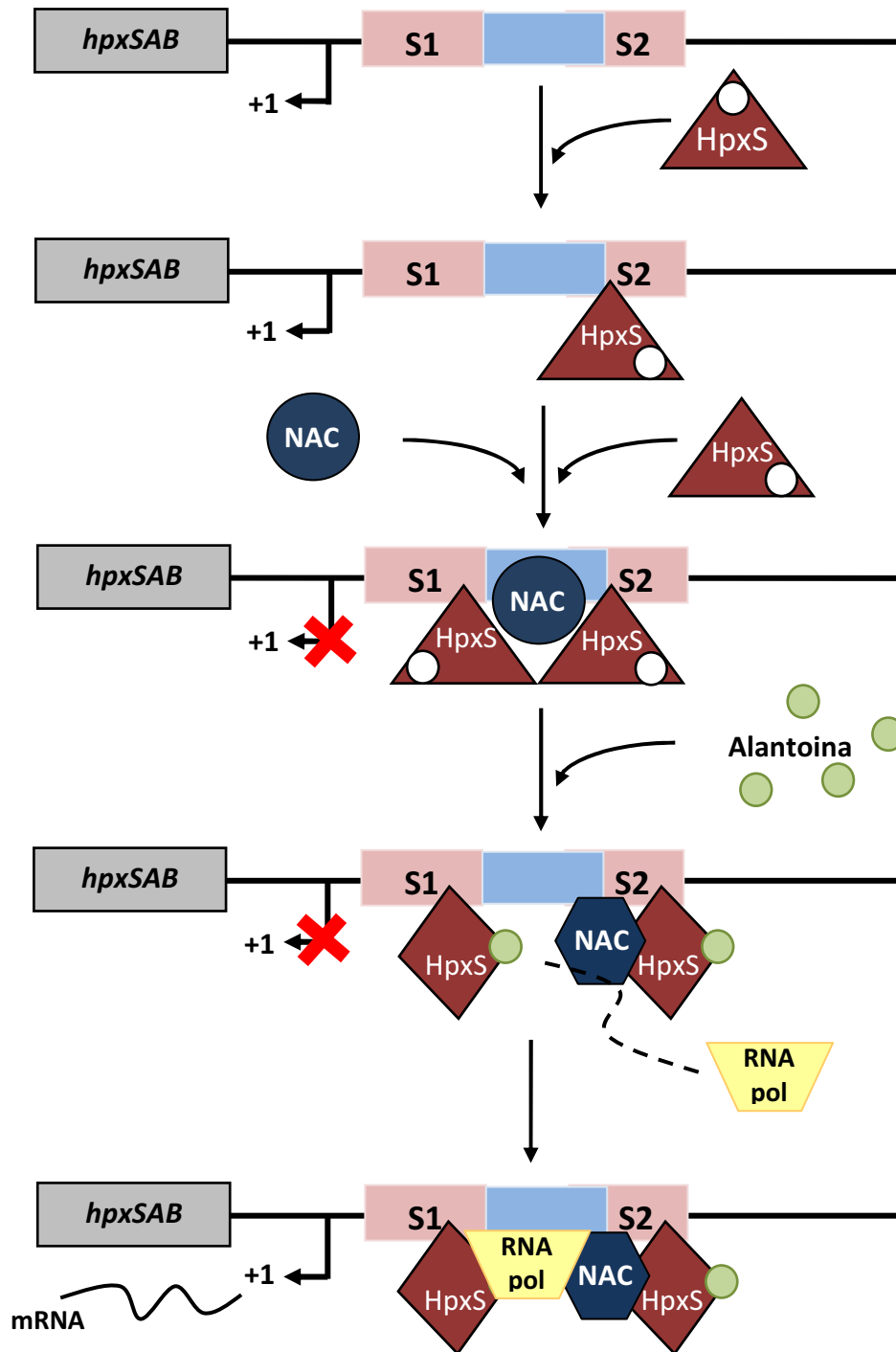
**FIGURA 5.49.** Secuencia consenso de unión al DNA para HpxU de la cepa KC2653. En negrita se indican los nucleótidos que se conservan en al menos tres de las secuencias.

#### 5.4. MODELO DE REGULACIÓN DE LOS SISTEMAS *hpxSAB-hpxC-guaD* Y *hpxFGHIJK-hpxU-hpxWXYZ*

Considerando el conjunto de resultados obtenidos en los estudios de regulación del sistema *hpxSAB-hpxC-guaD* se ha demostrado que el regulador transcripcional HpxS tiene una función dual como activador y como represor de la transcripción del operón *hpxSAB* dependiendo de la presencia o no de alantoina y NAC en el medio. Cabe recordar que la expresión de los otros genes de este sistema no depende del regulador HpxS. La expresión del gen *hpxC* es constitutiva mientras que la del gen *guaD* depende de la disponibilidad de nitrógeno en el medio.

A partir de estos resultados se puede construir un modelo de regulación del operón *hpxSAB* por parte de HpxS (FIGURA 5.50).

En condiciones limitantes de nitrógeno y ausencia de alantoina en el medio, la proteína HpxS se une tanto a S1 como a S2. Dado que HpxS presenta diferente afinidad para cada uno de los operadores, la unión de la proteína a S2 (el sitio por el que presenta mayor afinidad de unión) podría facilitar la unión a S1 al incrementar la concentración local de proteína (FIGURA 5.23.a). De esta manera, la interacción lado a lado de las proteínas unidas a sitios contiguos en el DNA provocaría la represión de la transcripción del operón *hpxSAB*. Adicionalmente, el análisis de la fusión transcripcional  $\phi(hpxSAB-lacZ)$  en el mutante HpxS (cepa KB17K) mostró que en condiciones limitantes de nitrógeno NAC es expresada y reprime la transcripción del operón *hpxSAB* (FIGURA 5.16). Los ensayos de EMSA permitieron identificar una secuencia de unión al DNA para NAC localizada a un lado de S1 y solapando parcialmente a S2 lo cual hace probable que exista una interacción entre NAC y HpxS unida a S2.



**FIGURA 5.50. Modelo propuesto para la regulación de la expresión del operón *hpxSAB* por la proteína HpxS.** El recuadro azul indica el sitio al que se unen NAC y la RNA polimerasa (RNA pol). La línea punteada indica que el cambio conformacional de NAC favorece la interacción con la RNA polimerasa mediando su unión al DNA.

Cuando la alantoina está presente en el medio, la unión de esta molécula efectora al dominio C-terminal de HpxS unida a S2 podría ocasionar un cambio conformacional que modificaría la función del regulador (FIGURA 5.23.b). Es probable que esta nueva conformación favorezca el contacto entre HpxS unida a S2 y NAC eliminando la interacción entre las moléculas de HpxS unidas a S1 y S2. Por otra parte los resultados de los EMSA realizados en presencia de NAC y RNA polimerasa no solo

mostraron que ambas proteínas se unen a la misma región del DNA si no que *in vitro* NAC tiene un efecto positivo en la unión de la RNA polimerasa al promotor de *hpxSAB* (FIGURA 5.26). En este contexto es probable que el cambio conformacional inducido a HpxS unida a S2 podría modificar la conformación de NAC y su interacción con la RNA polimerasa permitiendo así la formación de un complejo de transcripción abierto y la activación de la expresión del operón *hpxSAB*.

