

Universidad de León, Facultad de Biología

Departamento de Ecología, Genética y Microbiología

Identificación y análisis funcional de genes implicados en
el catabolismo del ácido glucónico en *Corynebacterium*
glutamicum ATCC 13032

Michal Letek Polberg
León, 2002

Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han apoyado y ayudado durante

la realización de este trabajo y muy especialmente:

Al Dr. Luis Mariano Mateos, por su dirección, esfuerzo y constante interés.

Al Dr. José Antonio Gil, por su dirección y apoyo.

A mi madre, porque se lo merece.

Y a todos mis compañeros de laboratorio, por estar siempre dispuestos a prestarme su ayuda y

experiencia, en especial a Noelia, Angelina y Juan Pablo.

Memoria presentada por Michal Letek Polberg,
Licenciado en Biología, para optar al
Grado de Licenciado en Biología.

León, 2002

A Patricia.

Indice

1. Introducción	1
1.1 Características generales de corinebacterias	3
1.1.1 Características generales del género <i>Corynebacterium</i>	6
1.2 Genética y biología molecular de las corinebacterias	7
1.2.1 Vectores de clonación	8
1.2.1.1 Plásmidos	8
1.2.1.2 Fagos y sus derivados	9
1.2.1.3 Transposones y elementos de inserción	10
1.2.2 Métodos de introducción de DNA exógeno en corinebacterias	10
1.2.2.1 Transformación de protoplastos	10
1.2.2.2 Electroporación o electrotransformación	10
1.2.2.3 Conjugación	11
1.2.3 Clonación de genes en corinebacterias	11
1.2.4 Expresión de genes en corinebacterias	12
1.2.4.1 Regiones reguladoras: promotores, operadores y terminadores	12
1.2.5 Mecanismos de regulación de la expresión génica a nivel de transcripción: inducción y represión catabólica	13
1.2.5.1 Sistemas inducibles y de represión catabólica	14
1.3 Metabolismo del ácido glucónico en bacterias	15
1.4 Genes implicados en el metabolismo del glucónico en bacterias	18
1.4.1 Genes <i>gnt</i> en <i>Escherichia coli</i>	18
1.4.2 Genes <i>gnt</i> en <i>Bacillus</i>	21
1.5 Producción y aplicaciones del ácido glucónico y sus derivados	22
1.6 Uso de bases de datos en campos científicos	23
1.6.1 Aplicaciones bioinformáticas de tipo heurístico	23
1.7 Objetivos del presente trabajo	27
2. Materiales y Métodos	28
2.1 Materiales	30
2.1.1 Reactivos químicos, bioquímicos y enzimas comerciales	30
2.1.1.1 Ácidos nucleicos	30

2.1.2 Microorganismos utilizados	30
2.1.3 Plásmidos utilizados	31
2.1.4 Medios usados y condiciones de cultivo	31
2.1.4.1 Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	32
2.1.4.2 Medios de cultivo para <i>C. glutamicum</i>	32
2.1.4.3 Antibióticos y otros aditivos	32
2.1.5 Soluciones de uso general	33
2.1.6 Conservación de las cepas bacterianas	33
2.2 Métodos para el análisis de ácidos nucleicos	34
2.2.1 Preparación del DNA	34
2.2.1.1 Aislamiento de DNA total de corinebacterias	34
2.2.1.2 Minipreparación de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	34
2.2.1.3 Preparación de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> mediante lisis alcalina	35
2.2.2 Métodos de limpieza y conservación de ácidos nucleicos	36
2.2.2.1 Fenolización y concentración del DNA	36
2.2.3 Manipulación del DNA	37
2.2.3.1 Digestión del DNA con enzimas de restricción	37
2.2.3.2 Desfosforilación de los extremos 5'-fosphato libres del DNA	38
2.2.3.3 Ligación de fragmentos de DNA	38
2.2.3.4 Electroforesis de DNA en geles de agarosa	39
2.2.3.5 Extracción de fragmentos de DNA de geles de agarosa-TAE	40
2.2.4 Técnicas de introducción de DNA en bacterias	40
2.2.4.1 Transformacion en <i>E. coli</i>	40
2.2.4.2 Obtención de células de <i>E. coli</i> competentes por el método del cloruro de rubidio	40
2.2.4.3 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	41
2.2.4.4 Selección por color de los transformantes	41
2.2.4.5 Conjugación en corinebacterias	42
2.2.5 Técnicas de hibridación de DNA	42
2.2.5.1 Transferencia de DNA desde un gel de agarosa a un soporte sólido	43
2.2.5.2 Marcaje de DNA con digoxigenina	43
2.2.5.3 Hibridación	44
2.2.5.4 Detección colorimétrica	45
2.2.6 Reacción en cadena de la DNA polimerasa	46
2.2.7 Técnicas de secuenciación de DNA	47
2.2.6.1 Determinación de la secuencia de nucleótidos	47
2.2.6.1 Métodos de análisis informático de secuencias	48

3. Resultados	49
3.1 Fundamentos del presente trabajo de investigación	51
3.2 Identificación del gen <i>gntK</i> (gluconato kinasa) en el genoma de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	51
3.2.1 Amplificación del hipotético gen <i>gntK</i> por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	53
3.2.2 Subclonación del gen <i>gntK</i>	53
3.2.3 Secuenciación y análisis del gen <i>gntK</i>	54
3.2.4 Interrupción del gen <i>gntK</i> en corinebacterias	56
3.2.5 Conjugación <i>E. coli</i> -corinebacterias y análisis de los transconjugantes	58
3.2.6 Comprobación de interrupción del gen <i>gntK</i> por hibridación Southern	58
3.2.7 Análisis nutricional de los transconjugantes obtenidos	60
3.3 Interrupción del gen <i>gntP</i> (gluconato permeasa)	61
3.3.1 Hibridación Southern	62
3.3.2 Análisis nutricional de los transconjugantes obtenidos	64
3.4 Mapa físico de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	65
3.5 Análisis de la disposición cromosómica de los genes <i>gnt</i> en <i>C. glutamicum</i>	70
3.6 Aplicaciones prácticas del presente trabajo	72
4. Conclusiones	73
5. Bibliografía	76

Abreviaturas

A adenina	AMP ácido adenosín-5'-fosfato
AMPc AMP cíclico	<i>Ap ampicilina</i>
ATCC <i>American Type Culture Collection</i> (colección americana de cepas tipo)	ATP adenosina-5'-fosfato
BCIP 5-bromo,1-cloro,3indolil-fosfato	bla gen de resistencia a ampicilina
BrEt bromuro de etidio	C citosina
CIA cloroformo isoamílico	col colaboradores
CRP proteína reguladora del catabolismo	Da dalton
ddNTP cualquiera de los cuatro desoxinucleótidos (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP)	DMSO dimetilsulfóxido
DNA ácido desoxirribonucleico	DNasa desoxirribonucleasa
dNTP cualquiera de los cuatro desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)	DO densidad óptica
EDTA ácido etileno-diamino tetracético	ER endonucleasa de restricción
G guanina	g gramos
IPTG 1-isopropil-β-D-1-tiogalacto- piranósido	IS elemento de inserción
kan gen de resistencia a kanamicina	Kb kilobases (1000 pb)
Km Kanamicina	KDa kilodaltons
l litro	M molar
 mM milimolar	mm milímetros
Mb megabases	mb milibares
MCS <i>mutiple cloning site</i> (sitio de clonación múltiple)	mg miligramos
ml mililitros	MOPS ácido morfolinopropanosulfónico
mRNA RNA mensajero	NBT azul de nitrotetrazolio
ORF <i>open reading frame</i> (marco de lectura abierto)	ori origen de replicación
pb pares de bases	PCR Reacción en Cadena de la DNA Polimerasa
PEG polietilén glicol	pH logaritmo negativo de la concentración de hidrogeniones
r.p.m. revoluciones por minuto	R indica resistencia
RNA ácido ribonucleico	RNasa ribonucleasa
RNAr RNA ribosomal	SSC tampón de cloruro y citrato de sodio
SDS dodecilsulfato sódico	T timina
TAE tampón tris-acetato	Tn transposón
Tris tris (hidroximetil) aminometano	Tris-HCl hidrocloruro de Tris
U uracilo	UV ultravioleta
V voltios	wt cepa silvestre
X-Gal 5-bromo,4-cloro,3-indolil-β-D-galactopiranósido	µg microgramos
:: indica que la cepa contiene el plásmido señalado	

Aminoácidos

Ala	Alanina	A
Arg	Arginina	R
Asn	Asparragina	N
Asp	Acido Aspártico	D
Cys	Cisteína	C
Gln	Glutamina	Q
Glu	Acido Glutámico	E
Gly	Glicina	G
His	Histidina	H
Ile	Isoleucina	I
Leu	Leucina	L
Lys	Lisina	K
Met	Metionina	M
Phe	Fenilalanina	F
Pro	Prolina	P
Ser	Serina	S
Thr	Treonina	T
Trp	Triptófano	W
Tyr	Tirosina	Y
Val	Valina	V

1

Introducción

1. Introducción

1.1 Características generales de corinebacterias

Las corinebacterias son bacilos Gram-positivos, pleomórficos, no ramificados, no esporulados, catalasa positivos, oxidasa negativos, cuyo tamaño oscila entre 2-6 µm de longitud y 0.5 µm de diámetro. En función de los requerimientos de oxígeno, se pueden dividir en bacterias aerobias o anaerobias facultativas, grupo en el que se incluyen los géneros *Brevibacterium* y *Corynebacterium* respectivamente; y bacterias anaerobias o aerotolerantes, como es el caso de los géneros *Eubacterium* y *Propionibacterium* (Jones y Collins, 1986). El pleomorfismo en su ciclo de vida se observa en formas bacilares de longitud diversa y frecuentes engrosamientos en los extremos, estando marcadamente influido por las condiciones del cultivo (Cure y Keddie, 1973).

Sneath y col. (1986) en la novena edición del manual Bergey, incluyen a las corinebacterias en la sección 15 que engloba una diversa colección de 22 géneros. La inclusión de las corinebacterias en esta sección se basó más en criterios prácticos (Jones y Collins, 1986), que en fuertes relaciones filogenéticas entre las corinebacterias y los géneros restantes. Basándose en la composición de su pared, las corinebacterias parecen estar próximas filogenéticamente a *Mycobacterium* y *Nocardia* (Barksdale, 1970). A partir de estudios de RNAr 16S de un gran número de microorganismos, se ha agrupado a las corinebacterias en la subdivisión de eubacterias Gram-positivas de alto contenido en G+C, en estrecha relación filogenética con *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e incluso *Streptomyces* (Woese, 1987); Goodfellow (1989) define a su vez el grupo de actinomicetos nocardiformes el cual contiene los géneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Tsukanella*, y cuya característica principal es la presencia en la pared celular de ácidos micólicos y sus derivados. En concordancia con los criterios filogenéticos indicados, en la nueva edición del Manual Bergey (de próxima aparición y que contiene 30 secciones distribuidas en 5 volúmenes) las corinebacterias aparecen en el volumen 4, sección XXIII, conjuntamente con el resto de microorganismos Gram-positivos de elevado contenido en G+C en lo que constituye la clase *Actinobacteria* y enclavándose dentro del suborden *Corynebacterineae* (Garrity y col., 2002) (Fig. 1.1.).

Dominio *Bacteria*

- Phylum *Actinobacteria* phy. nov.
 - Clase I. *Actinobacteria* (Bacterias Gram-positivas de alto contenido en G+C)
 - Subclase V. *Actinobacteridae*
 - Orden I. *Actinomycetales*
 - Suborden V. *Actinomycineae*
 - Familia I. *Actinomycetaceae*
 - Género I. *Actinomyces*
 - Género III. *Arcanobacterium*
 - Suborden VI. *Micrococcineae*
 - Familia I. *Micrococcaceae*
 - Género I. *Micrococcus*
 - Género II. *Arthrobacter*
 - Familia V. *Brevibacteriaceae*
 - Género I. *Brevibacterium linens*
 - Familia VI. *Cellulomonadaceae*
 - Género I. *Cellulomonas*
 - Familia XII. *Microbacteriaceae*
 - Género I. *Microbacterium*
 - Género III. *Agromyces*
 - Género IV. *Aureobacterium*
 - Suborden VII. *Corynebacterineae*
 - Familia I. *Corynebacteriaceae* (Bacterias corineiformes)
 - Género I. *Corynebacterium*
 - *Corynebacterium diphtheriae*
 - *Corynebacterium glutamicum*
 - Familia IV. *Mycobacteriaceae*
 - Género I. *Mycobacterium*
 - Familia V. *Nocardiaceae*
 - Género I. *Nocardia*
 - Género II. *Rhodococcus*
 - Suborden IX. *Propionibacterineae*
 - Familia I. *Propionibacteriaceae*
 - Género I. *Propionibacterium*
 - Suborden XI. *Streptomycineae*
 - Familia I. *Streptomycetaceae*
 - Género I. *Streptomyces*
 - Suborden XIII. *Frankineae*
 - Familia I. *Frankiaceae*
 - Género I. *Frankia*

Figura 1.1.- Algunos de los microorganismos más importantes englobados en el orden *Actinomycetales* según el “Taxonomic Outline of the Prokaryotes, Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology Second Edition” (<http://www.springer-ny.com/bergeysoutline/main.htm>).

Las corinebacterias están ampliamente distribuidas en la naturaleza encontrándose en el suelo, el agua y también en la mucosa y piel del hombre y animales. Algunas especies pertenecientes a este grupo son conocidas por sus efectos patógenos en humanos y otros animales, así como por su patogenicidad en plantas; la especie patógena de corinebacterias más conocida es *Corynebacterium diphtheriae*, que adquiere la capacidad de producir la toxina diftérica cuando es lisogenizada por el fago β (Costa y col., 1981). Otras especies patógenas del hombre son: *Corynebacterium amicolum*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium*

urealyticum y *Corynebacterium xerosis* (Oteo y col., 2001; Lagrou y col., 1998; Boc y Martone, 1995; Pitcher y col., 1992; Kono y col., 1983); todas estas especies son patógenos de especial relevancia en pacientes inmunodeprimidos. Entre las especies patógenas de otros animales destacan: *Corynebacterium bovis*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Corynebacterium renale*, y *Rhodococcus equi* (Watts y col., 2001; Fernández y col., 2001; Hirsbrunner y col., 1996; Vengust y col., 2002).

Carlson y Vidaver (1982) reconocieron la existencia de 14 especies de corinebacterias fitopatógenas, siendo las más conocidas *Corynebacterium fascians*, *Corynebacterium flaccumfaciens* y *Corynebacterium michiganensis* como causantes de graves infecciones en diferentes especies de plantas, generando de esta forma graves pérdidas en la agricultura. Actualmente todos los géneros de corinebacterias fitopatógenas del género *Corynebacterium* han sido reclasificados, pasando a los géneros *Curtobacterium*, *Rhodococcus* y *Clavibacter* en la mayoría de los casos (Goodfellow, 1984; Davis y col., 1984). Así pues la nueva clasificación engloba a *Rhodococcus fascians*, causante de fasciación e hiperplasias en una extensa variedad de plantas (Cornelis y col., 2002), *Curtobacterium flaccumfaciens*, que provoca marchitamientos en alubias, remolacha (Tegli y col., 2002) y *Clavibacter michiganensis*, causante de marchitamiento y roya en plantas de patata y tomate (Brown y col., 2002).

