

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA UTILIZACIÓN DE SACAROSA EN CEPAS DE *E. coli* ENTEROPATÓGENA.

Alma Delia Caro, Luis Gerardo Treviño, Alfredo Martínez, Francisco Bolivar y Guillermo Gosset. Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología. Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001, Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, CP 62210, México.

Fax (777) 3 17 23 88. e-mail: gosset@ibt.unam.mx, alcaber@ibt.unam.mx

Palabras clave: Sacarosa, *E. coli*, Enteropatógena.

Introducción. La habilidad para utilizar sacarosa (Scr) como única fuente de carbono es un fenómeno altamente variable en diferentes bacterias entéricas. Más del 90% de las cepas tipo silvestre de *Klebsiella* spp. pero menos del 50% de *Escherichia coli* y menos del 10% de las cepas de *Salmonella* son Scr⁺. La mayoría de las bacterias entéricas Scr⁺ capturan (scrY) y fosforilan la sacarosa vía un sistema PTS específico (scrA), el cual genera sacarosa-6-fosfato intracelular que posteriormente es hidrolizado por una sacarosa-6-fosfato hidrolasa (scrB) en D-glucosa-6-fosfato y D-fructosa, esta última es fosforilada por una fructokinasa dependiente de ATP (scrK). Las cepas de *E. coli* EC3132 y O157:H7 en contraste con *E. coli* K-12 son capaces de utilizar sacarosa; sin embargo la captura y metabolismo de la sacarosa en estas cepas es un sistema no dependiente de PTS en su lugar la sacarosa es transportada al interior de la célula por una proteína tipo simporter sacarosa:H⁺ nombrada CscB (2).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la capacidad de utilizar la sacarosa en nueve cepas de *E. coli* enteropatógenas, así como aislar y caracterizar los genes involucrados en el consumo de ésta azúcar.

Metodología. Se utilizaron nueve cepas de *E. coli* enteropatógenas para realizar este estudio. Las cepas fueron caracterizadas por su crecimiento en placas con MackScr0.2% y M9Scr0.2%. Para establecer su capacidad de crecer en sacarosa se realizó una cinética de crecimiento en M9Scr2g/L. Se eligió la cepa que mostró mejor crecimiento, que tiene menos plásmidos y resistencia a los antibióticos. A partir del ADN cromosomal de esta cepa se construyó un banco genómico utilizando el vector pCP13 y fue transfecteda en *E. coli* W3110 (Scr⁻) seleccionando en M9Scr0.2%. Se obtuvo un cósmido el cual le confiere a la cepa W3110 la capacidad de utilizar sacarosa. Posteriormente se aislaron y secuenciaron los genes involucrados en la utilización de sacarosa.

Resultados y discusión. Las nueve cepas de *E. coli* enteropatógenas utilizadas en este estudio crecen en placas de M9Scr0.2% y producen colonias rojas en MackScr0.2%. Al realizar la cinética de consumo de sacarosa (Fig 1) podemos observar que no todas las cepas utilizan eficientemente ésta azúcar; con base en esta cinética se eligió a la cepa DAEC RN 189/1 para realizar el aislamiento y caracterización de los genes. A partir del banco genómico producido de la cepa anterior se aisló un cósmido con un

fragmento de aproximadamente 10 kpb que le confiere a la cepa W3110 la capacidad de utilizar sacarosa.

La secuencia obtenida a partir de este cósmido presenta un arreglo de los genes Scr (scrYABR) similar al de *Salmonella* spp. y *Erwinia amylovora* (1). La mayor identidad a nivel de proteína la presenta contra los genes de *Klebsiella pneumoniae*. Por otra parte el arreglo de estos genes es completamente diferente al de las dos cepas de *E. coli* no patógenas ya reportadas.

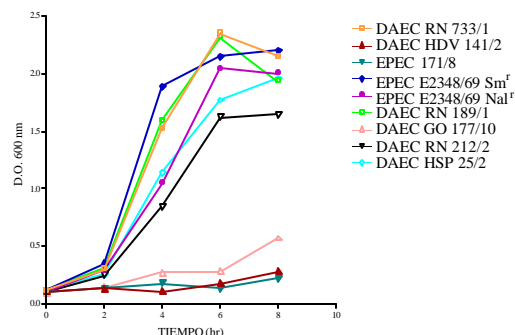


Fig. 1. Cinética de crecimiento de las cepas enteropatógenas de *E. coli* en M9Scr2g/L.

Conclusiones. Aunque las nueve cepas utilizadas en este estudio son capaces de crecer en presencia de sacarosa, al realizar la cinética observamos que su capacidad de emplear ésta azúcar es diferente. La utilización de un procedimiento de selección positiva para la utilización de ésta azúcar nos permitió aislar rápidamente los genes involucrados en el catabolismo de ésta azúcar.

La identidad y organización presentada por los genes de la cepa de *E. coli* enteropatógena DAEC RN 189/1 difiere de la de las otras cepas de *E. coli* ya reportadas y presenta mayor similitud con la de otras bacterias entéricas.

Agradecimiento. Al Dr. José Luis Puente por la donación de las cepas utilizadas en este estudio y al proyecto NC-230 del CONACyT.

Bibliografía.

- Bogs, J y Geider, K. (2000). Molecular Analysis of Sucrose Metabolism of *Erwinia amylovora* and Influence on Bacterial Virulence. *J. Bacteriol.* Vol. 182(19): 5351-5358.
- Jahreis, K, Bentler, L, Bockmann, J, Hans, S, Meyer, A, Siepelmeyer, J y Lengeler, JW. (2002). Adaptation or Sucrose Metabolism in the *Escherichia coli* Wild-Type Strain EC3132. *J. Bacteriol.* Vol. 184(19): 5307-5316.