Cuando se induce la expresión del operón *hpxSAB*, se transcribe el gen *hpxB* el cual codifica una alantoinasa responsable de la degradación de alantoína a alantoato. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el alantoato producido, es la molécula efectora del sistema *hpxFGHIJK-hpxU-hpxWXYZ*. El alantoato también puede ser obtenido del medio extracelular cuando no hay una mejor fuente de nitrógeno disponible.

El conjunto de resultados obtenidos de los estudios de regulación del sistema *hpxFGHIJK-hpxU-hpxWXYZ* han demostrado que HpxU es un regulador transcripcional que reprime su propia transcripción y la del operón *hpxFGHIJK* en ausencia de alantoato. A partir de estos resultados se ha construido un modelo de regulación de este sistema (FIGURA 5.51).

La expresión del regulador HpxU está influenciada por la disponibilidad de nitrógeno en el medio y en ausencia de alantoato se une a los palíndromos IRW1, IRW2 e IRF, este último a su vez está formado por dos palíndromos en tándem. La unión de HpxU a IRF reprime la transcripción del operón *hpxFGHIJK* por la interacción lado a lado entre las proteínas unidas a los dos palíndromos en tándem identificados. Los estudios de EMSA muestran mayor afinidad de HpxU por IRF respecto a IRW1 e IRW2 lo cual sugiere que cuando HpxU es expresada reprime primero la transcripción del operón *hpxFGHIJK*, una vez que el sitio IRF ha sido ocupado el regulador podría unirse a IRW1 e IRW2 para reprimir su propia transcripción.

Las secuencias IRW1 e IRW2 están localizadas en la región intergénica *hpxU-hpxW* y separadas entre sí por 84bp, en este sentido es probable que la interacción de las moléculas de HpxU unidas a estos palíndromos forme un bucle del DNA que reprimiría la transcripción del gen *hpxU* y podría interferir con la del operón *hpxWXYZ*. Para la formación de este bucle podría participar alguna proteína estructural como IHF, HU ó FIS. Dado que el análisis de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión transcripcional  $\phi(hpxW-lacZ)$  no mostró que el alantoato activara su expresión, podría ser que fuera necesaria la presencia adicional de otra molécula o proteína hasta ahora no identificada que indujera la transcripción del operón *hpxWXYZ*.

Cuando el alantoato está presente en el medio, la unión de esta molécula efectora al extremo C-terminal de HpxU podría provocar un cambio conformacional que eliminaría las interacciones entre las moléculas de esta proteína unidas en los diferentes palíndromos, además los estudios de EMSA realizados muestran que la presencia de alantoato elimina la unión de HpxU al DNA. De esta forma HpxU dejaría de reprimir su propia transcripción y se induce la expresión del operón *hpxFGHIJK*. Mientras el alantoato esté presente en el medio, el regulador HpxU no podrá unirse al DNA para reprimir la transcripción.

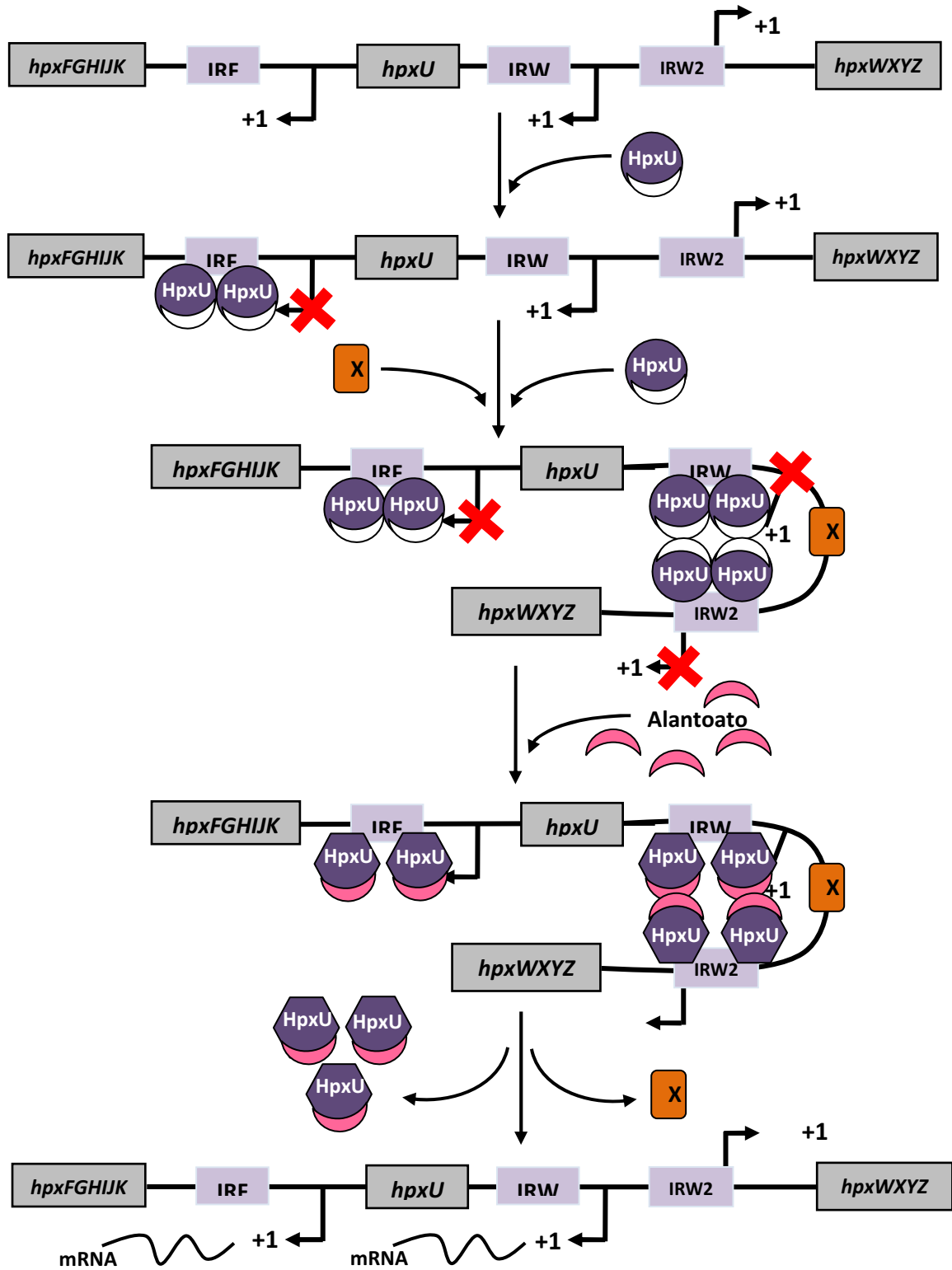


FIGURA 5.51 Modelo propuesto para la regulación de la expresión de las unidades transcripcionales *hpxFGHIJK*, *hpxU* por la proteína HpxU. El recuadro naranja indica una proteína que podría facilitar la formación del bucle del DNA.