Un grupo de corinebacterias no patógenas presenta la capacidad de excretar ácido glutámico en grandes cantidades, por lo que al grupo se le denominó bacterias del ácido glutámico e incluyen especies de los géneros *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, y *Arthrobacter* (Abe y col., 1967). Este grupo de bacterias presenta un estrecho rango de contenido en G+C en el DNA total (53-56 %) y elevada similitud morfológica. Las especies no patógenas de corinebacterias son utilizadas en procesos industriales de gran relevancia, como los ya indicados de producción de aminoácidos (Aida y col., 1986; Yamada y col., 1972), en la producción de nucleótidos y otros factores nutricionales (Martín, 1989), bioconversión de esteroides (Constantinides, 1980), degradación de hidrocarburos (Cooper y col., 1979), maduración de quesos (Lee y col., 1985), producción de enzimas (Khurana y col., 2000) y otros procesos con interés desde el punto de vista aplicado. Algunas especies son productoras de metabolitos semejantes a los antibióticos: bacteriocinas del tipo corinecinas-linocinas (Kerry-Williams y Noble,

1984; Suzuki y col., 1972; Valdes-Stauber y Scherer, 1996), agentes antitumorales (Milas y Scott, 1978), etc.

1.1.1 Características generales del género *Corynebacterium*

El género *Corynebacterium* fue creado por Lehmann y Neumann (1896) para clasificar taxonómicamente a los bacilos de la difteria, incluyendo posteriormente otras especies similares parásitas de animales. El género fue definido en base a características morfológicas, *corynebacteria* proviene del griego κορυνη (corunē): bastón nudoso y, βακτεριον (bacterion): bastoncillo.

El género *Corynebacterium* es muy diverso y contiene especies importantes desde el punto de vista médico, así como saprófitos y especies no patógenas utilizadas en procesos industriales; sus hábitats son muy variados, pudiendo aparecer en heces, suelo, piel, plantas, etc., y están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Las características más relevantes de este género fueron descritas por Collins y Cummins (1986), y coinciden con las características generales descritas para corinebacterias: Gram-positivas, no esporuladas, que carecen de movilidad, bacilos rectos o ligeramente curvados, a menudo con la típica forma de V (lo que también se denomina “forma de letras chinas”), aunque también aparecen formas elipsoidales, son aerobias o anaerobias facultativas, catalasa positivas, quimioorganotrofos, con un contenido en G+C entre 51–65%. Presentan ácido mesodiaminopimélico en el tetrapéptido de la mureína y en su pared están presentes arabino-galactanos y ácidos corinemicólicos (ácidos micólicos de 22 a 36 átomos de carbono) (Fig. 1.2).

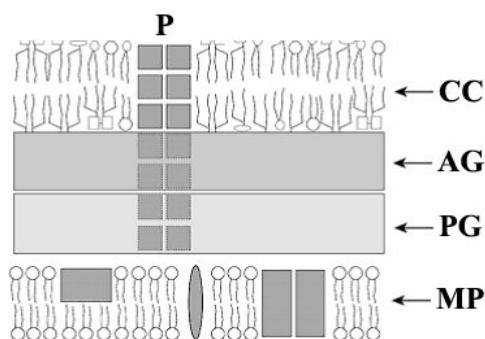


Figura 1.2.- Pared celular de *Corynebacterium*. **MP:** membrana plasmática; **PG:** peptidoglucano o mureína; **AG:** arabino-galactanos; **CC:** capa cérea contenido ácidos corinemicólicos; **P:** porina (Puech y col., 2001).

Con respecto a la especie *Corynebacterium glutamicum* originalmente se denominó *Micrococcus glutamicus*; el término *Micrococcus* se debe a que en fase tardía del crecimiento exponencial y en la fase estacionaria, pasan a tener un aspecto de bacilo corto o incluso cocoide, perdiendo el aspecto bacilar característico de la fase temprana de crecimiento exponencial. El término *glutamicus* se debe a su capacidad de producir ácido glutámico en condiciones aeróbicas (Abe y col., 1967). *C. glutamicum* es un bacilo que aparece de forma individual, en parejas, o formando masas irregulares; la morfología de las colonias cuando crecen sobre agar es de aspecto suave, circular y de color amarillento, siendo el rango de temperatura óptima de crecimiento entre 25 y 37°C. Con respecto a los requerimientos nutricionales, todos ellos necesitan biotina para su crecimiento y algunas cepas requieren además tiamina y ácido *p*-aminobenzoico (PABA) (Collins y Cummins, 1986).

1.2 Genética y biología molecular de las corinebacterias

Desde los años 80 las corinebacterias han sido objeto de especial atención en el campo de la ingeniería genética y la biología molecular y fruto de ello ha sido el desarrollo de sistemas de clonación molecular que han servido para estudiar en profundidad aspectos básicos de la biología de este grupo de bacterias. Los estudios iniciales usando la temperatura de fusión del DNA cromosómico (T_m) de algunos de sus representantes del grupo permitió estimar el tamaño del cromosoma en unas 3.000 Kb (Wallace y Morowitz, 1973). Estudios más detallados utilizando técnicas de electroforesis en campo pulsante determinaron de forma más precisa el tamaño del genoma de algunas especies pertenecientes a este grupo: 3.082 Kb para *Corynebacterium glutamicum* (Bathe y col., 1996), 2.850 Kb para *Brevibacterium ammoniagenes* (Bak y col., 1970; Crombach, 1978) y 3.105 Kb para *Brevibacterium linens*. Recientemente se ha descrito la secuenciación del genoma completo de *Corynebacterium glutamicum* y el tamaño del genoma ha resultado ser de 3.309 Kb (Nakagawa y col., 2000).

El desarrollo de un sistema de clonación molecular en corinebacterias implicó la utilización de una serie de herramientas y técnicas de uso común como fueron: A) búsqueda de vectores endógenos o funcionales en corinebacterias B) desarrollo y optimización de los procesos de transferencia de material genético a las corinebacterias.

1.2.1 Vectores de clonación

1.2.1.1 Plásmidos

En sus inicios no se conocían vectores capaces de replicar en corinebacterias, por lo que se hizo necesaria una búsqueda de plásmidos endógenos. Los primeros plásmidos se aislaron de cepas de corinebacterias procedentes de pacientes y contenían marcadores de resistencia a antibióticos (Fig. 1.3). Sin embargo, aunque estos plásmidos contienen marcadores fenotípicos de fácil selección, su manipulación no resultaba útil debido a su gran tamaño y a su bajo número de copias.

Plásmidos	Cepa de origen	Tamaño (Kb)	Fenotipo de resistencia
pXZ10145	<i>C. glutamicum</i>	5,3	Cm
png2	<i>C. diphtheriae</i>	14,4	Em
pAG1	<i>C. melassecola</i>	20,4	Tc
PCG4	<i>C. glutamicum</i> ATCC31830	29	Sm, Spc
PTP10	<i>C. xerosis</i>	45	Tc, Cm, Em, Sm
PDG101	<i>C. flaccumfaciens</i> subsp. <i>oorti</i>	69	Arsenito, Arseniato,
Antimonio			

Figura 1.3.- Plásmidos de resistencia en *Corynebacterium* (Deb y Nath, 1999). Cm, cloramfenicol; Sm, estreptomicina; Em, eritromicina; Spc, espectinomicina; Tc, tetraciclina.

Plásmidos	Especie	Tamaño (Kb)	Origen
pCR1	<i>C. renale</i>	1,4	Animal
pHM1519	<i>C. glutamicum</i> ATCC13058	2,7	Suelo
pSR1	<i>C. glutamicum</i> ATCC13058	3	Suelo
pCG100	<i>C. glutamicum</i> ATCC13058	3	Suelo
pCG1	<i>C. glutamicum</i> ATCC13058	3,2	Suelo
pCL1	<i>C. lilium</i>	4,1	Suelo
pCC1	<i>C. callunae</i> NRRLB2244	4,2	Suelo
pBL1	<i>B. lactofermentum</i> ATCC13869	4,4	Suelo
pWS101	<i>B. lactofermentum</i> ATCC13869	4,4	Suelo
pGX1901	<i>B. lactofermentum</i> ATCC13869	4,4	Suelo
pX18	<i>B. lactofermentum</i> ATCC21086	4,5	Suelo
pBL100	<i>B. linens</i> CECT75	7,5	Suelo
pRBL1	<i>B. linens</i> RBL	8	Suelo

Figura 1.4.- Plásmidos crípticos de pequeño tamaño en los géneros *Corynebacterium* y *Brevibacterium* (Deb y Nath, 1999).

La mayor parte de los plásmidos endógenos de pequeño tamaño son crípticos, careciendo de marcadores fenotípicos que puedan ser utilizados para la selección de colonias transformantes. Los vectores de clonación para corinebacterias se construyeron ligando pequeños plásmidos (crípticos) aislados de corinebacterias (Fig. 1.4) con otros vectores construidos para otros microorganismos, que llevaban marcadores fácilmente seleccionables.

La primera generación de vectores de clonación para corinebacterias fue descrita por Santamaría y col. (1984) utilizando los plásmidos pBL1 y pBR322 y posteriormente se introdujo el gen de resistencia a kanamicina del transposón Tn5. Vectores de clonación más eficaces conteniendo un segundo marcador fueron desarrollados por Santamaría y col. (1987) a partir del replicón pBL1, obteniendo los plásmidos pULRS6 (resistencias a kanamicina e higromicina) y pULRS8 (resistencias a kanamicina y cloranfenicol).

En *Corynebacterium glutamicum* se expresaron todos los marcadores de resistencia introducidos, pero en la mayoría de los casos resultaron ser marcadores de selección poco eficaces, ya que los niveles existentes de las enzimas inactivadoras de los distintos antibióticos eran muy inferiores a los que se detectan en *Escherichia coli*.

En una siguiente fase se diseñaron vectores sonda para la clonación de promotores en corinebacterias, como el plásmido bifuncional (*E. coli*-corinebacterias) pEB003 (Morinaga y col. 1987a), así como otros vectores sonda de promotores que contenían diferentes genes testigo (Barák y col., 1990; Cadenas y col., 1991 y 1996).

El rango de hospedadores de los plásmidos de corinebacterias suele ser estrecho, sin embargo algunos de los plásmidos analizados han sido capaces de replicar y mantenerse estables en hospedadores heterólogos; este es el caso del plásmido pCG4 de *Corynebacterium glutamicum*, introducido en *Corynebacterium herculis*, *Brevibacterium flavum* y *Mycobacterium ammoniaphilum* (Katsumata y col., 1984), o derivados del pBL1 que transforman *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium callunae*, *Brevibacterium linens* (Santamaría y col., 1985) y *Rhodococcus fascians* (Fernández-González y col., 1994).

1.2.1.2 Fagos y sus derivados

Ozaki y col. (1984) describieron tres fagos de *C. glutamicum* (Φ CG1, Φ CG3 y Φ CG5) que transfecan protoplastos de *Corynebacterium*, *Brevibacterium* y *Microbacterium*. Otros autores han descrito nuevos fagos para su utilización en sistemas de clonación en corinebacterias (Smith y col., 1986; Trautwetter y Blanco, 1988). El fago temperado Φ 16 de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21792 ha sido usado en la construcción de un vector de integración (Moreau y col., 1999), mientras que otros fagos han sido desarrollados con objeto de usarlos para la clonación de secuencias con

actividad promotora y terminadora (Koptides y col., 1992). Miwa y col. (1985) han descrito el primer cósmido de corinebacterias.

1.2.1.3 Transposones y elementos de inserción

Se han identificado en *C. glutamicum* los elementos de inserción IS1206 (Bonamy y col., 1994), IS31831 (Vertés y col., 1994) e ISCg2 (Quast y col. 1999); los dos primeros describieron a su vez la construcción de dos transposones artificiales, Tn31831 y miniTn31831 que pueden ser utilizados para producir mutagénesis por inserción en este grupo de microorganismos. En *B. lactofermentum* se ha descrito el elemento de inserción IS13869 que presenta una elevada homología con los descritos para *C. glutamicum* (Correia y col., 1996).

1.2.2. Métodos de introducción de DNA exógeno en corinebacterias

Este es un proceso clave en el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética que en el caso de las corinebacterias su dificultad se ve incrementada debido a la composición y complejidad de la pared celular.

1.2.2.1 Transformación de protoplastos

Los primeros métodos de transformación de estas bacterias se basaron en la obtención de protoplastos que fueron obtenidos por primera vez por Kaneko y Sakaguchi en 1979. Los protocolos para transformar protoplastos de corinebacterias han sido descritos por Santamaría y col. (1984 y 1985), Katsumata y col. (1984), Yoshihama y col. (1985). Estos protocolos implican degradación parcial de la pared celular con lisozima, captación del DNA por los protoplastos mediado por PEG y posterior regeneración y selección de los protoplastos transformados. La acción de la lisozima es facilitada al crecer las células al principio de la fase logarítmica en presencia de penicilina en el caso de *Brevibacterium* o de glicina en el caso de *Corynebacterium*.

1.2.2.2 Electroporación o electrotransformación

La eficiencia de transformación se ve incrementada cuando las células son sometidas a pulsos eléctricos de alto voltaje, denominándose a este proceso electroporación o electrotransformación. Un gran número de autores ha descrito las condiciones de cultivo de las células y los parámetros óptimos para obtener una alta

eficiencia de transformación en diferentes especies de corinebacterias (Duncan y Shivnan, 1989; Kurusu y col., 1990; Hayness y Britz, 1990; Bonnassie y col., 1990; Van der Rest y col., 1999), siendo algunas de las constantes la recolección de las células en fases tempranas del crecimiento exponencial y la utilización de agentes que sensibilicen la pared (glicina, penicilina, etc.).

Los sistemas de restricción presentes en corinebacterias constituyen una barrera para la entrada eficiente de DNA exógeno. Estos sistemas se pueden contrarrestar por calentamiento de los protoplastos a 48-49°C durante diez minutos antes de ser transformados (Thierbach y col., 1988).

1.2.2.3 Conjugación

La conjugación entre bacterias Gram-negativas y corinebacterias fue descrita por primera vez por Schäfer y col. (1990); estos autores conjugaron eficientemente diversas cepas de corinebacterias utilizando *E. coli* S17-1 como cepa donadora en el proceso y diferentes especies de corinebacterias como receptoras. La eficiencia de transferencia mediante conjugación en *C. glutamicum* se incrementa mediante un pretratamiento de las células receptoras con calor, solventes orgánicos, cambios de pH o detergentes (Schäfer y col., 1994).

1.2.3 Clonación de genes de corinebacterias

Hasta ahora, se han aislado y caracterizado un número importante de genes procedentes de corinebacterias, con una amplia representación de genes cuyos productos están implicados en la biosíntesis de metabolitos de interés industrial, especialmente aminoácidos (Cremer y col., 1990, 1991; Ishino y col. , 1987; Kalinowski y col., 1990; Yeh y col., 1988a, 1988b). El desarrollo de los sistemas de clonación en corinebacterias ha permitido, por lo tanto la clonación, caracterización y expresión de estos genes, pudiendo así esclarecer los mecanismos que regulan los procesos de expresión génica y contribuyendo de esta forma al conocimiento de los procesos de biosíntesis de aminoácidos en corinebacterias.

