

Análisis de mutaciones en genes reguladores seleccionadas durante evolución adaptativa por crecimiento rápido en glucosa, en una cepa de *Escherichia coli* carente del sistema PTS

César Aguilar Martínez, Alfredo Martínez Jiménez, Guillermo Gosset Lagarda, Francisco Bolívar Zapata. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología (UNAM). Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa. C.P. 62210 Cuernavaca, Morelos, México. Fax: (+52) 777 329 1648. E-mail: noemi@ibt.unam.mx

Palabras clave: Sistema de dos componentes, regulación, transcripción.

Introducción. *E. coli* contiene más de 300 genes que codifican proteínas que tienen por función, unirse a promotores para modular la transcripción; no obstante, aún no se sabe nada de por lo menos 150 presuntos factores de transcripción en esta bacteria (1). Recientemente se identificaron varias mutaciones en una cepa de *E. coli* carente del sistema PTS, sometida a evolución adaptativa por crecimiento rápido en glucosa, denominada PB12 (2); algunas de estas mutaciones mapean en genes regulatorios como: *arcB*, *barA*, *rssA*, *yjjU*, *ypdA* y *rnaI*. El presente trabajo sugiere que las mutaciones en *barA* y *yjjU* podrían estar implicadas en el incremento del nivel de expresión de ciertos genes en la cepa PB12.

Objetivo: Analizar el efecto de las mutaciones ocurridas en *barA*, *yjjU* y *rssA* en la cepa PB12.

Metodología. Se utilizó el vector pCL1920, para clonar los genes *barA*, *yjjU* y *rssA* en su versión silvestre y éstos se utilizaron para complementar la cepa PB12; así mismo, estos genes se inactivaron mediante el método de Datsenko (Datsenko & Wanner, 2000) en las cepas JM101, PB11 y PB12. Se determinó la μ de las cepas mutantes y de la cepa PB12 complementada con los diversos genes en plásmido. El efecto de la mutación en *barA*, también se evaluó mediante la medición de actividad de β -Galactosidasa, utilizando la fusión *csrB-lacZ* contenida en el plásmido pCBZ1.

Resultados y discusión. En la cepa PB12 existe un aumento en la expresión de varios genes del metabolismo central del carbono, en particular de la vía glicolítica, además de los genes involucrados en el metabolismo del ppGpp, de los cuales no se conocen las razones de su sobreexpresión.

Los resultados de actividad de β -Galactosidasa sugieren que la expresión del gene *csrB* se encuentra afectado en la cepa PB12 (Fig.1). Experimentos preliminares de complementación en PB12 con el gen silvestre de *barA*, reduce la μ alrededor del 10%. Por su parte las complementaciones con los genes *yjjU* y *rssA* en la cepa PB12, disminuyen la μ en un 25 y 8 % respectivamente (Cuadro1).

Cuadro 1. μ 's de la cepa PB12 en medio M9-Glc 2g/L complementada con las versiones silvestres de los genes *barA*, *yjjU* y *rssA*.

Cepa	μ	Porcentaje
PB12	0.45	100
PB12 Δ barA	0.44	98
PB12/pCL1920	0.44	98
PB12 Δ barA/pCLbarA	0.4	89
PB12/pCLbarA	0.42	93
PB12 Δ yjjU/pCLyjjU	0.34	75.5
PB12 Δ rssA/pCLrssA	0.42	93

Conclusiones. Los resultados sugieren que el sistema de dos componentes BarA/UvrY desempeña sus funciones de manera distinta en la cepa PB12, probablemente por la mutación sufrida en el gen *barA*, lo cual se podría traducir en un efecto sobre el sistema de regulación global CsrA/B, encargado de modular la expresión de genes glicolíticos. Congruente con lo anterior, la complementación de *barA* y *yjjU* en la cepa PB12 reducen la μ de la cepa; lo cual también coincide con la idea de que algunas de las mutaciones que aparecieron en PB12 deben ser responsables de incrementar su μ durante el proceso de evolución al que fue sometida.

Agradecimiento. Este proyecto es financiado por CONACYT.

Bibliografía.

- Pérez-Rueda, E, Collado-Vides, J. (2000). The repertoire of DNA binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 28: 1838–1847.
- Flores, N, Flores, S, Escalante, A, de Anda, R, Leal, L, Malpica, R, Georgellis, D, Gosset, G, Bolivar, F. (2005). Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Metabol. Eng.* 7: 70–87.

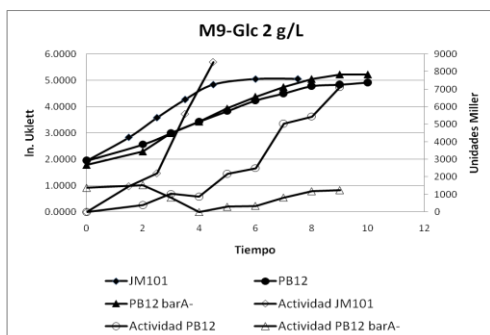


Fig. 1. Actividades de β -Galactosidasa en la cepa JM101, PB12 y PB12 Δ barA.