## **6. CONCLUSIONES**



## 6. CONCLUSIONES

1. Se han identificado en el genoma de la cepa KC2653 los sistemas génicos *hpxSAB-hpxC-guaD* y *hpxFGHIJK-hpxU-hpxWXYZ* implicados en el metabolismo de alantoina como fuente de nitrógeno.
2. El sistema génico *hpxSAB-hpxC-guaD* está implicado en la degradación de alantoina a alantoato. Se compone de tres unidades transcripcionales: *hpxSAB*, *hpxC* y *guaD*, las dos primeras se transcriben a partir de promotores  $\sigma^{70}$  mientras que el gen *guaD* presenta un promotor dependiente de  $\sigma^{54}$ .
3. El gen *guaD* codifica una guanina desaminasa que presenta especificidad de sustrato para guanina con parámetros cinéticos  $K_m = 8,9\mu\text{M}$  y  $V_{\text{max}} = 1,13 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ .
4. El gen *hpxB* codifica una alantoinasa independiente de metales que cataliza la transformación de S-alantoina en alantoato y presenta una actividad específica de 390 U/mg.
5. El análisis *in silico* de los genes *hpxA* y *hpxC* sugiere que estos genes codifican una alantoina racemasa y una alantoina permeasa respectivamente.
6. El gen *HpxS* codifica una proteína reguladora de la familia GntR. *HpxS* actúa como represor del operón *hpxSAB* en ausencia de alantoina y como activador en presencia de esta molécula.
7. Las unidades transcripcionales *hpxSAB* y *guaD* están reguladas por disponibilidad de nitrógeno mediante las proteínas NAC y NtrC respectivamente, mientras que la expresión del gen *hpxC* es constitutiva.
8. La máxima expresión del operón *hpxSAB* requiere de la presencia de las proteínas *HpxS* y NAC así como de alantoina.
9. El sistema *hpxFGHIJK-hpxU-hpxWXYZ* está implicado en el metabolismo posterior de alantoato como fuente de nitrógeno. Se compone de tres unidades transcripcionales: *hpxFGHIJK*, *hpxWXYZ*, que se transcriben a partir de promotores  $\sigma^{70}$ , y *hpxU* que podría transcribirse a partir de un promotor  $\sigma^{54}$ .
10. El gen *hpxK* codifica una alantoato amidohidrolasa dependiente de manganeso que cataliza la transformación de alantoato a ureidoglicina. Se han calculado sus parámetros cinéticos  $K_m = 0,11\text{mM}$  y  $V_{\text{max}} = 4 \times 10^{-2} \text{ U/mg}$ . Su pH óptimo es 8,5.
11. El análisis *in silico* sugiere que los genes *hpxFGHI* están implicados en la entrada de alantoato a la célula, el gen *hpxJ* cataliza el paso de ureidoglicina a oxalurato por transaminación y los genes *hpxWXYZ* estarían implicados en el posterior metabolismo de oxalurato.
12. El gen *hpxU* codifica un regulador transcripcional de la familia RpiR que reconoce TGAA-N<sub>8</sub>-TtCA como secuencia consenso de unión al DNA. *HpxU* reprime su propia transcripción y la del operón *hpxFGHIJK* en ausencia de alantoato.



13. La expresión del operón *hpxWXYZ* es independiente de la disponibilidad de nitrógeno así como de la presencia de alantoato. Su máxima inducción se produce en presencia de oxamato, si bien no se descarta la participación adicional de otra molécula o proteína aún no identificada para la inducción de este operón.

## 7. REFERENCIAS



**A**

- Agarwal, R., S. K. Burley and S. Swaminathan (2007). Structural analysis of a ternary complex of allantoate amidohydrolase from *Escherichia coli* reveals its mechanics. *Journal of Molecular Biology* **368**(2): 450-463.
- Aguilera, L., E. Campos, R. Giménez, J. Badía, J. Aguilar and L. Baldoma (2008). Dual role of LldR in regulation of the lldPRD operon, involved in L-Lactate metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **190**(8): 2997-3005.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**(17): 3389-3402.
- Allison, S. L. and A. T. Phillips (1990). Nucleotide sequence of the gene encoding the repressor for the histidine utilization genes of *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology* **172**(9): 5470-5476.
- Arnheim, N. and H. Erlich (1992). Polymerase Chain Reaction Strategy. *Annual Review of Biochemistry* **61**(1): 131-156.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J.A. Smith, K. Strulb (1991). *Current protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons.
- Azam, T. A. and A. Ishihama (1999). Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **274**(46): 33105-33113.

**B**

- Baldauf, S. L., M. A. Cardani and R. A. Bender (1988). Regulation of the galactose-inducible lac operon and the histidine utilization operons in pts mutants of *Klebsiella aerogenes*. *Journal of Bacteriology* **170**(12): 5588-5593.
- Barrios, H., B. Valderrama and E. Morett (1999). Compilation and analysis of  $\sigma^{54}$ -dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Research* **27**(22): 4305-4313.
- Bateman, A., E. Birney, L. Cerruti, R. Durbin, L. Etwiller, Sean R. Eddy, S. Griffiths-Jones, K. L. Howe, M. Marshall and E. L. L. Sonnhammer (2002). The Pfam Protein Families Database. *Nucleic Acids Research* **30**(1): 276-280.
- Bender, R. A. (1991). The role of the NAC protein in the nitrogen regulation of *Klebsiella aerogenes*. *Molecular Microbiology* **5**(11): 2575-2580.
- Bender, R. A. (2010). A NAC for regulating metabolism: the Nitrogen Assimilation Control Protein (NAC) from *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* **192**(19): 4801-4811.
- Bender, R. A. and B. Friedrich (1990). Regulation of assimilatory nitrate reductase formation in *Klebsiella aerogenes* W70. *Journal of Bacteriology* **172**(12): 7256-7259.
- Bender, R. A., K. A. Janssen, A. D. Resnick, M. Blumenberg, F. Foor and B. Magasanik (1977). Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. *Journal of Bacteriology* **129**(2): 1001-1009.
- Bender, R. A., P. M. Snyder, R. Bueno, M. Quinto and B. Magasanik (1983). Nitrogen regulation system of *Klebsiella aerogenes*: the nac gene. *Journal of Bacteriology* **156**(1): 444-446.
- Bertani, G. (2004). Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *Journal of Bacteriology* **186**(3): 595-600.
- Best, E. A. and R. A. Bender (1990). Cloning of the *Klebsiella aerogenes* nac gene, which encodes a factor required for nitrogen regulation of the histidine utilization (hut) operons in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* **172**(12): 7043-7048.
- Boronat, A. and J. Aguilar (1979). Rhamnose-induced propanediol oxidoreductase in *Escherichia coli*: purification, properties, and comparison with the fucose-induced enzyme. *Journal of Bacteriology* **140**(2): 320-326.
- Brisse, S. and J. Verhoef (2001). Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, gyrA and

- parC* genes sequencing and automated ribotyping. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **51**(3): 915-924.
- Browning, D. F. and S. J. W. Busby (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. Nat Rev Micro **2**(1): 57-65.
- Browning, D. F., J. A. Cole and S. J. W. Busby (2008). Regulation by nucleoid-associated proteins at the *Escherichia coli nir* operon promoter. Journal of Bacteriology **190**(21): 7258-7267.
- Buckholz, R. G. and T. G. Cooper (1991). The allantoinase (DAL1) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast **7**(9): 913-923.