Las estrategias empleadas para la clonación de genes de corinebacterias han sido variadas y en algunos casos no exentas de ingenio; a continuación se enumeran los

procedimientos más utilizados: (i) complementación heteróloga de auxótrofos de *E. coli*, (ii) complementación homóloga de auxótrofos, (iii) hibridación de DNA total con sondas homólogas, (iv) clonación mediante amplificación de secuencias por PCR, (v) detección de la actividad enzimática codificada por el gen, (vi) efecto del número de copias del gen clonado en la resistencia a análogos de aminoácidos.

1.2.4 Expresión de genes en corinebacterias

Como se ha indicado anteriormente uno de los sistemas de clonación de genes ha sido la clonación y expresión heteróloga de los genes de corinebacterias en *E. coli* (Mateos y col, 1987; Guerrero y col., 1988; Eikmanns y col. 1992), siendo esta una prueba de que los genes de corinebacterias son eficientemente expresados en otros hospedadores, al igual que genes de *E. coli* y algunos otros microorganismos han sido expresados eficientemente en corinebacterias (Katsumata y col., 1982; Tsuchiya y Morinaga, 1988; Smith y col., 1986; Archer y col., 1989; Paradis y col., 1987; Cadenas y col., 1992). No ocurre lo mismo con la expresión de genes de *Streptomyces* en corinebacterias, donde parece existir una barrera transcripcional; en ocasiones esta barrera se ha evitado por sustitución de las regiones reguladoras originales por promotores funcionales en corinebacterias (Cadenas y col., 1992).

1.2.4.1 Regiones reguladoras: Promotores, operadores y terminadores

Los análisis de regiones del DNA adyacentes a los genes en corinebacterias han puesto de manifiesto la existencia de cajas promotoras análogas a las descritas para los promotores de *E. coli*, presentando en la caja -10 la secuencia consenso TATAAT (Pribnow y col., 1975) y una caja -35 con la secuencia consenso TTGACA localizada a una distancia de 17 ± 1 nucleótidos de acuerdo a un estudio estadístico donde se compararon secuencias promotoras de *E. coli* (Rosenberg y Court, 1979; Hawley y McClure, 1983). El factor σ principal de la RNA polimerasa se unirá a la caja -35 cubriendo una región del DNA que va desde el nucleótido -60 al -1. El proceso de desnaturalización se producirá en la caja -10 (por su abundancia en AT), iniciándose el transcripto en el nucleótido +1 que suele coincidir con un purina (AG). La actividad de un promotor también depende de las secuencias que se encuentran fuera de las cajas, aumentando o disminuyendo su fuerza relativa (Pérez-Martín y col., 1994). En corinebacterias la caja promotora -10 consenso se conserva frecuentemente, aunque no

suele ocurrir lo mismo ni con la caja -35 ni con la distancia existente entre cajas. Un estudio realizado por Pátek y col. (1996) en promotores de corinebacterias y corinefagos, indica la existencia de una secuencia consenso para la caja -10: $^{5'}\text{TANAAT}^{3'}$ con dos nucleótidos de guanina (GG) precediendo dicha caja. La caja -35 presenta la secuencia consenso $^{5'}\text{TTGCCA}^{3'}$, precedida por otra T, aunque esta caja está poco conservada. Entre las cajas, suele haber un alto porcentaje de A y T. Otros estudios adicionales realizados con regiones promotoras en corinebacterias, parecen indicar que nucleótidos adyacentes a la caja -10 (extensión de esta caja) pueden suplir la falta de consenso en la caja -35 (Vasicova y col. 1999). Esta diferencia podría explicar el que algunos genes de *E. coli* no se expresen en corinebacterias, y el que algunos promotores de genes de corinebacterias no sean reconocidos en *E. coli*.

En corinebacterias, al igual que ocurre en *E. coli* es habitual la existencia de regiones operadoras en agrupaciones génicas que conforman operones; algunos ejemplos de agrupamientos génicos con operadores corresponden a sistemas genéticos implicados en biosíntesis de aminoácidos (Guerrero y col., 1994).

Igualmente es habitual la presencia de regiones terminadoras de la transcripción en genes u operones de corinebacterias; han sido descritas secuencias atenuadoras en el operón del triptófano de *B. lactofermentum* (Sano y Matsui, 1987), y terminadoras en el RNA transcrita a partir de los genes *hom* y *thrB* (Folletie y col., 1988; Mateos, 1990), *lysA* (Yeh y col., 1988b) y del operón de triptófano de *B. lactofermentum* (Sano y Matsui, 1987), similares a los existentes en *E. coli*.

1.2.5 Mecanismos de regulación de la expresión génica a nivel de transcripción: inducción y represión catabólica

Un ejemplo importante de regulación de la expresión génica en procariotas donde no hay sistemas de control nervioso u hormonal es el que se lleva a cabo con enzimas implicadas en el catabolismo de determinadas fuentes de energía que se utilizan de forma ocasional por parte de las bacterias; para ello existen enzimas inducibles, en contraposición a las enzimas constitutivas (que siempre se expresan), las cuales sólo se detectan en presencia del sustrato metabolizable, por lo que la célula no “malgasta” energía sintetizando enzimas cuando no se encuentra presente dicho sustrato.

1.2.5.1 Sistemas inducibles y de represión catabólica

El ejemplo más estudiado de sistema inducible es el que tiene lugar con la lactosa; los genes que forman parte del operón de la lactosa codifican para una proteína reguladora (*lacI*: represor), una β -galactoxidasa (*lacZ*), una permeasa (*lacY*) y una transacetilasa (*lacA*). En presencia de lactosa, la proteína represora se une al inductor (lactosa) y no interacciona con el operador, por lo que la RNA polimerasa puede iniciar la transcripción a partir de la región promotora del operón (control negativo). Un sistema análogo es el que regula el catabolismo del ácido glucónico en los microorganismos estudiados; el ácido glucónico actúa de inductor uniéndose al represor y facilitando de esta forma la expresión de los genes del operón que transformará el glucónico en otros productos intermediarios del metabolismo.

El sistema de represión catabólica es un mecanismo de regulación más general que los sistemas inducibles y reprimibles, y suele ir asociado a operones implicados con el catabolismo de fuentes de carbono; cuando se encuentran dos nutrientes en el medio de cultivo, el hecho de metabolizar uno de ellos suele impedir el uso de la otra fuente de carbono. Este proceso se observó inicialmente con glucosa y con otra fuente de carbono presente en el cultivo, comprobando que primero se metaboliza la glucosa y luego el otro nutriente, por lo que al proceso se le solía denominar efecto glucosa. El término “represión catabólica” fue introducido por Magasanik (1970) definiéndolo como el fenómeno en que la presencia de determinados componentes en el medio reprime la expresión de determinados genes u operones. El fundamento consiste en que en presencia de glucosa los niveles de adenilato ciclase (enzima formadora de AMPc) eran escasos; en ausencia de glucosa una proteína reguladora del catabolismo (CRP o también CAP) interacciona con AMPc y se unen a una región reguladora específica (CBS) del operón correspondiente a la fuente de carbono inducible favoreciendo los procesos de transcripción. Se trata en este caso de un sistema de control positivo que no tendrá lugar en presencia de glucosa porque los bajos niveles de AMPc impedirán la formación del complejo AMPc-CRP y su interacción con CBS. La secuencia de nucleótidos consenso presente en la región CBS de operones implicados en el catabolismo de azúcares (lactosa, maltosa, arabinosa, etc.) de procariotas es la siguiente: $^5'TGTGA-6N-ACACT^3'$, siendo N cualquier nucleótido y estando menos conservado el pentanucleótido del extremo 3' (De Crombrugghe y col., 1984).

1.3 Metabolismo del ácido glucónico en bacterias

Una gran cantidad de microorganismos, así como la gran mayoría de las células animales se comportan desde el punto de vista nutricional como quimioorganotrofos, utilizando compuestos químicos orgánicos como fuente de carbono y fuente de energía. Los azúcares suelen utilizarse como nutrientes fácilmente metabolizables por una enorme variedad de organismos, siendo la glucosa el metabolito estrella para explicar los procesos metabólicos que ocurren en una célula, principalmente debido a la presencia de enzimas constitutivas que permiten su rápida utilización. Los ácidos orgánicos suelen estar en un estado de oxidación mayor que los azúcares por la presencia de un grupo carboxílico en la molécula, en comparación con el grupo carbonilo (aldehído o cetona) presente en los azúcares.

El ácido glucónico es un ácido azucarado de 6 átomos de carbono (Fig. 1.5) que se suele encontrar en el intestino de animales carnívoros procedente bien de la propia dieta, o a partir de las secreciones de las células del epitelio intestinal en forma de “mucus”; los ácidos glucónico y cetoglucónico se encuentran en tejido muscular, siendo generados por procesos de oxidación (Farber y Idziak, 1982).

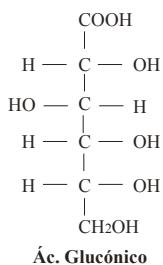


Figura 1.5.- Formula estructural del ácido glucónico.

El ácido glucónico penetra dentro de la bacteria atravesando la pared celular y utilizando un mecanismo específico de transporte en la membrana (permeasa de glucónico), para posteriormente ser fosforilado a 6-fosfoglucónico mediante una kinasa. El ácido 6-P-glucónico se podrá incorporar a dos rutas del metabolismo central de las células: (i) puede ser catabolizado a través de la vía de las pentosas fosfato que le conducirá a la producción de metabolitos precursores de cinco y cuatro átomos de carbono (pentosa-fosfato y eritrosa-fosfato), así como obtención de poder reductor en forma de NADPH necesario para los procesos de biosíntesis; (ii) o bien puede

incorporarse a la vía de Entner-Doudoroff (Entner y Doudoroff, 1952) vía catabólica alternativa a la ruta de Embden-Meyerhof (glucólisis) presente en algunos microrganismos procariotas (Fig. 1.6). Tal es el caso de algunas especies del género *Pseudomonas* como *P. putida* (Schleissner y col., 1997), *P. aeruginosa*, *P. doudoroffii* y otras (Lessie y Phibbs, 1984).

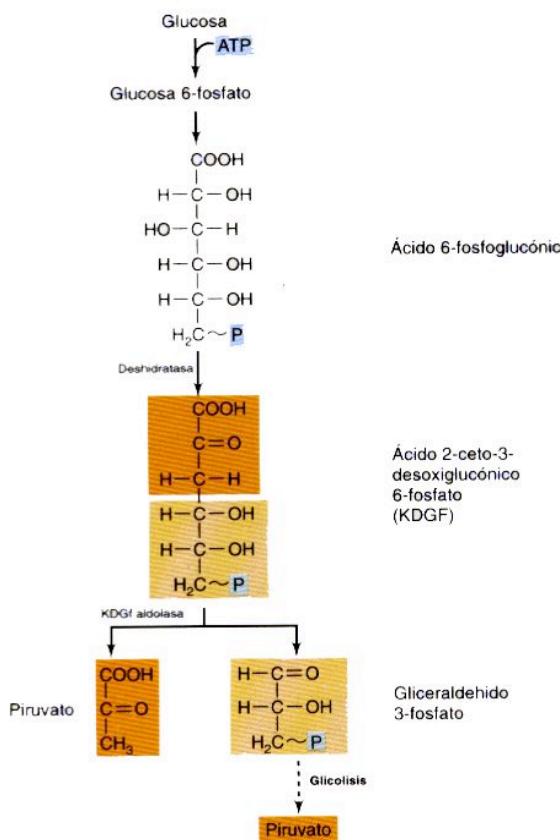


Figura 1.6.- Vía Entner-Doudoroff (Madigan y col., 1997).

Dependiendo del tipo de microorganismo de que se trate, la entrada de glucosa en la célula se realizará utilizando distintos mecanismos; si la entrada se realiza mediante un transporte activo con gasto de ATP, la glucosa entra como tal en la célula, se fosforila y posteriormente mediante la acción de una glucosa oxidasa la transforma en 6-P-gluconolactona que de forma espontánea se transformará en ácido glucónico. En caso de incorporación de glucosa mediante un mecanismo de translocación de grupo, esta se acoplaría al sistema PTS (sistema de la fosfo-transferasa) mediante el cual el ácido fosfoenolpirúvico se convierte en pirúvico y dona el grupo fosfato a la glucosa generando así glucosa 6-fosfato. La oxidación de glucosa 6-P por la acción de la enzima glucosa 6-P-deshidrogenasa generará 6-P-glucónico que servirá de sustrato para la ruta

de las pentosas fosfato y la de Entner-Doudoroff. Un esquema de los compuestos iniciales, algunos productos intermediarios y las principales enzimas implicadas se puede ver en la Figura 1.7.

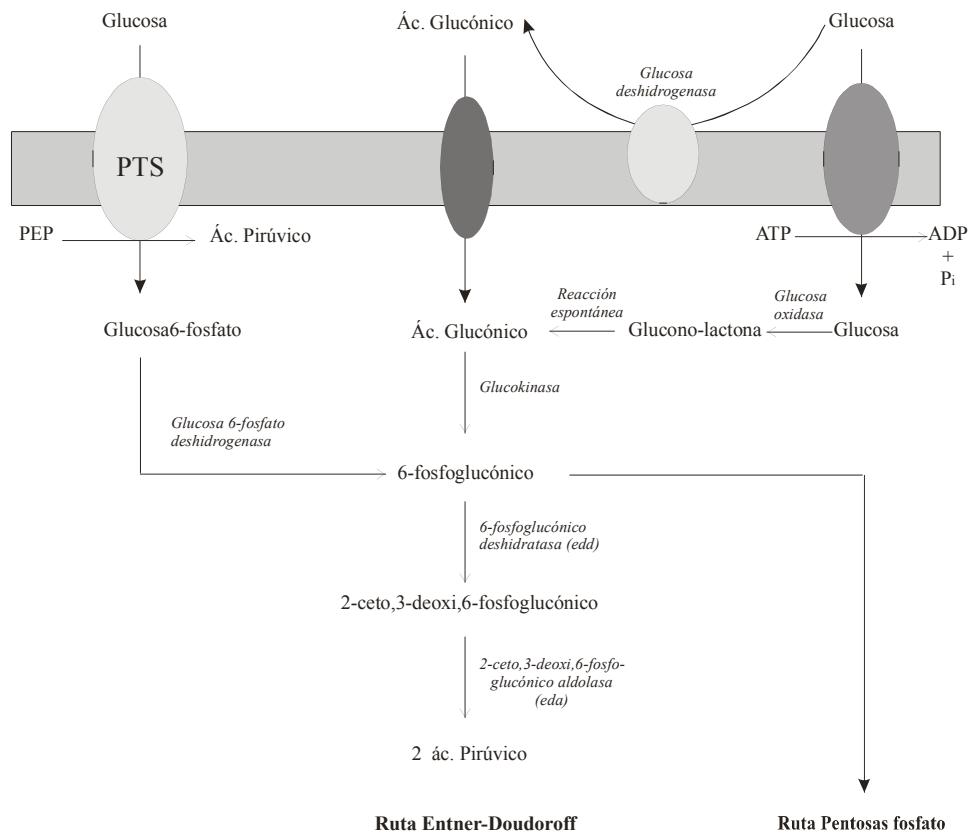


Figura 1.7.- Formas de entrada de glucosa y sus destinos catabólicos.