## C

- Campbell, J. D., S. S. Deol, F. M. Ashcroft, I. D. Kerr and M. S. P. Sansom (2004). Nucleotide-dependent conformational changes in HisP: molecular dynamics simulations of an ABC transporter nucleotide-binding domain. Biophysical journal **87**(6): 3703-3715.
- Carmona, M., F. Claverie-Martin and B. Magasanik (1997). DNA bending and the initiation of transcription at  $\sigma^{54}$ -dependent bacterial promoters. Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(18): 9568-9572.
- Casadesús, J. and D. Low (2006). Epigenetic gene regulation in the bacterial world. Microbiology and Molecular Biology Reviews **70**(3): 830-856.
- Collins, C. M., D. M. Gutman and H. Laman (1993). Identification of a nitrogen-regulated promoter controlling expression of *Klebsiella pneumoniae* urease genes. Molecular Microbiology **8**(1): 187-198.
- Cultrone, A., C. Scazzocchio, M. Rochet, G. Montero-Morán, C. Drevet and R. Fernández-Martín (2005). Convergent evolution of hydroxylation mechanisms in the fungal kingdom: molybdenum cofactor-independent hydroxylation of xanthine via  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases. Molecular Microbiology **57**(1): 276-290.
- Cusa, E., N. Obradors, L. Baldoma, J. Badia and J. Aguilar (1999). Genetic analysis of a chromosomal region containing genes required for assimilation of allantoin nitrogen and linked glyoxylate metabolism in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. **181**(24): 7479-7484.
- Czapla, L., J. P. Peters, E. M. Rueter, W. K. Olson and L. J. Maher Iii (2011). Understanding apparent DNA flexibility enhancement by HU and HMGB architectural proteins. Journal of Molecular Biology **409**(2): 278-289.
- Chang, Y. Y., A. Y. Wang and J. E. Cronan (1993). Molecular cloning, DNA sequencing, and biochemical analyses of *Escherichia coli* glyoxylate carboligase. An enzyme of the acetohydroxy acid synthase-pyruvate oxidase family. Journal of Biological Chemistry **268**(6): 3911-3919.
- Chirgwin, J. M., A. E. Przybyla, R. J. MacDonald and W. J. Rutter (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry **18**(24): 5294-5299.
- Chou, H.-C., C.-Z. Lee, L.-C. Ma, C.-T. Fang, S.-C. Chang and J.-T. Wang (2004). Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection. Infection and Immunity. **72**(7): 3783-3792.

## D

- Daddaoua, A., T. Krell and J.-L. Ramos (2009). Regulation of glucose metabolism in *Pseudomonas*. Journal of Biological Chemistry **284**(32): 21360-21368.
- Datsenko, K. A. and B. L. Wanner (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(12): 6640-6645.

- de la Riva, L., J. Badia, J. Aguilar, R. A. Bender and L. Baldoma (2008). The *hpx* genetic system for hypoxanthine assimilation as a nitrogen source in *Klebsiella pneumoniae*: gene organization and transcriptional regulation. *Journal of Bacteriology*. **190**(24): 7892-7903.
- di Guana, C., P. Lib, P. D. Riggsa and H. Inouyeb (1988). Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* **67**(1): 21-30.
- DiRusso, C. O., A. K. Metzger and T. L. Heimert (1993). Regulation of transcription of genes required for fatty acid transport and unsaturated fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli* by FadR. *Molecular Microbiology* **7**(2): 311-322.
- Dower, W. J., J. F. Miller and C. W. Ragsdale (1988). High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* **16**(13): 6127-6145.

## E

- Ehretsmann, C., A. Carpousis and H. Krisch (1992). mRNA degradation in procaryotes. *The FASEB Journal* **6**(13): 3186-3192.

## F

- Franco, I. S., L. J. Mota, C. M. Soares and I. de Sá-Nogueira (2006). Functional domains of the *Bacillus subtilis* transcription factor AraR and identification of amino acids important for nucleoprotein complex assembly and effector binding. *Journal of Bacteriology* **188**(8): 3024-3036.
- French, J. B. and S. E. Ealick (2010). Biochemical and structural characterization of a ureidoglycine aminotransferase in the *Klebsiella pneumoniae* uric acid catabolic pathway. *Biochemistry* **49**(29): 5975-5977.
- French, J. B., D. B. Neau and S. E. Ealick (2011). Characterization of the structure and function of *Klebsiella pneumoniae* allantoin racemase. *Journal of Molecular Biology* **410**(3): 447-460.
- Frisch, R. L. and R. A. Bender (2010). Expanded role for the nitrogen assimilation control protein in the response of *Klebsiella pneumoniae* to nitrogen stress. *Journal of Bacteriology* **192**(19): 4812-4820.
- Fuqua, W. C (1992). An improved chloramphenicol resistance gene cassette for site-directed marker replacement mutagenesis. *Biotechniques* **12**(2):223-5.

## G

- Gabison, L., M. Chiadmi, M. El Hajji, B. Castro, N. Colloc'h and T. Prangé (2010). Near-atomic resolution structures of urate oxidase complexed with its substrate and analogues: the protonation state of the ligand. *Acta Crystallographica Section D* **66**(6): 714-724.
- Gama-Castro, S., V. Jiménez-Jacinto, M. Peralta-Gil, A. Santos-Zavaleta, M. I. Peñaloza-Spinola, B. Contreras-Moreira, J. Segura-Salazar, L. Muñoz-Rascado, I. Martínez-Flores, H. Salgado, C. Bonavides-Martínez, C. Abreu-Goodger, C. Rodríguez-Penagos, J. Miranda-Ríos, E. Morett, E. Merino, A. M. Huerta, L. Treviño-Quintanilla and J. Collado-Vides (2008). RegulonDB (version 6.0): gene regulation model of *Escherichia coli* K-12 beyond transcription, active (experimental) annotated promoters and Textpresso navigation. *Nucleic Acids Research* **36**: D120-D124.
- Gao, C., C. Hu, Z. Zheng, C. Ma, T. Jiang, P. Dou, W. Zhang, B. Che, Y. Wang, M. Lv and P. Xu (2012). Lactate utilization is regulated by the FadR-type regulator LldR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **194**(10): 2687-2692.

- García-González, V., F. Govantes, O. Porrúa and E. Santero (2005). Regulation of the *Pseudomonas sp.* strain ADP cyanuric acid degradation operon. *Journal of Bacteriology* **187**(1): 155-167.
- Garzón, A., J. Li, A. Flores, J. Casadesus and V. Stewart (1992). Molybdenum cofactor (chlorate-resistant) mutants of *Klebsiella pneumoniae* M5a1 can use hypoxanthine as the sole nitrogen source. *Journal of Bacteriology* **174**(19): 6298-6302.
- Goldberg, R. B., R. A. Bender and S. L. Streicher (1974). Direct selection for P1-sensitive mutants of enteric bacteria. *Journal of Bacteriology* **118**(3): 810-814.
- Goodman, S. D., N. J. Velten, Q. Gao, S. Robinson and A. M. Segall (1999). *in vitro* selection of integration host factor binding sites. *Journal of Bacteriology* **181**(10): 3246-3255.
- Gorelik, M., V. V. Lunin, T. Skarina and A. Savchenko (2006). Structural characterization of GntR/HutC family signaling domain. *Protein Science* **15**(6): 1506-1511.
- Goss, T. J., B. K. Janes and R. A. Bender (2002). Repression of glutamate dehydrogenase formation in *Klebsiella aerogenes* requires two binding sites for the nitrogen assimilation control protein, NAC. *Journal of Bacteriology* **184**(24): 6966-6975.
- Goudela, S., P. Karatza, M. Koukaki, S. Frillingos and G. Diallinas (2005). Comparative substrate recognition by bacterial and fungal purine transporters of the NAT/NCS2 family. *Molecular Membrane Biology* **22**(3): 263-275.
- Gourlay, L. J., S. Sommaruga, M. Nardini, P. Sperandeo, G. Dehò, A. Polissi and M. Bolognesi (2010). Probing the active site of the sugar isomerase domain from *E. coli* arabinose-5-phosphate isomerase via X-ray crystallography. *Protein Science* **19**(12): 2430-2439.
- Güell, M., E. Yus, M. Lluch-Senar and L. Serrano (2011). Bacterial transcriptomics: what is beyond the RNA hori-zome? *Nature Reviews Microbiology* **9**(9): 658-669.

## H

- Hannahan D (1995). Techniques for transformation of *Escherichia coli*. En: D. M. Glover., B. D. Hames. *DNA cloning: a practical approach*. 2° ed. Oxford: IRL Press, p. 1-35.
- Harry de Koning, G. D. (2000). Nucleobase transporters. *Molecular Membrane Biology* **17**(2): 75-94.
- Hartstein, A. I., V. H. Morthland, J. W. Rourke, R. Sykes and A. L. Rashad (1993). Plasmid DNA analysis, biotyping, and antimicrobial susceptibility as subtyping tests for *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **16**(1): 35-41.
- Hasegawa, A., H. Ogasawara, A. Kori, J. Teramoto and A. Ishihama (2008). The transcription regulator ALLR senses both allantoin and glyoxylate and controls a set of genes for degradation and reutilization of purines. *Microbiology* **154**(11): 3366-3378.
- Huser, F., G. Pessi, M. Friberg, C. Weber, N. Rusca, A. Lindemann, H. M. Fischer, H. Henneke (2007). Dissection of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA  $\sigma^{54}$  regulon, and identification of a ferredoxin gene (*fdxN*) for symbiotic nitrogen fixation. *Molecular Genetics and Genomics* **278**(3):255-71.
- Haydon, D. J. and J. R. Guest (1991). A new family of bacterial regulatory proteins. *FEMS Microbiology Letters* **79**(2-3): 291-296.
- Helmann, J. D. and M. J. Chamberlin (1988). Structure and function of bacterial sigma factors. *Annual Review of Biochemistry* **57**(1): 839-872.
- Herrero, M., V. de Lorenzo and K. N. Timmis (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* **172**(11): 6557-6567.
- Hoskisson, P. A. and S. Rigali (2009). Chapter 1 Variation in Form and Function: The Helix-Turn-Helix regulators of the GntR superfamily. *Advances in Applied Microbiology*. I. L. Allen, S. Sima and M. G. Geoffrey, Academic Press. **Volume 69**: 1-22.

---

Huerta, A. M., M. P. Francino, E. Morett and J. Collado-Vides (2006). Selection for unequal densities of  $\sigma^{70}$  promoter-like signals in different regions of large bacterial genomes. *PLoS Genetics* **2**(11): e185.

## I

- Inoue, M., J. Hiratake, H. Suzuki, H. Kumagai and K. Sakata (2000). Identification of catalytic nucleophile of *Escherichia coli*  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase by  $\gamma$ -monofluorophosphono derivative of glutamic acid: n-terminal thr-391 in small subunit is the nucleophile. *Biochemistry* **39**(26): 7764-7771.
- Ishihama, A. (2000). Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annual Review of Microbiology* **54**(1): 499-518.
- Ishihama, A. (2010). Prokaryotic genome regulation: multifactor promoters, multitarget regulators and hierarchic networks. *FEMS Microbiology Reviews* **34**(5): 628-645.

## J

- Jaeger, T. and C. Mayer (2008). The transcriptional factors MurR and catabolite activator protein regulate n-acetylmuramic acid catabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **190**(20): 6598-6608.
- Janes, B. K. and R. A. Bender (1998). Alanine catabolism in *Klebsiella aerogenes*: molecular characterization of the dadAB operon and its regulation by the Nitrogen Assimilation Control Protein. *Journal of Bacteriology* **180**(3): 563-570.
- Janssen, D. B., H. M. Joosten, P. M. Herst and C. van der Drift (1982). Characterization of glutamine-requiring mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **151**(3): 1176-1183.
- Jaques, S. and L. L. McCarter (2006). Three new regulators of swarming in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology* **188**(7): 2625-2635.
- Jay D, G. (1996). Activation and repression of *E. coli* promoters. *Current Opinion in Genetics Development* **6**(5): 526-530.
- Jonas, D., B. Spitzmüller, F. D. Daschner, J. Verhoef and S. Brisse (2004). Discrimination of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* phylogenetic groups and other *Klebsiella* species by use of amplified fragment length polymorphism. *Research in Microbiology* **155**(1): 17-23.

## K

- Kahn, K. and P. A. Tipton (2000). Kinetics and mechanism of allantoin racemization. *Bioorganic chemistry* **28**(2): 62-72.
- Kim, G. J., D. E. Lee and H.-S. Kim (2000). Functional expression and characterization of the two cyclic amidohydrolase enzymes, allantoinase and a novel phenylhydantoinase, from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **182**(24): 7021-7028.
- Ko, T.-P., S.-P. Wu, W.-Z. Yang, H. Tsai and H. S. Yuan (1999). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the *Escherichia coli* tyrosine aminotransferase. *Acta Crystallographica Section D* **55**(8): 1474-1477.
- Kohler, P. R. A., E.-L. Choong and S. Rossbach (2011). The RpiR-like repressor lolR regulates inositol catabolism in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* **193**(19): 5155-5163.

## L

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685.



- Lai, Y.-C., H.-L. Peng and H.-Y. Chang (2003). RmpA2, an activator of capsule biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43, Regulates K2 cps gene expression at the transcriptional level. *Journal of Bacteriology* **185**(3): 788-800.
- Lane, D., P. Prentki and M. Chandler (1992). Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. *Microbiological Reviews* **56**(4): 509-528.
- Lederberg, J. (1951). Streptomycin resistance: a genetically recessive mutation. *Journal of Bacteriology* **61**(5): 549-550.
- Lee, F.-J. S. and J. Moss (1991). Cloning of a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a protein homologous to allantoicase of *Neurospora crassa*. *Yeast* **7**(9): 993-995.
- Lee, K. W. and A. H. Roush (1964). Allantoinase assays and their application to yeast and soybean allantoinases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **108**(3): 460-467.
- Lee, M. H., M. Scherer, S. Rigali and J. W. Golden (2003). PlmA, a new member of the GntR family, has plasmid maintenance functions in *Anabaena sp.* strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology* **185**(15): 4315-4325.
- Liu, Q. and R. A. Bender (2007). Complex regulation of urease formation from the two promoters of the ure operon of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* **189**(21): 7593-7599.
- Lorca, G. L., A. Ezersky, V. V. Lunin, J. R. Walker, S. Altamentova, E. Evdokimova, M. Vedadi, A. Bochkarev and A. Savchenko (2007). Glyoxylate and pyruvate are antagonistic effectors of the *Escherichia coli* IclR transcriptional regulator. *Journal of Biological Chemistry* **282**(22): 16476-16491.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**(1): 265-275.