Algunos microorganismos curiosamente no son capaces de interiorizar glucosa de forma directa, sino que previamente deben oxidar la glucosa a ácido glucónico mediante la acción de una enzima glucosa deshidrogenasa para poder interiorizar el metabolito; esto se ha observado en un importante número de especies de *Pseudomonas* las cuales presentan una deshidrogenasa constitutiva asociada a la membrana (Schleissner y col., 1997). En algunos hongos filamentosos como *Aspergillus* y *Penicillium* se ha observado un mecanismo análogo con la presencia de una glucosa deshidrogenasa o una glucosa oxidasa asociada a la superficie celular (Witteveen y col., 1990), presente en peroxisomas o libre en el caldo de cultivo. Algunos microorganismos que presentan glucosa oxidasa utilizan como cofactor flavín adenin dinucleótido (FAD), el cual en su forma reducida (FADH_2) cede los electrones al oxígeno y forma peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que a su vez presenta actividad antimicrobiana.

1.4 Genes implicados en el metabolismo del glucónico en bacterias

Los genes implicados en el metabolismo del glucónico (genes *gnt*) se han estudiado de forma detallada en *E. coli* y *Bacillus subtilis*, donde se ha observado su disposición en operones. A continuación se explicará su organización cromosómica en los dos microorganismos indicados.

1.4.1 Genes *gnt* en *Escherichia coli*

El ácido glucónico es un nutriente muy importante para *E. coli* en su ambiente natural que es el intestino de mamíferos; hasta el comienzo de la década de los años 90, todo el conocimiento del metabolismo del glucónico en *E. coli* se basaba en aproximaciones genéticas tradicionales (Bächi y Kornberg, 1975; Istúriz y col., 1986), encontrándose que los pasos iniciales del catabolismo estaban catalizados por las enzimas permeasa y kinasa para generar el producto intermedio 6-P-glucónico. En *E. coli* el precursor 6-P-glucónico puede seguir la vía de las pentosas fosfato o bien la vía de Entner-Doudoroff (Egan y col., 1992). Por otra parte, en el metabolismo de glucónico de *E. coli* se ha observado la presencia de más de una enzima para realizar la misma transformación bioquímica, describiéndose la existencia de varias enzimas con actividad gluconato permeasa y varias con actividad gluconato kinasa, estando en todo caso cada una de ellas sometidas a distintos tipos de regulación como se comentará a continuación.

Hasta hace pocos años se mencionaba la existencia de dos sistemas implicados en el metabolismo de glucónico, considerando a uno de ellos un sistema específico que se localiza en la región del minuto 77 de su mapa físico (GntI), mientras que al otro (GntII) se le consideraría un sistema inespecífico o secundario. Los primeros genes adscritos al sistema GntI fueron publicados por Tong y col., (1996), señalando la existencia de un agrupamiento de genes *gntR-gntK-gntU* que codifican para una proteína reguladora, una gluconato kinasa y una permeasa respectivamente. En relación con el mecanismo de regulación de la expresión, el gen mRNA transcrita a partir del *gntR* es monocistrónico y se expresa de forma constitutiva, mientras que los genes *gntUK* conforman un operón inducible por glucónico y sometido a represión catabólica. En el sistema principal de

glucónico (GntI) también se encuentra una actividad gluconato permeasa de alta afinidad codificada por el gen *gntT* y que se localiza en el minuto 76,5 del mapa genómico de *E. coli*, pero no adyacente al cluster de genes *gntRKU* (Porco y col., 1997; Izu y col., 1997); el gen *gntT* está regulado negativamente por la presencia de una molécula represora (producto del gen *gntR*) actuando como inductor el ácido glucónico o el 6-P-glucónico (inducible de control negativo), y sobre este gen existe un sistema de regulación global mediante represión catabólica.

Un aspecto llamativo consiste en que una región promotora-operadora inducible por glucónico controla la expresión de los genes del operón *edd-eda* que participan en la formación de las enzimas 6-P-glucónico-deshidratasa y 2-ceto-3-desoxi-6-P-glucónico-aldolasa respectivamente, pertenecientes a la vía de Entner-Doudoroff, que están negativamente regulados por el represor producto del gen *gntR* (Egan y col., 1992).

Un análisis reciente de las secuencias nucleotídicas presentes aguas arriba del gen *gntT* ha revelado la existencia de dos marcos abiertos de lectura de 729 y 573 pb que mediante estudios de complementación se ha visto su implicación en el metabolismo de glucónico, denominando a los genes correspondientes *gntX* al marco mayor y *gntY* al menor (Porco y col., 1998). Según estos estudios los genes *gntX-Y* conforman un operón cuyo control está ejercido por el represor producto del gen *gntR* y que por lo tanto formaría parte del regulón GntR. Los productos de los genes *gntX-gntY* se corresponden con una proteína periplásmica con especificidad por glucónico y una proteína de unión a membrana respectivamente, que conjuntamente con la permeasa de glucónico (*gntT*) parecen conformar un sistema de transporte para glucónico de alta afinidad análogos a los sistemas de transporte TRAP (Rabus y col., 1999). Podemos hablar por tanto de la existencia del regulón GntR que comprende el sistema GntI, el operón *gntXY* y el operón *edd-eda*, gobernados por la misma molécula reguladora, por lo que mutantes afectados en el gen *gntR*, expresarán los genes implicados en glucónico y los de la vía de Entner-Doudoroff de forma constitutiva.

Se ha descrito la existencia de otra actividad gluconato permeasa de alta afinidad independiente del sistema GntI, cuyo gen *gntP* se ha localizado en el minuto 98 (Klemm y col., 1996); la expresión del gen es monocistrónica, pero a diferencia de las anteriores permeasas su expresión no se induce por la adición de glucónico, aunque si que existe

un fuerte mecanismo de represión catabólica cuando se cultiva el microorganismo en presencia de glucónico y otros azúcares.

Un sistema alternativo implicado en el metabolismo de glucónico en *E. coli* llamado GntII había sido descrito en la década de los años 80 (Istúriz y col., 1986), el cual se localizaba en la región del minuto 96 del mapa genético y que contenía al menos los genes *gntS* y *gntW* (permeasas de alta afinidad), *gntV* (glucokinasa termosensible) y con mecanismos de regulación de la expresión totalmente distintos a los descritos para el sistema GntI. La secuenciación reciente del genoma de *E. coli* permitió conocer los posibles marcos de lectura existentes en la región del minuto 96 del cromosoma, lo que ha llevado a postular una nueva ruta metabólica implicada en el catabolismo del ácido L-idónico, y donde el ácido glucónico es un producto intermediario en el catabolismo de idónico que desemboca en la vía de Entner-Doudoroff (Bausch y col., 1998); en este caso, los genes encontrados (designados *idn*) además de los que presuntamente participaban en glucónico, *idnT* (permeasa) e *idnK* (gluconokinasa termosensible) existen otros genes con actividades: deshidrogena (*idnD*), reductasa (*idnO*) y reguladora (*idnR*).

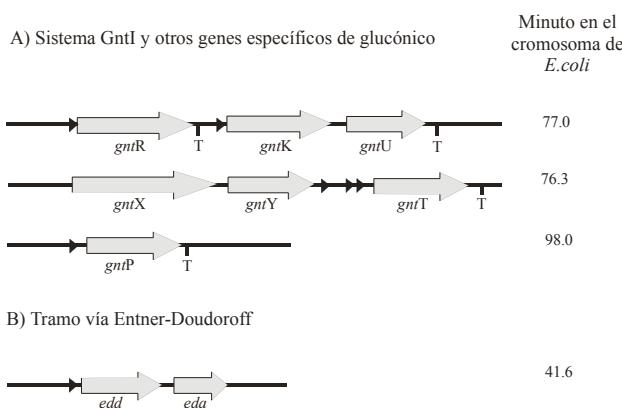


Figura 1.8.- Disposición cromosómica de los genes implicados en el metabolismo del glucónico en *E.coli*.

1.4.2 Genes *gnt* en *Bacillus*

Los genes implicados en el metabolismo del ácido glucónico fueron identificados en *Bacillus subtilis* por el grupo de Fujita y col. (1986), los cuales describen la presencia de un operón de glucónico en este microorganismo que carece de la vía de Entner-Doudoroff, por lo que la canalización del intermediario se realizaría a partir de la vía de

las pentosas fosfato. El análisis de la secuencia correspondiente al operón de glucónico (*gnt*) puso de manifiesto la existencia de 4 marcos abiertos de lectura en un fragmento de 5,4 Kb, los que correspondían a los genes *gntR*, *gntK*, *gntP* y *gntZ*, que codifican respectivamente para un regulador negativo, una kinasa, una permeasa y para una actividad desconocida en ese momento (Fujita y col., 1986; Fujita y Fujita, 1987); posteriormente Reizer y col. (1991) realiza un estudio analítico del operón de glucónico e indica que el gen *gntZ* correspondería a una actividad 6-P-glucónico deshidrogenasa por analogía de secuencias con otras deshidrogenasas de bacterias y animales. Mediante la realización de mutaciones se demostró que la actividad del gen *gntZ* asociada al operón *gnt* no era esencial para el catabolismo de glucónico (Fujita y Fujita, 1989), sugiriéndose que *B. subtilis* posee una enzima adicional con actividad 6-P-glucónico deshidrogenasa codificado por un gen distinto del *gntZ* y que no estaría sometido a represión (Reizer y col. 1991). Unos resultados análogos a los descritos para *B. subtilis* han sido obtenidos en estudios genéticos del operón *gnt* en *Bacillus licheniformis* (Yosida y col. 1994); estos autores describen la existencia de un único operón *gnt* conteniendo cinco marcos abiertos de lectura (ORF) de los cuales los cuatro últimos coinciden con los genes descritos para *B. subtilis*, a saber *gntRKP Z*. En este caso los autores postulan que se debería haber producido una reorganización del cromosoma en la región anterior al operón *gnt* durante la evolución, favoreciendo la divergencia entre especies.

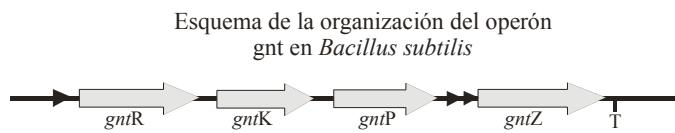


Figura 1.9

1.5 Producción y aplicaciones del ácido glucónico y sus derivados

El ácido glucónico se puede obtener mediante dos tipos de procesos: químicos y biológicos (fermentación). A partir de D-glucosa se puede producir ácido glucónico o sus derivados (el precursor δ -D-gluconolactona) o sus sales de calcio o sódicas, siendo éstas últimas las más interesantes debido a su acción como agentes quelantes o secuestrantes de cationes con aplicación en procesos industriales. La producción

mediante procesos fermentativos en sus inicios se llevaron a cabo con cepas de *Pseudomonas*, para usar posteriormente el hongo *Penicillium luteum* cultivado en superficie; actualmente se usan cepas superproductoras del hongo *Aspergillus niger* y de la bacteria *Acetobacter suboxydans*, en cultivos sumergidos. Durante la fermentación la glucosa es convertida a gluconolactona por la enzima glucosa oxidasa, para posteriormente convertirse en ácido glucónico por hidrólisis espontánea. Las condiciones de la fermentación incluyen la adición de un inóculo del micelio en crecimiento activo (1/10 del volumen total), mantener una elevada aireación en el sistema durante 60-70 horas, una temperatura de 30-33 °C y pH entre 5-7, con suficientes cantidades de manganeso. En todo caso las producciones óptimas de glucónico se alcanzarán en condiciones de limitación de la fuente de fósforo y de nitrógeno. En estas fermentaciones se logra equilibrar el pH mediante la adición de carbonato cálcico como agente tamponante o hidróxido sódico, obteniéndose de esta forma las correspondientes sales de glucónico, siendo la de sodio la más frecuente.

En cuanto a sus aplicaciones, el ácido glucónico o la lactona correspondiente (gluconolactona) son utilizados (i) en industrias de alimentación, actuando como agentes ligeramente acidulantes que confieren a los alimentos unos sabores característicos: industrias cárnicas, industrias de lechería y productos de panadería; (ii) como potenciadores de sabor y equilibradores del pH se utilizan en la preparación de salsas; (iii) la gluconolactona añadida a grasas y aceites sirve para controlar el pH y para acomplejar posibles elementos metálicos (trazas) que promueven los procesos de oxidación; (iv) en medicina las sales férricas y cálcicas del glucónico se utilizan para proporcionar los correspondientes cationes en pacientes con anemias y deficiencias de calcio, el gluconato de zinc se utiliza en el tratamiento del acné vulgar (Meynadier, 2000) y el gluconato de magnesio se ha descrito como un potente protector celular ya que actúa como agente reductor frente a radicales libres (Mak y col., 2000); (v) es también frecuente recurrir al gluconato en estudios citológicos para modificar la concentración de aniones en el medio interno o externo celular (Hubber y col., 2001).

1.6 Uso de bases de datos en campos científicos

Existen en la actualidad una gran cantidad de bases de datos del ámbito biológico en todo el mundo (LiMB Databases) que contienen secuencias nucleotídicas y proteicas,

estructuras en 3D, mapas físicos y genéticos y toda la bibliografía pertinente: GenBank (Benson y col., 1993), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), DDBJ (DNA Data Bank of Japan), agrupan secuencias nucleotídicas, PIR (Protein Identification Resource; George y col., 1986), SWISS-PROT (Bairoch y Boeckmann, 1992) y PDB (Protein Data Bank; Bernstein y col., 1977) compilan secuencias proteicas, mientras que PROSITE (Bairoch y col., 1997) agrupan secuencias codificantes para dominios y motivos proteicos, etc.

El manejo de estas bases de datos se da de forma “online” por la necesidad de tener datos actualizados de forma constante. Por ello se requieren programas de bajo coste en tiempo y dinero así como la aplicación de estrategias para acelerar el proceso computacional que requiere la identificación de una secuencia. Estas estrategias son por ejemplo (i) el uso de varios procesadores de forma paralela y que permiten fraccionar la base de datos y procesar mucha mas información en el mismo tiempo para determinar una única consulta (Tieng y col., 1996); (ii) el uso de programas heurísticos que permiten obtener resultados rápidos y de bajo coste pero de menor exactitud pues aportan aproximaciones, no resultados exactos. El uso de este tipo de aplicaciones ha sido el desencadenante fundamental del auge de la bioinformática.

1.6.1 Aplicaciones bioinformáticas de tipo heurístico

El objeto de estos programas es el establecimiento de las similitudes que hay entre dos secuencias y esto se puede hacer de dos formas: (i) a nivel local, estudiando las similitudes entre subsecuencias; esto se utiliza para realizar búsquedas rápidas en la base de datos como en aplicaciones tipo BLAST (Altschul y col., 1990) o FASTA (Lipman y Pearson, 1985). (ii) A nivel global, donde se establecen comparativas utilizando la secuencia completa y cada unidad de una secuencia A se compara con cada unidad de una secuencia B; esto se utiliza para alinear y establecer árboles filogenéticos mediante aplicaciones como CLUSTAL (Thompson y col., 1994).