## M

- Macaluso, A., E. A. Best and R. A. Bender (1990). Role of the nac gene product in the nitrogen regulation of some NTR-regulated operons of *Klebsiella aerogenes*. *Journal of Bacteriology* **172**(12): 7249-7255.
- Mangan, M. W., S. Lucchini, V. Danino, T. Ó. Cróinín, J. C. D. Hinton and C. J. Dorman (2006). The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology* **59**(6): 1831-1847.
- Martínez-Antonio, A. and J. Collado-Vides (2003). Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **6**(5): 482-489.
- Martinez, B., J. Tomkins, L. P. Wackett, R. Wing and M. J. Sadowsky (2001). Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas sp.* strain ADP. *Journal of Bacteriology* **183**(19): 5684-5697.
- Merrick, M. and R. Edwards (1995). Nitrogen control in bacteria. *Microbiology Review* **59**(4): 604-622.
- Miller, J. H. (1992). A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and related bacteria. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Miller, V. L. and J. J. Mekalanos (1988). 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. *Journal of Bacteriology* **170**(6): 2575-2583.
- Monterrubio, R., L. Baldoma, N. Obradors, J. Aguilar and J. Badia (2000). A common regulator for the operons encoding the enzymes involved in d-galactarate, d-glucarate, and d-glycerate utilization in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **182**(9): 2672-2674.
- Mota, L. J., P. Tavares and I. Sá-Nogueira (1999). Mode of action of AraR, the key regulator of l-arabinose metabolism in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **33**(3): 476-489.

- 
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*. W. Ray, Academic Press. **155**: 335-350.
- Münch, R., K. Hiller, A. Grote, M. Scheer, J. Klein, M. Schobert and D. Jahn (2005). Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics* **21**(22): 4187-4189.
- Muratsubaki, H., K. Satake and K. Enomoto (2006). Enzymatic assay of allantoin in serum using allantoinase and allantoinase amidohydrolase. *Analytical Biochemistry* **359**(2): 161-166.

## O

- O'Leary, S. n. E., K. A. Hicks, S. E. Ealick and T. P. Begley (2009). Biochemical Characterization of the HpxO Enzyme from *Klebsiella pneumoniae*, a novel FAD-dependent urate oxidase†. *Biochemistry* **48**(14): 3033-3035.
- Ortuño-Olea, L. and S. Durán-Vargas (2000). The L-asparagine operon of *Rhizobium etli* contains a gene encoding an atypical asparaginase. *FEMS Microbiology Letters* **189**(2): 177-182.

## P

- Pérez-Rueda, E. and J. Collado-Vides (2000). The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research* **28**(8): 1838-1847.
- Piedras, P., A. Muñoz, M. Aguilar and M. Pineda (2000). Allantoate amidohydrolase (allantoicase) from *Chlamydomonas reinhardtii*: its purification and catalytic and molecular characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **378**(2): 340-348.
- Pope, S. D., L.-L. Chen and V. Stewart (2009). Purine utilization by *Klebsiella oxytoca* M5al: genes for ring-oxidizing and -opening enzymes. *Journal of Bacteriology* **191**(3): 1006-1017.
- Porter, S. C., A. K. North, A. B. Wedel and S. Kustu (1993). Oligomerization of NTRC at the glnA enhancer is required for transcriptional activation. *Genes & Development* **7**(11): 2258-2273.
- Prieto, A. I., C. Kahramanoglou, R. M. Ali, G. M. Fraser, A. S. N. Seshasayee and N. M. Luscombe (2011). Genomic analysis of DNA binding and gene regulation by homologous nucleoid-associated proteins IHF and HU in *Escherichia coli* K12. *Nucleic Acids Research*.

## R

- Raman, N., P. N. Black and C. C. DiRusso (1997). Characterization of the fatty acid-responsive transcription factor FadR. *Journal of Biological Chemistry* **272**(49): 30645-30650.
- Ramazzina, I., L. Cendron, C. Folli, R. Berni, D. Monteverdi, G. Zanotti and R. Percudani (2008). Logical identification of an allantoinase analog (puuE) recruited from polysaccharide deacetylases. *Journal of Biological Chemistry* **283**(34): 23295-23304.
- Ramazzina, I., R. Costa, L. Cendron, R. Berni, A. Peracchi, G. Zanotti and R. Percudani (2010). An aminotransferase branch point connects purine catabolism to amino acid recycling. *Nature Chemical Biology* **6**(11): 801-806.
- Reese, M. G. (2001). Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Computers and Chemistry* **26**(1): 51-56.
- Reitzer, L. and B. L. Schneider (2001). Metabolic Context and Possible Physiological Themes of  $\sigma^{54}$ -Dependent Genes in *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology. Reviews*. **65**(3): 422-444.
- Rigali, S., A. Derouaux, F. Giannotta and J. Dusart (2002). Subdivision of the Helix-Turn-Helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *Journal of Biological Chemistry* **277**(15): 12507-12515.

- Rintoul, M. R., E. Cusa, L. Baldomà, J. Badia, L. Reitzer and J. Aguilar (2002). Regulation of the *Escherichia coli* allantoin regulon: coordinated function of the repressor AllR and the activator AllS. *Journal of Molecular Biology* **324**(4): 599-610.
- Rosario, C. J. and R. A. Bender (2005). Importance of tetramer formation by the Nitrogen Assimilation control protein for strong repression of glutamate dehydrogenase formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* **187**(24): 8291-8299.

## S

- Saint-Marc, C. and B. Daignan-Fornier (2004). GUD1 (YDL238c) encodes *Saccharomyces cerevisiae* guanine deaminase, an enzyme expressed during post-diauxic growth. *Yeast* **21**(16): 1359-1363.
- Sambrook J., D. W. Russell (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3° ed. Ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**(12): 5463-5467.
- Schmitz, G. G., T. Walter, R. Seibl and C. Kessler (1991). Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Analytical Biochemistry* **192**(1): 222-231.
- Schultz, A. C., P. Nygaard and H. H. Saxild (2001). 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. *Journal of Bacteriology* **183**(11): 3293-3302.
- Schwacha, A. and R. A. Bender (1993). 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. *Journal of Bacteriology* **175**(7): 2116-2124.
- Serventi, F., I. Ramazzina, I. Lamberto, V. Puggioni, R. Gatti and R. Percudani (2009). Chemical basis of nitrogen recovery through the ureide pathway: formation and hydrolysis of s-ureidoglycine in plants and bacteria. *ACS Chemical Biology* **5**(2): 203-214.
- Simons, R. W., F. Houman and N. Kleckner (1987). Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**(1): 85-96.
- Skorupski, K. and R. K. Taylor (1996). Positive selection vectors for allelic exchange. *Gene* **169**(1): 47-52.
- Smith, G. R., Y. S. Halpern and B. Magasanik (1971). Genetic and metabolic control of enzymes responsible for histidine degradation in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Biological Chemistry* **246**(10): 3320-3329.
- Sorensen, K. and B. Hove-Jensen (1996). Ribose catabolism of *Escherichia coli*: characterization of the *rpiB* gene encoding ribose phosphate isomerase B and of the *rpiR* gene, which is involved in regulation of *rpiB* expression. *Journal of Bacteriology* **178**(4): 1003-1011.
- Studholme, D. J., M. Buck and T. Nixon (2000). Identification of potential  $\sigma^N$ -dependent promoters in bacterial genomes. *Microbiology* **146**(12): 3021-3023.
- Studholme, D. J. and R. Dixon (2003). Domain Architectures of  $\sigma^{54}$ -dependent transcriptional activators. *Journal of Bacteriology* **185**(6): 1757-1767.
- Sugimura, S. and D. M. Crothers (2006). Stepwise binding and bending of DNA by *Escherichia coli* integration host factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**(49): 18510-18514.
- Suzuki, S. i. and P. J. F. Henderson (2006). The hydantoin transport protein from *Microbacterium liquefaciens*. *Journal of Bacteriology* **188**(9): 3329-3336.

**T**

- Tao, L., I. C. Sutcliffe, R. R. B. Russell and J. J. Ferretti (1993). Transport of sugars, including sucrose, by the msm transport system of *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research* **72**(10): 1386-1390.
- Tatusova, T. A. and T. L. Madden (1999). BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiology Letters* **174**(2): 247-250.
- Todd, C. and J. Polacco (2006). AtAAH encodes a protein with allantoate amidohydrolase activity from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **223**(5): 1108-1113.
- Truong-Bolduc, Q. C. and D. C. Hooper (2007). The transcriptional regulators NorG and MgrA modulate resistance to both quinolones and  $\beta$ -lactams in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **189**(8): 2996-3005.

**V**

- van Aalten, D. M. F., C. C. DiRusso and J. Knudsen (2001). The structural basis of acyl coenzyme A-dependent regulation of the transcription factor FadR. *EMBO J* **20**(8): 2041-2050.
- van Aalten, D. M. F., C. C. DiRusso, J. Knudsen and R. K. Wierenga (2000). Crystal structure of FadR, a fatty acid-responsive transcription factor with a novel acyl coenzyme A-binding fold. *EMBO J* **19**(19): 5167-5177.
- Vigetti, D., G. Binelli, C. Monetti, M. Prati, G. Bernardini and R. Gornati (2003). Selective pressure on the allantoicase gene during vertebrate evolution. *Journal of Molecular Evolution* **57**(6): 650-658.
- Vigetti, D., C. Monetti, L. Pollegioni, R. Taramelli and G. Bernardini (2000). Xenopus allantoicase: molecular cloning, enzymatic activity and developmental expression. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **379**(1): 90-96.
- Vogels, G. D. and C. Van der Drift (1976). Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. *Bacteriological Reviews* **40**(2): 403-468.
- Vogelstein, B. and D. Gillespie (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**(2): 615-619.

**W**

- Walker, J. R., S. Altamentova, A. Ezersky, G. Lorca, T. Skarina, M. Kudritska, L. J. Ball, A. Bochkarev and A. Savchenko (2006). Structural and biochemical study of effector molecule recognition by the *E. coli* glyoxylate and allantoin utilization regulatory protein AllR. *Journal of Molecular Biology* **358**(3): 810-828.
- Wang, Y., S. Zhang, Z. Liu, H. Li and L. Wang (2005). Amphioxus allantoicase: molecular cloning, expression and enzymatic activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **141**(2): 237-243.
- Wassem, R., E. M. De Souza, M. G. Yates, F. d. O. Pedrosa and M. Buck (2000). Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter. *Molecular Microbiology* **35**(4): 756-764.
- Werner, A. K., T. Romeis and C.-P. Witte (2010). Ureide catabolism in *Arabidopsis thaliana* and *Escherichia coli*. *Nature Chemistry and Biology* **6**(1): 19-21.
- Werner, A. K., I. A. Sparkes, T. Romeis and C.-P. Witte (2008). Identification, biochemical characterization, and subcellular localization of allantoate amidohydrolases from *Arabidopsis* and *Soybean*. *Plant Physiology* **146**(2): 418-430.
- Werner, A. K. and C.-P. Witte (2011). The biochemistry of nitrogen mobilization: purine ring catabolism. *Trends in Plant Science* **16**(7): 381-387.

**X**

- Xi, H., B. L. Schneider and L. Reitzer (2000). Purine catabolism in *Escherichia coli* and function of xanthine dehydrogenase in purine salvage. *Journal of Bacteriology* **182**(19): 5332-5341.
- Xu, Y., R. J. Heath, Z. Li, C. O. Rock and S. W. White (2001). The FadR-DNA complex. *Journal of Biological Chemistry* **276**(20): 17373-17379.
- Xu, Z., F. E. de Windt and C. van der Drift (1995). Purification and characterization of allantoin amidohydrolase from *Bacillus fastidiosus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **324**(1): 99-104.

**Y**

- Yamamoto, H., M. Serizawa, J. Thompson and J. Sekiguchi (2001). Regulation of the *glv* operon in *Bacillus subtilis*: YfiA (GlvR) is a positive regulator of the operon that is repressed through CcpA and cre. *Journal of Bacteriology* **183**(17): 5110-5121.
- Yamamoto, K. and A. Ishihama (2003). Two different modes of transcription repression of the *Escherichia coli* acetate operon by IclR. *Molecular Microbiology* **47**(1): 183-194.
- Yang, J. and K.-H. Han (2004). Functional characterization of allantoinase genes from *Arabidopsis* and a nonureide-type legume black locust. *Plant Physiology* **134**(3): 1039-1049.
- Yoo, H. S., F. S. Genbauffe and T. G. Cooper (1985). Identification of the ureidoglycolate hydrolase gene in the DAL gene cluster of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **5**(9): 2279-2288.

**Z**

- Zhou, D. and R. Yang (2006). Global analysis of gene transcription regulation in prokaryotes. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**(19): 2260-2290.
- Zhu, Y., R. Nandakumar, M. R. Sadykov, N. Madayiputhiya, T. T. Luong, R. Gaupp, C. Y. Lee and G. A. Somerville (2011). RpiR homologues may link *Staphylococcus aureus* RNAIII synthesis and pentose phosphate pathway regulation. *Journal of Bacteriology* **193**(22): 6187-6196.
- Zimmer, D. P., E. Soupene, H. L. Lee, V. F. Wendisch, A. B. Khodursky, B. J. Peter, R. A. Bender and S. Kustu (2000). Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: Scavenging as a defense against nitrogen limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(26): 14674-14679.

## **8. ANEXOS**



## 8. ANEXOS

### ANEXO 1: OLIGONUCLEOTIDOS

En los casos en los que los cebadores contenían alguna diana de restricción, esta se indica en negrita. Los nucleótidos subrayados han sido cambiados.