El concepto determinante es establecer la mínima distancia evolutiva posible entre las dos secuencias problema. Esta distancia se define como el menor número de operaciones (sustituciones, inserciones/delecciones = InDel) necesarias para convertir una secuencia A en otra B. Se penaliza a cada tipo de alteración en función de su

frecuencia biológica, gravedad y longitud. La mejor alineación será por tanto la que menos penalizaciones tenga y se puede establecer la distancia entre dos secuencias por el número y peso de las mutaciones que las diferencian. Todo ello se resuelve utilizando matrices.

Para secuencias nucleotídicas se establecen matrices de identidad según el método de Needleman y Wunsch (1970) (Fig. 1.10). El fundamento es simple y se basa en la creación de una matriz con las dos secuencias, una en filas y la otra en columnas, y se otorga 0 si hay similitud entre nucleótidos o 1 si no la hay. Esto se hace más complejo pues el algoritmo que computa la identificación debe tener en cuenta la posibilidad de sustituciones en la secuencia y debe incluir penalizaciones por el tamaño de los posibles gaps (zonas In/Del). El algoritmo de N-W (Needleman-Wunsch) fue conceptualizado para el alineamiento de dos secuencias dadas y en principio se puede extender añadiendo para cada nueva secuencia otra dimensión en la matriz. Pero esto es inviable a nivel computacional si el número de las secuencias aumenta de forma exponencial. Por ello finalmente se describieron métodos heurísticos de alineamiento múltiple.

		sequence A									
		-	T	A	A	A	T	T	G	C	A
		-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		A	0	1	0	0	0	1	1	1	1
		A	0	1	0	0	0	1	1	1	0
		T	0	0	1	1	1	0	0	1	1
		T	0	0	1	1	1	0	0	1	1
		T	0	0	1	1	1	0	0	1	1
		G	0	0	1	1	1	1	1	0	1
		G	0	0	1	1	1	1	1	0	1
		G	0	0	1	1	1	1	1	0	1
		C	0	0	1	1	1	1	1	1	0
		C	0	0	1	1	1	1	1	1	0
		A	0	0	1	0	0	1	1	1	1
		sequence B									

Figura 1.10.- Matriz de identidad entre dos secuencias nucleotídicas.

Para el caso de alineamientos de secuencias proteicas se utilizan matrices que contienen las frecuencias relativas por las que un aminoácido determinado sustituye a otro por azar, y estas frecuencias esperadas se comparan con las frecuencias observadas. Se otorgan valores positivos en la matriz si la frecuencia observada es mayor que la esperada por azar y negativos si es menor, que corresponderán respectivamente a cambios conservativos y cambios no conservativos. Manteniendo esta base, las matrices

más utilizadas son las matrices PAM (Allowed Point Mutations; Dayhoff y col., 1978). Otro tipo de matrices son las llamadas Blosum (Henikoff y Henikoff, 1992) que están basadas en bloques muy conservados extraídos de alineamientos múltiples, son los llamados “motivos”, que representan las secuencias de mayor conservación de ciertas familias proteicas. Hay distintas matrices Blosum en función del tipo de segmentos utilizados, así Blosum 62 contiene bloques con al menos un 62% de similitud con una o más secuencias del cluster y se utilizan secuencias de un amplio rango de distancias evolutivas. Estas matrices dependen por tanto de la forma de alineamiento por las que se obtuvieron.

Una vez establecidas los tipos de matrices para el alineamiento, podemos distinguir fundamentalmente 3 programas utilizados en el presente trabajo:

- CLUSTAL, está enfocado por la distancia que haya entre las distintas secuencias a alinear, que pueden ser tanto nucleotídicas como proteicas. Se alinean las secuencias más similares en primer lugar, se establece una secuencia consenso y se alinea la secuencia más parecida con ese consenso o las 2 secuencias mas parecidas entre sí de forma progresiva y consecutiva, para establecer un árbol filogenético.
- FASTA, fue desarrollado por Lipman y Pearson en 1985 y se mejoró en 1988 por los mismos autores. El algoritmo busca en primer lugar establecer las unidades de similitud entre 2 secuencias dadas, utilizando subunidades de 4-6 nucleótidos para DNA y para secuencias proteicas 1-2 aminoácidos. Regular este tamaño condiciona la velocidad y lo sensible que sea el alineamiento. Se establecen diagonales con las zonas de similitud, se les da un valor a esas diagonales en función de su longitud y de los gaps (zonas InDel) que tenga. Se establece la mejor secuencia a nivel “local” combinando las mejores diagonales con el mínimo espacio entre ellas (producido por InDel). Se eliminan las diagonales que no se encuentren dentro un margen establecido previamente y se juntan los espacios determinando un valor de similitud entre las dos muestras en función de las diferencias y similitudes obtenidas (Fig. 1.11).

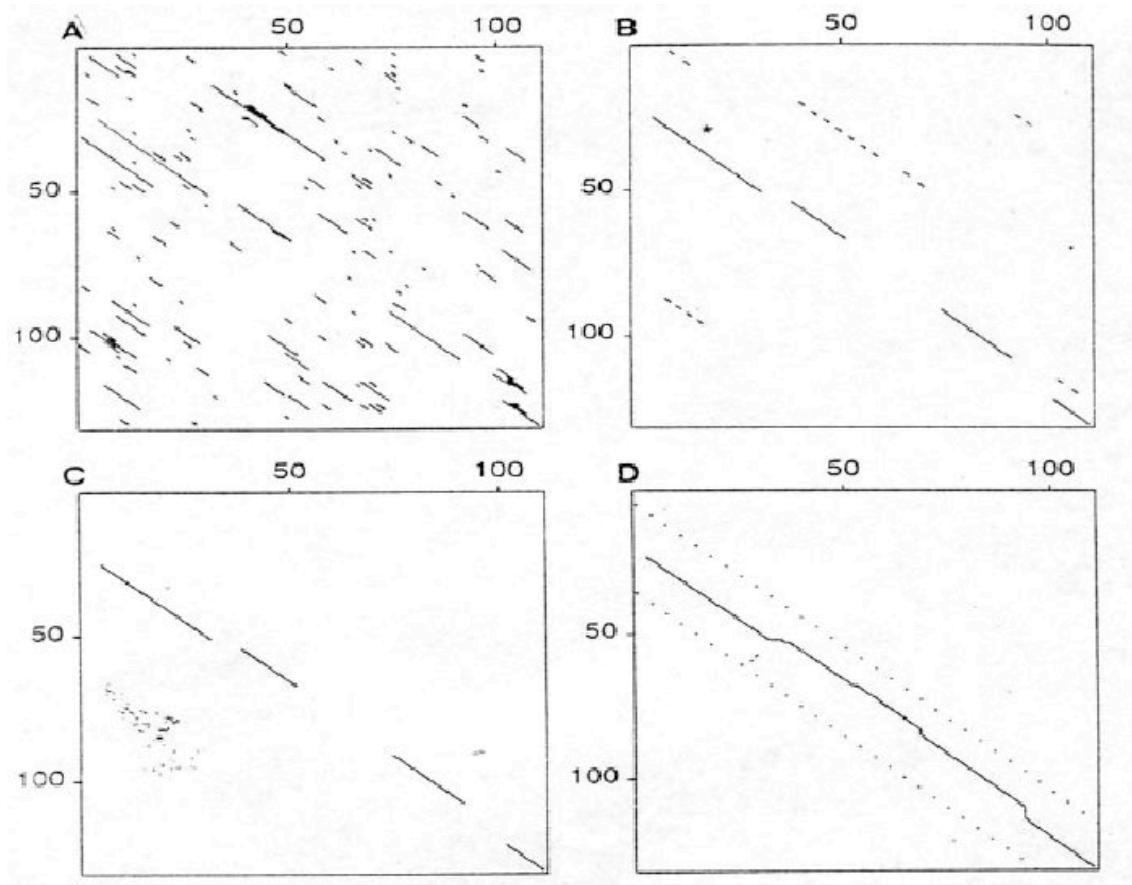


Figura 1.11.- Ejemplo gráfico que describe el establecimiento de la mejor diagonal en la matriz de identidad de comparativa de dos secuencias. A) Se establecen las diagonales de similitud, B) se determinan las que tienen mejor puntuación, C) se eliminan aquellas que no se encuentren dentro de un rango determinado, D) se unen especificando los gaps que haya entre las diagonales seleccionadas para dar un valor al alineamiento que podrá ser utilizado como distancia evolutiva entre ambas secuencias.

- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), se desarrolló por Altschul y col. (1990). Realiza una búsqueda para encontrar la máxima similitud entre unidades de secuencia, una vez encontrada una similitud de un grado determinado se concentra en buscar similitudes de mayor grado. Esta estrategia permite una mayor rapidez de procesamiento de datos sin perder por ello sensibilidad. Posteriormente coteja el número de unidades de similitud de forma local y establece un valor progresivamente. La longitud de la unidad de secuencia puede ser determinada previamente aunque se establecen un estándar de 12 nt o 3-5 aa. Además podemos establecer el mínimo de grado de similitud entre las secuencias encontradas con lo cual se regula la rapidez del programa y una restricción para la búsqueda de distancias filogenéticas de mayor o menor magnitud. Posteriormente se mejoró este sistema (Altschul y col., 1997) introduciendo la posibilidad de computar la presencia de inserciones/delecciones de la misma forma que en FASTA: se establecen subalineamientos locales y se compone una

alineamiento general incluyendo las inserciones/delecciones presentes, gráficamente se eliminan subdiagonales que estén fuera de un rango establecido y las que quedan se unen para obtener una diagonal general con el mejor alineamiento posible.

Al mismo tiempo se desarrolló el sistema PSI-BLAST (Position Specific Iterated BLAST; Altschul y col., 1997) que permite la búsqueda de motivos y dominios conservados en distintas familias de proteínas. Este método de alineamiento se puede aplicar para estudiar la estructura de una proteína por comparativa con bases de datos de dominios y motivos proteicos bien establecidos como PROSITE. Estas secuencias son las más conservadas dentro de la proteína pues son las que determinan la función de esta en gran medida, son elementos de muy diversa índole como unión a DNA en elementos de transcripción, unión a ATP/AMP en kinasas de distintos tipos, etc. Esta información nos confirma la posible identidad de la proteína codificada por la secuencia problema en concordancia con los alineamientos obtenidos previamente.

1.7 Objetivos del presente trabajo

C. glutamicum ha sido tradicionalmente utilizado en procesos industriales en la producción de metabolitos primarios, principalmente aminoácidos, por lo que los aspectos fisiológicos-metabólicos relacionados con biosíntesis de aminoácidos suelen estar bien establecidos; sin embargo los procesos relacionados con el metabolismo energético o catabolismo de estos microorganismos en función de los nichos ecológicos que ocupan y de su potencial versatilidad metabólica no son tan conocidos. En base a ello se plantearon los siguientes objetivos:

- (i) Localización y análisis de genes implicados en el catabolismo del ácido glucónico
- (ii) Posicionamiento de estos genes en el cromosoma de *C. glutamicum* y estudio de su posible agrupamiento (“cluster”)
- (iii) Obtención y análisis funcional de mutantes afectados en los genes *gnt*.

2

Materiales y Métodos

2. Materiales y Métodos

2.1 Materiales

2.1.1 Reactivos químicos, bioquímicos y enzimas comerciales

Para la realización de este trabajo se emplearon diversos materiales y reactivos químicos y bioquímicos adquiridos a las siguientes casas comerciales: Amersham International (Reino Unido), Boehringer Mannheim (Alemania), MBI Fermentas (Lituania), Merck (Alemania), Millipore (Massachusetts, USA), New England BioLabs (Massachusetts, USA), Pharmacia (Suecia), Perkin-Elmer (Columbia, USA), Promega (Wisconsin, USA), Qiagen (Alemania), Sigma Chemical (Missouri, USA), Stratagene (California, USA), Whatman (Reino Unido).

Las enzimas de restricción utilizadas se adquirieron a Boehringer Mannheim (Alemania), New England BioLabs (Massachusetts, USA) y MBI Fermentas (Lituania). Además, se utilizaron las siguientes enzimas de modificación: DNA ligasa del fago T4 y fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim, Alemania), RNasa y DNasa (Sigma Chemical, Missouri, USA). Otras enzimas utilizadas fueron: lisozima (Fulka Chemika-Biochemika, Suiza) y proteinasa K (Sigma Chemical, Missouri, USA).

2.1.1.1 Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos comerciales que se utilizaron fueron los siguientes: DNA de fago Lambda (Boehringer Mannheim, Alemania) y el vector de clonación para *E. coli* pBluescript KS/SK (2.98 kpb; *bla*; *lacZ*; ori f1), de Stratagene (California, USA).

2.1.2 Microorganismos utilizados

Todos los microorganismos que han sido utilizados en este trabajo, junto con sus características más destacables, origen o referencia bibliográfica, se encuentran enumerados en la siguiente tabla:

	Características	Fuente/Referencia
Corinebacterias		ATCC
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	Silvestre (wt); colonias ligeramente amarillas	
<i>C. glutamicum</i> TRA-8	<i>gntf</i>	Mateos y col., 1996
<i>B. lactofermentum</i> R31	MeLys ^R AEC ^R , colonias blancas. Carece del plásmido pBL1.	Santamaría y col., 1985
E. coli	<i>F</i> ⁻ <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17(r_km_k⁺)</i> <i>supE44</i> <i>relA1</i> λ ⁻ <i>Φ80dlacZM15</i> (<i>lacZYA-argF</i>)U169.	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> DH5α		
<i>E. coli</i> XL1Blue	<i>F</i> ['] :: <i>Tn10</i> <i>proA+B+</i> <i>lacI^q</i> Δ(<i>lacZ</i>)M15 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> (<i>Nal^R</i>) <i>thi</i> <i>hsdR17</i> (r _k m _k ⁺) <i>supE44</i> <i>relA1</i> <i>lac</i>	Bullock y col., 1987
<i>E. coli</i> S17-1	<i>hsdR</i> <i>pro recA</i> <i>Tc::Mu</i> ; contiene integrados los genes <i>tra</i> (RP4) en el cromosoma	Simon y col., 1983

Tabla 2.1.- Microorganismos utilizados en el presente trabajo.

2.1.3 Plásmidos utilizados

En la Tabla 2.2 se indican los plásmidos utilizados en el presente trabajo así como sus principales características y la referencia.

Plásmidos	Referencia
pBluescript KS y SK 2,96 kb. fagémidos derivados de pUC118 y pUC119 con origen de cadena sencilla del fago f1. Vectores de <i>E. coli</i> , <i>bla</i> , <i>lacZ</i> .	Stratagene Cloning Systems (San Diego, CA).
pK18mob 3,7 kb; plásmido móvil derivado de <i>E. coli</i> derivado de pUC18 usado en procesos de interrupción génica. <i>kan</i> , <i>lacZ</i>	Schäfer y col., 1994
pULMV1 3,7 Kb; plásmido recombinante derivado de pBluescript KS conteniendo un fragmento del gen <i>gntP</i> de <i>Corynebacterium glutamicum</i> . Origen de cadena sencilla del fago f1, vector de <i>E. coli</i> , <i>bla</i> .	Valbuena, 1999.

Tabla 2.2.- Plásmidos utilizados en este trabajo

2.1.4 Medios usados y condiciones de cultivo

Para el crecimiento de los microorganismos se utilizaron diferentes medios de cultivo. La composición para un volumen final de 1 litro (l) se detalla a continuación;

después de la preparación, el medio fue repartido a razón de 100 mililitros (ml) por botella. Todos los medios se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

2.1.4.1 Medios de cultivo para *E. coli*

Medio Luria-Bertani (LB) (Miller, 1972): 10 g triptona; 10 g NaCl; 5 g de extracto de levadura. El pH debe ser ajustado a un valor de 7,3 con NaOH. Añadir agua destilada hasta 1 l. Para el medio sólido se debe añadir agar a una concentración final de 20 g/l.

Medio SOB (Hanahan, 1983): 20 g triptona; 5 g extracto de levadura; 0,5 g NaCl; Ajustar a pH 7,5. Agua destilada hasta 1 l. Por separado se preparan dos soluciones de MgCl₂ 1 M y MgSO₄ 1 M que se esterilizan por filtración a través de una membrana de 0,22 µm. Se deben añadir 1 ml de cada solución al medio antes de su utilización.

2.1.4.2 Medios de cultivo para *C. glutamicum*

Medio Trypticasa-Soja, TSB. (Sambrook y col., 1989) 16 g peptona de caseína; 3 g peptona de soja; 6 g NaCl; 2,5 g K₂HPO₄; 2,5 g glucosa. Se ajusta el pH a 7,2. Para medio sólido, TSA, se suplementa con 20 g de agar.

Medio mínimo para corinebacterias, MMC. (Fernández, 1991) 10 g SO₄(NH₄)₂; 3 g urea, 1 g KH₂PO₄; 0,41 g MgSO₄·7H₂O; 2 mg FeSO₄·4H₂O; 2 mg MnSO₄·4H₂O; 50 mg NaCl; 50 µg biotina; 200 µg tiamina; 20 g glucosa. Las vitaminas se esterilizan por filtración en una solución concentrada y la glucosa se esteriliza en autoclave por separado. Ajustar el pH a 7,3. Para el medio sólido se añaden 20 g de agar.

2.1.4.3 Antibióticos y otros aditivos

Ampicilina (Ap): solución acuosa a una concentración de 200 mg/ml. Se utilizó a una concentración final de 100 µg/ml.

Kanamicina (Km): Solución acuosa a una concentración de 100 mg/ml. Se utilizó a una concentración final de 50 µg/ml.

IPTG: solución acuosa a una concentración de 100 mM. Se utilizó a una concentración final de 80 µg/ml .

X-Gal: Solución en dimetilformamida a una concentración de 20 mg/ml. Se utilizó a una concentración final de 40 mg/ml.

2.1.5 Soluciones de uso general

- CIA:** mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 24:1.
- Fenol ácido:** 500 g fenol; 0,5 g hidroxiquinoleína; 100 ml H₂O.
- Fenol cloroformo isoamílico:** mezcla de fenol neutro y CIA en proporción 1:1.
- Fenol neutro:** el fenol ácido se equilibra realizando varias extracciones con 1 volumen de Tris-HCl pH 8 1 M, hasta que la fase orgánica tenga un pH igual o superior a 7,6.
- RNasa:** RNasa 10 mg/ml; Tris-HCl pH 7,5; 10 mM; NaCl 15 mM. Hervir a 100°C durante 10 minutos para eliminar las DNAsas. Almacenar a -20°C.
- Tampón TE:** Tris-HCl, 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8.

2.1.6 Conservación de las cepas bacterianas

Las diferentes cepas utilizadas fueron conservadas mediante dos métodos:

-El primer método (a corto plazo) se realizó mediante siembra periódica (cada 2 meses en el caso de *E. coli* y cada 4 meses en el caso de las corinebacterias) en placas de Petri con el medio de cultivo sólido más adecuado y los aditivos necesarios en cada caso. Las placas se guardaron, rodeadas de Parafilm, a 4°C. Con este método se pueden conservar varias semanas.

-El segundo método (a largo plazo) se realizó añadiendo al medio de cultivo líquido donde se creció el organismo una solución de glicerol concentrado, dejando la concentración final al 20%; posteriormente se congela y se almacena a -20°C. Con este método se pueden conservar hasta 4 años.

2.2 Métodos para el análisis de ácidos nucleicos

2.2.1 Preparación del DNA

2.2.1.1 Aislamiento de DNA total de corinebacterias.

Este método se aplicó a volúmenes de cultivo comprendidos entre 5 y 100 ml, obteniéndose normalmente cerca de 4 µg de DNA por ml de cultivo, y se realizó de acuerdo al protocolo de Altenbuchner y Cullum (1984).

PROTOCOLO I: MÉTODO RÁPIDO DE PREPARACIÓN DE DNA TOTAL

1. Cultivar las células en medio TSB suplementado con glicina al 1% , durante 16 horas.
2. Recoger las células por centrifugación a 5000 r.p.m. durante 10 minutos.
3. Resuspender en 1/20 del volumen de TES.
4. Añadir 5 mg/ml de lisozima e incubar a 37°C durante 2 horas.
5. Añadir ½ del volumen de EDTA 50mM, Sarcosil 0,5% y RNasa 5mg/ml. Mezclar bien e incubar a 37°C durante 30 minutos.
6. Añadir 10 µg/ml de Proteinasa K e incubar a 50°C durante al menos una hora. La solución debe clarear.
7. Extraer con un volumen de fenol neutro y centrifugar para separar las fases.
8. Extraer la fase acuosa con un volumen de fenol cloroformo isoamílico, volviendo a separar las fases por centrifugación.
9. Repetir la extracción de la fase acuosa con cloroformo isoamílico. Centrifugar.
10. Precipitar el DNA con 0,6 volúmenes de isopropanol.
11. Recoger el precipitado por centrifugación y lavar con etanol al 70%.
12. Resuspender en TE.

✖ TES: Tris-HCl 25 mM; pH 8,0; EDTA 25 mM, pH 8,0; sacarosa 10,3%

2.2.1.2 Minipreparación de DNA plasmídico de *E. coli*.

Este procedimiento, consistente en una modificación del protocolo descrito por Holmes y Quigley (1981), se utilizó para la extracción de DNA plasmídico a partir de colonias de *E. coli* en placa. Aunque el DNA obtenido no es muy limpio, es un protocolo rápido con el que se obtiene la suficiente cantidad de DNA para realizar los primeros ensayos (digestión con enzimas de restricción, etc.) en el análisis de un plásmido recombinante.

PROTOCOLO II: MINIPREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS DE *E.coli*

1. Inocular con una colonia aislada 1 ml de medio LB líquido suplementado con el antibiótico selectivo. Sembrar con cada colonia picada una pequeña zona de una placa de LB sólido suplementado con el antibiótico adecuado,

para poder recuperar fácilmente las colonias recombinantes. Incubar entre 8 y 16 horas a 37º C, y en agitación a 250 r.p.m. los cultivos líquidos.

2. Centrifugar 5 minutos a 10.000 r.p.m. (en centrífuga Eppendorf). Resuspender las células en 200 µl de STET y 3 µl de lisozima 10 mg/ml.
3. Hervir la muestra durante 40 segundos. Centrifugar inmediatamente a 14.000 r.p.m. (en centrífuga Eppendorf) durante 15 minutos.
4. Eliminar el precipitado mucoso (restos celulares y DNA cromosómico) con un palillo estéril.
5. Añadir 250 µl de isopropanol y mezclar por inversión. Dejar a temperatura ambiente entre 10 y 15 minutos. Centrifugar a 14.000 r.p.m. durante 15 minutos.
6. Lavar el precipitado con 1 ml de etanol 70% frío. Centrifugar 5 minutos a 14.000 r.p.m., eliminar el sobrenadante y secar el precipitado.
7. Resuspender en 30 µl de agua MilliQ (Millipore) o tampón TE.

✖ *Solución de lisis STET*: Sacarosa, 8 %; Tritón X-100, 0,5 %; EDTA pH 8, 50 mM; Tris-HCl pH 8, 10 mM.

✖ *Lisozima*: lisozima, 50 mg/ml; Tris-HCl pH 8, 10 mM.

2.2.1.3 Preparación de DNA plasmídico de *E. coli* mediante lisis alcalina.

Este protocolo se empleó para la obtención de DNA plasmídico en gran cantidad y con una alta pureza, limpio de proteínas. Consiste en una modificación del protocolo de lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly (1979).

PROTOCOLO III: PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS DE *E. coli* POR LISIS ALCALINA

1. Inocular un matraz de 500 ml, conteniendo 100 ml de medio TB suplementado con el antibiótico necesario, con una colonia de *E. coli*. Crecer en agitación a 250 r.p.m. y a 37 ºC durante 14 a 18 horas.
2. Centrifugar a 5.000 r.p.m. (en rotor GSA de Sorvall o equivalente) durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante.
3. Resuspender el precipitado en 5 ml de solución TEG y añadir lisozima a una concentración final de 5 mg/ml. Mezclar con agitador e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
4. Añadir 2 volúmenes de solución SDS-alcalina recién preparada y mezclar por inversión. Incubar en hielo durante 10 minutos.
5. Añadir ½ volumen de solución de acetato potásico y mezclar con agitador. Incubar en hielo durante 10 minutos.
6. Centrifugar a 8000 r.p.m. (en rotor SS-34 de Sorvall o equivalente) durante 30 minutos. Recuperar el sobrenadante.
7. Añadir 0,6 volúmenes de isopropanol, mezclar por inversión y centrifugar a 8000 r.p.m. (en rotor SS-34 de Sorvall o equivalente) durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante y secar el precipitado dejándolo escurrir sobre papel de filtro.
8. Resuspender el precipitado en 2 ml de agua Milli-Q (Millipore) o tampón TE y pasarlo a tubos de 10 ml estériles.
9. Añadir 2 ml de LiCl 5 M estéril y mantener en hielo durante 15 minutos. Centrifugar a 4000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. Recuperar el sobrenadante.
10. Añadir 10 ml de etanol absoluto frío y dejar a -20°C durante al menos 1 hora.
11. Centrifugar a 8000 r.p.m. (en rotor SS-34 de Sorvall o equivalente) durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante y secar el precipitado.
12. Resuspender el precipitado en 400 ml de agua Milli-Q (Millipore), teniendo cuidado de llevarse el DNA que está pegado a la pared del tubo. Pasarlo a un microtubo de 2 ml.
13. Añadir 4 ml de solución RNasa 10 mg/ml (libre de DNasa). Incubar a 37°C durante 15 a 30 minutos.
14. Añadir ½ volumen de fenol neutro y ½ volumen de CIA, mezclar con agitador y centrifugar a 14000 r.p.m. (en

centrífuga Eppendorf) durante 5 minutos. Recoger la fase acuosa (superior) y pasarl a otro microtubo. Repetir este paso.

15. Añadir 1 volumen de CIA, mezclar con agitador y centrifugar a 14000 r.p.m. durante 5 minutos. Recoger la fase acuosa (superior) y pasarl a otro microtubo. Repetir este paso.
16. Añadir 1/10 volumen de acetato sódico 3 M pH 7 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Mantener a -20°C durante al menos 2 horas.
17. Centrifugar a 14000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C. Eliminar el sobrenadante.
18. Añadir 100 ml de etanol 70 % frío y centrifugar a 14000 r.p.m. durante 5 minutos a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante y secar el precipitado. Resuspender en 100 ml de agua Milli-Q (Millipore) o tampón TE.

✖ Solución TEG: Tris-HCl pH 8, 25 mM; EDTA pH 8, 10 mM; glucosa, 50 mM.

✖ Solución SDS-alcalina: NaOH, 0,2 N; SDS, 1%.

✖ Solución de acetato potásico: acetato potásico, 5 M; ácido acético glacial 11,5 %.

2.2.2 Métodos de limpieza y conservación de ácidos nucleicos

2.2.2.1 Fenolización y concentración del DNA

El proceso de fenolización (Sambrook y col., 1989) sirve para limpiar el DNA principalmente de proteínas, aunque, como va seguido de una precipitación, también se eliminan iones, nucleótidos y demás moléculas que pudieran interferir en las reacciones enzimáticas. Si lo que se pretende es simplemente concentrar el DNA, sólo se deben realizar los últimos pasos. El fenol es sumamente tóxico tanto por contacto como por inhalación, por lo que debe ser manejado con suma precaución, utilizando ropa y guantes adecuados y se debe de manipular bajo una campana de extracción.

PROTOCOLO IV: FENOLIZACIÓN Y CONCENTRACIÓN DEL DNA

FENOLIZACIÓN

1. Añadir a la solución de DNA un volumen de fenol neutro. Mezclar con agitador (si el tamaño del DNA es grande conviene mezclar más suavemente, por inversión). Centrifugar 5 minutos a 14000 r.p.m. (en centrífuga Eppendorf).
2. Recuperar la fase acuosa (superior) y añadir $\frac{1}{2}$ volumen de fenol neutro y $\frac{1}{2}$ volumen de CIA. Mezclar y centrifugar como en el paso anterior. Opcionalmente se puede repetir este paso, obteniéndose un mayor grado de limpieza del DNA a costa de una menor eficiencia en su recuperación.
3. Recuperar la fase acuosa y añadir 1 volumen de CIA. Mezclar y centrifugar como en los pasos anteriores. La repetición de este paso proporciona una más eficiente eliminación de fenol residual, aunque disminuye la cantidad de DNA recuperada.
4. Recuperar la fase acuosa.

PRECIPITACIÓN Y CONCENTRACIÓN DEL DNA

5. Añadir 1/10 volumen de acetato potásico pH 7, 3 M y 2,5 volúmenes de etanol frío. Mezclar por inversión y mantener a -20°C durante al menos 2 horas (o a -70°C durante 30 minutos). Centrifugar a 14000 r.p.m. (en centrífuga Beckman) a 4°C durante 30 minutos. Eliminar el sobrenadante.
 6. Alternativamente se puede precipitar el DNA con 0,6 volúmenes de isopropanol, mezclando por inversión y manteniendo a temperatura ambiente durante 15 a 30 minutos. Centrifugar a 14000 r.p.m. durante 15 minutos a temperatura ambiente.
-

-
7. Añadir 1 ml de etanol 70 % frío y centrifugar a 14000 r.p.m. (en centrífuga Eppendorf) durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante y secar el precipitado.
 8. Resuspender en el volumen adecuado de agua Milli-Q (Millipore) o tampón TE.
-

2.2.3 Manipulación del DNA

2.2.3.1 Digestión del DNA con enzimas de restricción

Para llevar a cabo el tratamiento con enzimas de restricción se siguieron las recomendaciones de las casas comerciales proveedoras de cada enzima (Boehringer Mannheim, New England BioLabs y MBI Fermentas). Aunque el esquema general de la reacción, que se detalla en el protocolo V fue el mismo, la cantidad de enzima utilizada pudo ser superior a la indicada cuando el DNA a tratar no estaba muy limpio. Además, el tampón de digestión recomendado para cada enzima no fue el utilizado en el caso de algunas digestiones con dos enzimas, para las cuales el tampón de digestión recomendado no coincidía. En estos casos se intentó utilizar el tampón más adecuado según las indicaciones de cada casa comercial, y en el caso en que esto no fuera posible, se digirió primero con una enzima, se realizó una extracción fenol-CIA y se precipitó el DNA, para posteriormente llevar a cabo la segunda digestión.