#### Determinación de los inicios de transcripción mediante RACE

Poli d(T) GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTV; V=A, C ó G

PCR anchor primer GACCACGCGTATCGATGTCGAC (Roche)

#### Operón *hpxSAB*

*hpxS\_sp1* TGACCAGTTGCACAGCGGCG

*hpxS\_sp2* CGGCTCACGGCGAACACCTC

*hpxS\_sp3* CGATAGCCGTCATCAGCGCC

#### Gen *hpxC*

*hpxC\_sp1* GAACCTGCCAGCTGGCCAGC

*hpxC\_sp3* TGGTCGCGGGTCGGCGCCAG

#### Gen *quaD*

*quaD\_sp1* GATCGACATAGCCCTTCAGG

*quaD\_sp2* AGCAGGGCGATAATTTTCCC

*quaD\_sp3* CCTCATCCGGGGTCTCCGCC

#### Operón *hpxFGHIJK*

*hpxF\_sp1* GATTCGCCAGATAGCGCGC

*hpxF\_sp2* ACGGCGGAAAGTCCTGGGG

*hpxF\_sp3* GCTGGTCAGCCTGCGCGGC

#### Gen *hpxU*

*hpxU\_sp1* TCCTTATATTTGTCGTAACC

*hpxU\_sp2* ACGCCGCTAGCTGCGCCAG

*hpxU\_sp3* AAGATGAAATCCGCCACCCG

#### Construcción de fusiones transcripcionales al gen *lacZ*

M13 GTAAAACGACGGCAGT

#### Operón *hpxSAB*

Psc(2)\_EcoRI.fw **CGGAATTCTGTGCACGTCC**

Psc(2)\_Sma1.rv **TCCCCGGGTGGTAAATGCTTTC**

#### Gen *hpxC*

Psc(1)\_EcoRI.fw **CGGAATTCTGGTAAATGCTTT**



Psc(1)\_Sma1.rv TCC**CCCGGG**TGTGCACGTCCGAC

Gen *guaD*

PguaD\_EcoRI.fw CG**GAAT**CCCACCTACCGC

PguaD\_BamHI.rv CG**GGAT**CCACGCCGGCGATA

Operón *hpxFGHIJK*

PhpxUF-EcoRI CG**GAAT**CATCCACGATATCGCCACGCT

PhpxUF-BamHI CG**GGAT**CCCAGACGATAGGAGACAAGCG

Gen *hpxU*

PhpxU-EcoRI CG**GAAT**CCTCTGACTGGCGAGGTGGTG

PhpxU-BamHI CG**GGAT**CCTCCTGCGGCGACAGCGAGGC

Operón *hpxWXYZ*

PhpxW-EcoRI CG**GAAT**CTCCTGCGGCGACAGCGAGGC

PhpxW-BamHI CG**GGAT**CCCTCTGACTGGCGAGGTGGTG

**Clonación de proteínas de fusión a MBP**

HpxS

HpxS\_BamHI.rv CG**GGAT**CCTCACGACTCCTT

HpxS\_EcoRI.fw CG**GAAT**CATGAATAATGAACATCGTCTCCAGG

GuaD

PmalregguaD1.fw CG**GAAT**CATGATGGATTACCAGACCGC

pmalguaD.rv A**ATTCTAG**ATCAATCCTGACACCACACCCGCTC

HpxB

pmalregpuuE1.fw CG**GAAT**CATGGGAGAGAACCAGGAACAC

pmalpuuE.rv A**ATTCTAG**ACTACCCGCGATACGGATGGGTTTCG

HpxU

Mal-HpxU-fw CG**GAAT**CATGCAACA**ACT**CGATGAACGA

Mal-HpxU-rv G**CCGGAT**CCTCAGCGTTGTTCCAGCTCGTC

HpxK

Mal-hpxK-fw G**CGGAAT**CATGAGTGACACCGTCCGCCAG

Mal-hpxK-rv G**CGGGAT**CCTCAGGCGTCGGCCACCTTC

**Construcción del mutante *hpxS::kan***

HpxSmut2 G**CCGAAT**TCGACCATCGTCGCCATATGCATTGC

HpxSmut1\_EcoRI G**CGGAAT**TCAAACCGCCGGACCAGC

---

KanXho.fw	GACATA <b>CTCGAG</b> GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KanXho.rv	AGTATC <b>CTCGAG</b> CATATGAATATCCTCCTTAG

### Síntesis de sondas usadas en los EMSAs

#### Región intergénica *hpxS-hpxC*

Psc(2)_Sma1.rv	TCC <b>CCCGGG</b> TGGTAAATGCTTTC
Psc(2)_del1.rv	TCCTCTGAATGAAAACCTTTG
Psc(2)_del2.rv	GAATGATGAATCTTGTATAC
Psc(2)_del3.rv	GATCTGCTATCGATAAGTG
Psc(1)_Sma1.rv	TCC <b>CCCGGG</b> TGTGCACGTCCGAC
Psc(1)_del1.fw	GGTTTCACTTATCGATAGCAG
Psc(1)_del2.fw	GTATACAAGATTCATCATT
Psc(1)_del3.fw	GCCTCAGCAATCCATATCAAAGG
ShpxSmut.fw	CCACTCCGGTTTCACTTATCGATAGCAGATCC <u>CATGA</u> ATAAAATTTAATT
ShpxSmut.rv	GATGAATCAAGTATACAAAAATTAATTTTATTCATGGATCTGCTATCG
NACboxmut.fw	CGATAGCAGATCGTATACATAAAG <u>CATA</u> ATTTTTGGCAACAAGA
NACboxmut.rv	CCAGGCCAGAATGATGAATCTTGT <u>TGCC</u> AAAAATTATGCTTTATG

#### Región promotora del gen *quaD*

PguaD_EcoRI.fw	CG <b>GAATT</b> CCCACCTACCGC
PguaD_BamHI.rv	CGC <b>GGATCC</b> ACGCCGCGATA

#### Región promotora del operón *hpxFGHIJK*

F_P150 Fw	GGACAAGCGTTAACGGAAAAG
F_P149 Rv	TCCTCGCCAACCTCGCC
F_P70 Fw	GTTTACCCGTTACGTTAGCATG
F_P70 Rv	GTATCTGGAACATTAGTTGC
IRcut. rv	AGAATCTTTTGTTCATGCTAACG
IRcut. fw	TGAATCTGTTTTGCAACTAATGTTC
IRdel1. Fw	GAAACAAAAGATTCTTTGAATC
IRdel2. Fw	GATTCTTTGAATCTGTTTTTG
FP140. Fw	GTCCTGGGGTACGGCAATGC
FP140. Rv	AACGGGTAAACATCATGAAG

#### Región intergénica *hpxU-hpxW*

IRWdel1	CCATCTCTGAACGTTTCGTTTCAT
IRWdel2	GATGGAACAGCTTTTGCAGTGTT
P105U. Rv	GAACGACTGAAAGGGCAATACGCCT

---

P210U. Fw	CTCGGCGCTGTTGTAGCTTATC
P210U. Rv	CAGAATTTTCCCACTGGCACGC
IRW. Fw	GTCATCGTTTTTATCAATGAAACG
PhpxU-EcoRI	CGC <b>GAATTC</b> CTCTGACTGGCGAGGTGGTG
P135U. Rv	AGTTACAGGGGCGCTATGCAAC
P165U. Rv	CAGTATGATGAGGAATAGATG

### **GENOME WALKING**

GSP1	TCGAGGCGCTGCGTATTTACGGGACTT
GSP2	TGGCCGATGCGATCGGCTATGCCGAAGA
GSP1.2	AACTGCTGAGCGACCGGCCCGCCAGCGA

### **Otros oligonucleótidos utilizados**

pGEMTT7	TAATACGACTCACTATAGGG (Promega)
pGEMTSP6	TAAATCCACTGTGATATCTT (Promega)
pRS415seq	CCAGGAATTGGGGATCGGAATTC
pRS415ext	GTCGCCGCTTTCATCGGTTGT

## 9. PUBLICACIONES