PROTOCOLO V: DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

1. Mezclar en un microtubo:
 - tampón de digestión 10X (1/10 del volumen final)
 - DNA a digerir (la cantidad de mg deseada)
 - Enzima de restricción (2 unidades de enzima por cada mg de DNA)
 - agua Milli-Q (Millipore) necesaria para alcanzar el volumen final
 2. Incubar 3 horas a la temperatura adecuada.
-

2.2.3.2 Desfosforilación de los extremos 5'-fosfato libres del DNA

Los extremos resultantes de la digestión de los vectores de clonación con enzimas de restricción fueron desfosforilados para evitar en la medida de lo posible la religación. Para ello se realizó un tratamiento con fosfatasa alcalina, enzima que hidroliza los enlaces 5'- fosfato de los extremos de una molécula de DNA, impidiendo la religación por formación de un enlace fosfodiéster entre los dos extremos del vector, de modo que la única manera teórica de volver a anillarse el vector es por introducción de nuestro inserto durante la reacción de ligación. Para la realización del protocolo se siguieron las recomendaciones de la casa comercial proveedora (Boehringer Mannheim).

PROTOCOLO VI: DESFOSFORILACIÓN DE EXTREMOS 5' LIBRES

1. Mezclar en un microtubo:
 - tampón 10X (1/10 del volumen final)
 - vector de clonación (la cantidad de mg deseada)
 - fosfatasa alcalina
 - agua Milli-Q (Millipore) necesaria hasta alcanzar el volumen final
2. Incubar 30 minutos a 37° C.
3. Fenolizar y concentrar.

✖ *Tampón 10x:* Tris-HCl, 0,1 M, pH 8,3; ZnCl₂, 10 mM; MgCl₂, 10 mM.

2.2.3.3 Ligación de fragmentos de DNA

La DNA ligasa del fago T4 cataliza la formación de los enlaces fosfodiéster entre los extremos 3'-hidroxilo y los extremos 5'-fosfato de DNA de doble cadena (Sambrook y col., 1989). En esta reacción se requieren iones Mg²⁺ y ATP que se encuentran en el tampón de ligación. Esta ligasa cataliza la formación de enlaces fosfodiéster tanto de extremos romos como de extremos protuberantes.

PROTOCOLO VII: LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

1. Mezclar en un microtubo:
 - tampón de ligación 10X (1/10 del volumen final)
 - vector (la cantidad de mg deseada)
 - inserto (la cantidad de mg necesaria teniendo en cuenta la anterior)
 - DNA ligasa del fago T4 (2 unidades de enzima por cada mg de DNA)
 - agua Milli-Q (Millipore) necesaria para alcanzar el volumen final (10 a 20 ml)
2. Incubar a 14°C durante 4 a 16 horas.

2.2.3.4 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La electroforesis de DNA en geles de agarosa es una de las herramientas de biología molecular más utilizadas, debido en gran parte a la facilidad de preparación y realización y a la enorme información que puede ofrecer, permitiendo realizar mapas de restricción, calcular la cantidad de DNA presente en una muestra, averiguar el tamaño de un fragmento de DNA, etc. Para su realización se siguieron los protocolos publicados por Sambrook y col. (1989), con algunas modificaciones.

Dos factores son los que influyen en la preparación de geles de agarosa: la concentración de agarosa y el tampón en el que ésta se prepara. En todos los casos el tampón utilizado fue TAE. La concentración de agarosa empleada varió entre 0.8 y 1.2 %, dependiendo del tamaño de las bandas que se pretendía separar. El voltaje utilizado nunca superó los 5 V/cm, y siempre sin sobrepasar los amperios permitido por la fuente de alimentación. Paralelamente a las muestras se cargaron marcadores de peso molecular, consistentes en DNA del fago Lambda digerido con distintas enzimas de restricción. Se utilizaron en paralelo digestiones de Lambda con *Pst*I y con *Hind*III.

PROTOCOLO VIII: ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA

1. Disolver la cantidad de agarosa apropiada en tampón TAE por calentamiento. Dejar solidificar en un molde con el número y tipo de pocillos deseado.
2. Una vez preparado el gel, se pone éste en la cubeta de electroforesis y se llena con tampón TAE hasta cubrir el gel con aproximadamente 2 o 3 mm de tampón. Cargar la muestra en los pocillos y conectar la fuente de electroforesis al amperaje y voltaje apropiados.
3. Añadir y mezclar con la muestra de DNA a analizar 1/6 volumen de tampón de carga 6x. El tampón de carga confiere mayor densidad a la muestra, haciendo que ésta descienda por el pocillo y no difunda por el tampón. El volumen final debe ser tenido en cuenta a la hora de seleccionar el tamaño de los pocillos.

TINCIÓN Y FOTOGRAFIADO DEL GEL

4. Sumergir el gel en una solución del agente intercalante bromuro de etidio 0,5 mg/ml en oscuridad (aproximadamente durante unos 20 minutos).
 5. Observar el gel bajo una fuente de luz ultravioleta (se utilizó el transiluminador Spectroline TR-302 a una longitud de onda de 302 nm).
 6. Fotografiar el gel (la imagen de los geles se capturó y se imprimió con el sistema Video Graphic Printer UP-890CE de Sony).
- ✖ *Tampón TAE:* Tris-HCl pH 8, 40 mM; acetato sódico, 5mM; EDTA, 2 mM.
- ✖ *Tampón de carga 6x:* azul de bromofenol, 0,25 % (avanza a través del gel de manera equivalente a un fragmento de DNA de unos 750 pb); xilencianol, 0,25 %; EDTA, 25 mM; sacarosa, 40 %.
-

2.2.3.5 Extracción de fragmentos de DNA de geles de agarosa-TAE

Para la extracción de fragmentos de DNA a partir de los geles de agarosa se siguió el método comercial de la casa Amersham (Gel Band Purification Kit) siguiendo las instrucciones del fabricante.

PROTOCOLO IX: EXTRACCIÓN DE ADN MEDIANTE GBPK.

1. - Cortar la banda de interés del gel de agarosa y pesarla.
 2. - Añadir 10 µl de “capture buffer” por cada 10 mg de azarosa presente en la banda
 3. - Incubar en un baño a 60°C hasta que la agarosa esté disuelta (5-15')
 4. - Colocar el líquido en una micro columna GFX, e incubar a temperatura ambiente 1'.
-

5. - Centrifugar 30'' en centrífuga Eppendorf (máxima velocidad)
 6. - Añadir a la columna 500 μ l de bufer de lavado y centrifugar 30''
 7. - Añadir 30-60 μ l de agua destilada e incubar a temperatura ambiente 1'.
 8. - Centrifugar 1' y recoger el DNA purificado.
-

- ✖ *Capture buffer:* Solución tampón que contiene acetato y caotropo.
 - ✖ Búfer de lavado: Tris-EDTA (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA). Añadir etanol absoluto hasta una concentración final de 80 %.
-

2.2.4 Técnicas de introducción de DNA en bacterias

2.2.4.1 Transformacion en *E. coli*

La introducción de DNA en células de *E. coli* se llevó a cabo mediante transformación de células competentes, siguiendo los protocolos publicados por Sambrok y col. (1989). Para conseguir células competentes se siguió el método del cloruro de rubidio que se describe a continuación, utilizando como hospedadoras las cepas de *E. coli* DH5 α y XL1Blue.

2.2.4.2 Obtención de células de *E. coli* competentes por el método del cloruro de rubidio

Este protocolo fue descrito por Hanahan (1983; 1985) y permite obtener eficiencias de 10^8 transformantes/mg de DNA.

PROTOCOLO X: CÉLULAS DE *E. coli* COMPETENTES CON CLORURO DE RUBIDIO

1. A partir de una colonia aislada preparar un preinóculo en medio SOB, cultivando a 37°C durante 12 a 16 horas con agitación orbital a 250 r.p.m..
 2. Inocular 100 ml de medio SOB con 1 ml del preinóculo. Cultivar a 37° C con agitación a 250 r.p.m. hasta que el cultivo alcance una densidad óptica a 600 nm de 0,4.
 3. Enfriar el cultivo en hielo y centrifugar 5 minutos a 6000 r.p.m. (en rotor GSA de Sorvall o equivalente) a 4°C.
 4. Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 30 ml de solución RF1, en frío. Centrifugar 5 minutos a 6000 r.p.m. (en centrífuga Sorvall) a 4°C.
 5. Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 8 ml de solución RF2 fría.
 6. Repartir alícuotas de 200 μ l en tubos Eppendorf de 1,5 ml y congelar inmediatamente en nitrógeno líquido. Conservar a -70°C.
- ✖ *Solución RF1:* RbCl, 100 mM; MnCl₂, 50 mM; acetato potásico, 30 mM; CaCl₂, 10 mM; glicerol, 15 %. Ajustar el pH a 5,8 con ácido acético 0,2 M. Esterilizar por filtración.
 - ✖ *Solución RF2:* MOPS pH 7, 10 mM; RbCl, 10 mM; CaCl₂, 75 mM; glicerol, 15 %. Ajustar el pH a 6,8 con NaOH. Esterilizar por filtración a través de una membrana de 0,22 mm.
-

2.2.4.3 Transformación de células competentes de *E. coli*

Este protocolo de transformación fue descrito por Hanahan (1983) y, además de ser prácticamente universal para cualquier cepa de *E. coli*, permite la transformación de células competentes obtenidas por cualquiera de los dos métodos anteriormente descritos.

PROTOCOLO XI: TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli*

1. Descongelar las células competentes, manteniendo el microtubo en hielo.
 2. Añadir el DNA en un volumen de 1 a 10 ml. Mantener la mezcla en hielo durante 30 minutos.
 3. Aplicar un choque térmico a 42°C durante 90 segundos y volver rápidamente a enfriar en hielo.
 4. Añadir cuatro volúmenes de LB e incubar durante 1 hora a 37°C.
 5. Sembrar en placas con medio selectivo.
-

2.2.4.4 Selección por color de los transformantes

Algunos plásmidos poseen un fragmento del gen *lacZ*, correspondiente a la subunidad α , que permite complementar la delección presente en el gen *lacZ* del operón *lac* de la cepa de *E. coli* DH5 α que, por tanto, carece de actividad β -galactoxidasa. Cuando las células de *E. coli* DH5 α son transformadas con alguno de estos plásmidos, recuperan su actividad β -galactoxidasa. De esta forma se pueden seleccionar los transformantes, ya que aparece un color azul al incubarlos en presencia de IPTG, que es un fuerte inductor del gen *lacZ*, y de X-Gal, que es el responsable de que aparezca ese color azul ya que el X-Gal es utilizado como sustrato por la β -galactoxidasa. Si se produce la inserción de un fragmento de DNA dentro de la región múltiple de clonación presente en estos plásmidos, se produce la interrupción del gen *lacZ*, no se degrada el sustrato X-Gal, y por lo tanto, no aparece el color azul. Este método permite diferenciar los transformantes sin inserto (color azul) de los recombinantes (color blanco) (Sambrook y col., 1989).

2.2.4.5 Conjugación en corinebacterias

El protocolo utilizado es el descrito por Schäfer y col. (1990). En todos los ensayos de conjugación se utilizó como cepa donadora *E. coli* S17-1, transformada con las

construcciones adecuadas, y como cepas aceptoras se utilizaron *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 y *Brevibacterium lactofermentum* R31.

PROTOCOLO XII: CONJUGACIÓN EN CORINEBACTERIAS

1. Transformar el plásmido de interés en la cepa de *E. coli* S17-1.
 2. Crecer la cepa donadora *E.coli* S17-1 que porta el plásmido en medio LB suplementado con el antibiótico adecuado, a partir de 1 ml de preinóculo crecido durante 12-14 horas hasta unos valores de DO₆₀₀ entre 1-1,5.
 3. Inocular 100 ml de medio TSB con 1 ml de preinóculo de *C. glutamicum* o *B. lactofermentum* crecido durante 12-14 horas. Crecer a 30°C en agitación hasta una DO₆₀₀ entre 3-4.
 4. Recoger 3.10⁸ células receptoras y donadoras en un Eppendorf mezclando suavemente. Centrifugar y lavar a continuación las células recogidas en medio TSB.
 5. Repetir la centrifugación y resuspender cuidadosamente en un volumen de 0,5 ml de medio TSB.
 6. Aplicar 300 µl de la mezcla celular sobre un filtro de acetato de celulosa con un diámetro de poro de 0,45 µm (Millipore) situado sobre una placa de medio TSA. Incubar a 30°C durante 20 horas.
 7. Recoger la mezcla del filtro y resuspender en 200 µl de medio TSB.
 8. Plaquear la mezcla celular en medio TSB suplementando con el antibiótico correspondiente y ácido nalidíxico.
-

2.2.5 Técnicas de hibridación de DNA

La técnica de hibridación de DNA fue descrita por Southern (1975) y se conoce como *transferencia de Southern* (“Southern blotting”). Durante este proceso, el DNA se transfiere desde el gel de agarosa a una membrana de nailon (en este trabajo se utilizó la membrana Nylon Hybond-N de Amersham), sobre la cual se realiza la hibridación propiamente dicha entre el DNA transferido y la sonda.

2.2.5.1 Transferencia de DNA desde un gel de agarosa a un soporte sólido

El método que se utilizó para transferir los fragmentos de DNA separados previamente por electroforesis en gel de agarosa fue el sistema de vacío VacuGene XL de LKPB.

PROTOCOLO XIII: TRANSFERENCIA DE DNA DESDE GELES DE AGAROSA A MEMBRANAS DE NAILON

1. Cortar una membrana de nailon de dimensiones ligeramente mayores que el gel de agarosa.
2. Empapar la membrana en SSC 2x y colocarla en la unidad de transferencia, siguiendo las instrucciones del fabricante.
3. Comenzando por un extremo, colocar el gel sobre la membrana, evitando la formación de burbujas entre el gel y la membrana que impidan el paso del DNA. Conectar la bomba de vacío, asegurándose que alcanza una presión de 50 mb.
4. Cubrir toda la superficie del gel con HCl 0,25 M y dejar 20 minutos.
5. Retirar la solución de HCl y lavar el gel con agua destilada.

6. Cubrir el gel con solución desnaturalizante y dejar 30 minutos, asegurándose de que siempre haya solución encima del gel.
 7. Retirar la solución desnaturalizante y lavar con agua destilada.
 8. Cubrir el gel con solución neutralizante y dejar 30 minutos.
 9. Retirar la solución neutralizante y lavar con agua destilada.
 10. Cubrir el gel con SSC 20x y mantener durante 90 minutos.
 11. Retirar todo el líquido, marcar la posición de los pocillos sobre la membrana y retirar el gel. Desmontar el sistema de vacío y retirar la membrana.
 12. Lavar la membrana con SSC 2x, dejar secar y fijar el DNA con luz ultravioleta (se utilizó el UV-Stratalinker 2400, Cultec).
- ◆ *SSC 20X*: NaCl, 3 M; citrato sódico, 0,3 M; pH 7.
-

2.2.5.2 Marcaje de DNA con digoxigenina

Los fragmentos de DNA que se utilizaron como sonda fueron marcados mediante la técnica de iniciación o cebado al azar (“random primer”) por medio del sistema comercial no radiactivo DIG System (Boehringer Mannheim). Esta técnica se basa en la incorporación al azar en el DNA del hapteno esteroide digoxigenina, molécula que se introduce en el DNA como dUTP-digoxigenina por acción del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. Durante la reacción, los hexanucleótidos (que representa todas las posibles combinaciones con repetición de los cuatro nucleótidos tomados de 6 en 6) actúan de cebadores y el Klenow extiende esos cebadores copiando la cadena de DNA que se ha introducido en la mezcla de reacción para sintetizar la sonda.

PROTOCOLO XIV: MARCAJE DE LA SONDA CON DIGOXIGENINA

1. 1 mg del DNA se emplea como sonda de hibridación, se linealiza y posteriormente se purifica por extracción con fenol-CIA y después se precipita. Resuspender en 16 ml de agua Milli-Q estéril.
2. Desnaturalizar el DNA por calentamiento a 95°C durante 10 minutos y pasar rápidamente a hielo con metanol para evitar la renaturalización.
3. Añadir 2 ml de la mezcla de nucleótidos, 2 ml de la mezcla de hexanucleótidos y 1 ml del fragmento Klenow. Incubar a 37°C durante 2 a 20 horas.(*)
4. Parar la reacción con 2 ml de EDTA pH 8, 0,25 mM.
5. Precipitar con 2,5 ml de LiCl 4 M y 75 ml de etanol. Mantener a -20°C varias horas, centrifugar a 14000 r.p.m. (en centrífuga Eppendorf 5415 C o equivalente) durante 30 minutos a 4°C y resuspender en agua Milli-Q.

(*) Es posible adquirir una mezcla de todos los reactivos utilizados en este paso (DIG-High Prime)

2.2.5.3 Hibridación

Una vez transferido el DNA a la membrana de nailon y disponiendo de la sonda marcada, el siguiente paso es la preparación de la membrana para la hibridación, de

modo que queden bloqueados todos los posibles lugares de unión inespecífica de la sonda a la membrana. Este paso de preparación recibe el nombre de *prehibridación*, y debe realizarse a la misma temperatura que la hibridación. Para ello se cubre la superficie de la membrana que no tiene DNA fijado con un agente bloqueante, como DNA de esperma de salmón. Una vez realizada la prehibridación se procede con la *hibridación* propiamente dicha.

La temperatura a la que se realiza la hibridación determina la especificidad de unión entre la sonda y los ácidos nucleicos fijados a la membrana, de forma que a mayor temperatura de hibridación mayor debe ser la homología entre la sonda y el DNA para que se unan. La astringencia de la hibridación puede ser aumentada también mediante la adición de formamida a la solución de hibridación. Se debe desnaturizar la sonda antes de añadirla a la bolsa de hibridación, evitando así la formación de estructuras secundarias que dificultarían la unión de la sonda al DNA de la membrana.

PROTOCOLO XV: PREHIBRIDACIÓN E HIBRIDACIÓN

PREHIBRIDACIÓN

1. Colocar la membrana en una bolsa de plástico y añadir a la misma 20 ml de solución de hibridación por cada 100 cm² de membrana. Sellar la bolsa e incubar a la temperatura de hibridación^(*) durante 1 a 6 horas.

HIBRIDACIÓN

2. Diluir la sonda en la solución de hibridación a razón de 5 a 25 ng/ml.
3. Desnaturalizar la sonda por calentamiento a 95°C durante 10 minutos y enfriar rápidamente en hielo.
4. Eliminar la solución de prehibridación y añadir la solución de hibridación con la sonda. Incubar a la temperatura de hibridación^(*) un mínimo de 8 a 10 horas.
5. Recuperar la solución de hibridación con la sonda y mantener a -20°C, ya que se puede reutilizar en otras hibridaciones.
6. Lavar dos veces la membrana con solución de lavado I durante 15 minutos a temperatura ambiente.
7. Lavar dos veces la membrana con solución de lavado II durante 15 minutos a la temperatura de hibridación.
8. Proseguir con la detección (Protocolo XV).

- ❖ Solución de hibridación: SSC, 5x; Agente Bloqueante (Boehringer Mannheim); sarcosil, 0,1 %; SDS, 0,02 %.
❖ Solución de lavado I: SSC, 2x; SDS, 0,1 %.
❖ Solución de lavado II: SSC, 0,1x; SDS, 0,1 %.

(*) La temperatura de hibridación óptima para cada sonda debe ser calculada experimentalmente. Para sondas homólogas en un 100 %, la temperatura debe ser de 65 a 68°C, con soluciones de hibridación sin formamida.

2.2.5.4 Detección colorimétrica

Para detectar las bandas donde se ha unido la sonda se utiliza una reacción de los compuestos “nitrobluetetrazolium” (NBT) y 5-bromo,4-cloro,3-indolil-fosfato (BCIP o X-fosfato) catalizada por la enzima *fosfatasa alcalina*, que se encuentra conjugada a un anticuerpo antidigoxigenina. En los lugares donde se ha unido la sonda, se produce la precipitación de un compuesto de color violeta como consecuencia de la actividad de la fosfatasa alcalina. Después de la hibridación hay que bloquear la superficie de la membrana que no tiene unida la sonda, para evitar la unión inespecífica del anticuerpo.

PROTOCOLO XVI: DETECCIÓN COLORIMÉTRICA CON NBT Y X-FOSFATO

1. Lavar la membrana con tampón de detección I durante 1 minuto.
 2. Bloquear la membrana con tampón de detección II durante 30 minutos.
 3. Diluir el anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim) en tampón de detección II en proporción 1:15000.
 4. Cambiar el tampón de detección II por la mezcla con anticuerpos. Incubar 2 horas.
 5. Eliminar la solución anterior y lavar dos veces con tampón de detección I durante 15 minutos.
 6. Lavar con tampón de detección III durante 2 minutos.
 7. Mezclar 45 ml de solución NBT y 35 ml de solución BCIP con 10 ml de tampón III. Colocar la membrana en una bolsa de plástico, añadir la mezcla de reactivos y sellar la bolsa.
 8. Incubar a temperatura ambiente en oscuridad. Observar cada cierto tiempo la aparición de las manchas.
 9. Cuando la señal de hibridación es lo suficientemente buena, detener la reacción con tampón TE. Se debe prestar atención para que el filtro no adquiera una tonalidad amarilla por una reacción demasiado prolongada.
- ✖ *Tampón de detección I:* ácido maléico, 100 mM; NaCl, 150 mM; pH 7,5.
- ✖ *Tampón de detección II:* Tampón I más 1 % de agente bloqueante.
- ✖ *Tampón de detección III:* Tris-HCl pH 9,5, 100 mM; NaCl, 100 mM; MgCl₂, 50 mM.
- ✖ *Solución NBT:* NBT, 75 mg/ml en dimetilformamida 70 %.
- ✖ *Solución BCIP:* 50 mg/ml en dimetilformamida 70 %.
-

2.2.6 Reacción en cadena de la DNA polimerasa

Esta técnica permite la amplificación de ácidos nucleicos (Mullis y Faloona, 1987). Partiendo de una molécula de DNA diana podremos amplificar entre 10⁵ y 10⁹ veces una secuencia específica contenida en ella, mediante la utilización de unos oligonucleótidos o cebadores diseñados al efecto.

Procedimiento experimental

Se prepara en un tubo Eppendorf de 500 µl en un baño de hielo y agua, la siguiente mezcla de reacción con un volumen final de 100 µl: 60,5 µl de agua destilada estéril, 10 µl de Buffer PCR (10x), 10

μ l de mezcla de desoxinucleótidos (2mM), 5 μ l de Cebador 1 (20 μ M), 5 μ l de Cebador 2 (20 μ M), 0,5 μ l de Taq Polimerasa (5 unidades), 8 μ l de MgCl₂ (25 mM) y 1 μ l de DNA molde. Se añade 50 μ l de aceite mineral estéril y se introduce el tubo en un termociclador programado con las siguientes condiciones:

1. Desnaturalización inicial: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C.
2. Amplificación: consta de 30 ciclos cada uno de los cuales dividido en tres partes:
 - desnaturalización: 45 segundos a 95°C
 - anillamiento: 45 segundos a la temperatura adecuada según las características de los cebadores.
 - extensión 60 segundos a 72°C.
3. Extensión final: 1 ciclo de 8 minutos a 72°C.

2.2.7 Técnicas de secuenciación de DNA

2.2.7.1 Determinación de la secuencia de nucleótidos

El proceso de secuenciación se ha realizado por el método de los dideoxinucleótidos de Sanger y col. (1977). Se ha empleado el sistema de secuenciación no radiactiva *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit* (Amersham Pharmacia Biotech). La síntesis de DNA complementario a partir de un iniciador (*primer*), marcado en posición 5' con fluoresceína, la realiza la termosecuencia, que se trata de una DNA polimerasa termoestable. La polimerización se realiza en cuatro mezclas separadas, cada una de las cuales contiene los cuatro dNTPs y una baja concentración de uno de los ddNTPs. La incorporación de los ddNTPs a la cadena provoca el final de la polimerización; esto ocurre a distintos tiempos, dando lugar a una población de moléculas fluorescentes de diferentes tamaños en cada una de las cuatro mezclas. Entonces las reacciones son cargadas en cuatro pocillos adyacentes de un gel de acrilamida y sometidos a electroforesis. Los fragmentos de DNA migran a lo largo del gel y atraviesan un haz fijo de luz láser, generando señales fluorescentes que son inmediatamente detectadas y almacenadas por el sistema.

PROTOCOLO XVII: SECUENCIACIÓN CÍCLICA CON *Thermo sequenase* CON UN PRIMER MARCADO CON FLUORESCEÍNA

1. Sacar los reactivos A, C, G y T del *kit* para que se descongelen y mantener en hielo.
 2. Sacar también los *primers universal* y *reverso*
 3. Tomar de 0,5 - 5 μ g de DNA de doble cadena, (aproximadamente 2 μ g) en un volumen de 22 μ l.
 4. Marcar los tubos de PCR
 5. Preparar 4 premezclas que contengan por reacción:
-

-
- 1 μ l de primer fluorescente que contenga 1 - 2 pmoles/ μ l
 - 2 μ l de reactivo A, C, G o T.

Mezclar bien y mantener en hielo estas premezclas.

6. Poner 3 μ l de cada una de las 4 premezclas a los tubos de PCR y añadirles 5 μ l de DNA. Mezclar bien.
 7. Poner las reacciones en el termociclador usando el siguiente programa:
 - 95°C durante 5 minutos
 - 20 ciclos: 95°C 30 segundos y 60°C 30 segundos
 - 72°C 7 minutos
 - 4°C ∞
 8. Añadir 3 μ l de buffer de parada (de Pharmacia), pipeteando arriba y abajo para mezclarlo bien. Mantener en hielo y guardar a -70°C hasta cargar el gel.
-

2.2.7.2 Métodos de análisis informático de secuencias

Programa	Aplicaciones	Origen
BLAST	Identificación de secuencias problema.	www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ (Altschul y col., 1997)
CLUSTAL	Estudios filogenéticos y alineamientos de secuencias.	www.ebi.ac.uk/clustalw/ (Thompson y col., 1994)
DAS	Establecimiento de segmentos hidrofóbicos en secuencias proteicas.	www.sbc.su.se/~miklos/DAS/ (Cserzo y col., 1997)
EBI (European Bioinformatics Institute)	Obtención de las secuencias de genes o proteínas ya descritas y publicadas en las bases de datos.	www.ebi.ac.uk/services/ (Wellcome Trust Genome Campus, Cambridge, UK)
EDITSEQ	Manejo de secuencias: conversión de secuencias nucleotídicas en sus complementarias o sus reversas complementarias y traducción de las mismas a secuencias proteicas.	DNASTAR (DNAstar Inc., Madison, Wisconsin, USA)
FASTA	Identificación de secuencias problema.	www.ebi.ac.uk/fasta33/index.html (Lipman y Pearson, 1985)
MAPDRAW	Establecimiento de mapas de restricción y marcos de lectura abiertos en una secuencia de DNA problema.	DNASTAR (DNAstar Inc., Madison, Wisconsin, USA)
NCBI (Pubmed) (National Center for Biotechnology Information)	Búsquedas bibliográficas.	www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/ (Rockville Pike, Bethesda, USA)
NCBI (Taxonomy) (National Center for Biotechnology Information)	Búsquedas taxonómicas.	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ query.fcgi?db=Taxonomy (Rockville Pike, Bethesda, USA)
Neural Network Promoter Prediction	Identificación de posibles promotores.	www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html (Reese y Eeckman, 1995)
PROSITE	Determinación de motivos y dominios conservados con función establecida.	us.expasy.org/prosite/ (Bairoch y col., 2002)

PRIMERSELECT	Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de fragmentos de DNA por PCR.	DNASTAR (DNAstar Inc., Madison, Wisconsin, USA)
PROTPARAM	Obtención de parámetros físico-químicos de proteínas.	us.expasy.org/tools/protparam.html (Bairoch y col., 2002)

3

Resultados

3. Resultados

3.1 Fundamentos del presente trabajo de investigación.

La caracterización de las enzimas implicadas en el metabolismo del ácido glucónico en *Corynebacterium glutamicum* fue iniciada por Mateos y col. (1996). Estudiando el proceso de conjugación entre *E. coli* y Corinebacterias se obtuvieron vectores suicidas conjugativos portadores de fragmentos al azar de *C. glutamicum* mediante el cual podían recombinar con la zona del genoma bacteriano homóloga al fragmento portado por el plásmido. Usando esta metodología se aislaron mutantes denominados TRA que presentaban distintas características, siendo uno de ellos incapaz de crecer en medio mínimo con glucónico como única fuente de carbono (clon TRA-8). El plásmido integrado fue rescatado del cromosoma y su posterior secuenciación permitió determinar que la integración afectaba al gen *gntP*, el cual codifica para la actividad enzimática gluconato permeasa (Valbuena, 1999). Dado que en microorganismos como *E. coli* o *B. subtilis* el gen *gntP* se encuentra formando un operón con el gen *gntK* (gluconato kinasa), intentamos estudiar la organización de los genes de *C. glutamicum* implicados en la utilización del glucónico.

3.2 Identificación del gen *gntK* (gluconato kinasa) en el genoma de *Corynebacterium glutamicum*

El primer paso para identificar el gen implicado en la actividad enzimática gluconato kinasa fue analizar el genoma total del microorganismo estudiado. Para ello se realizó una búsqueda en las bases de datos de los genes ya caracterizados como codificantes para la actividad gluconato kinasa en distintos microorganismos tales como: *Streptomyces coelicolor*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteriditis*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, etc. Así pues se recurrió a una amplia lista de distintos genes *gntK* de los cuales la mayoría presentaban un tamaño similar de 500 pb aproximadamente, exceptuando *B. subtilis* y *S. aureus* con un tamaño de casi el triple de nucleótidos. El resultado de esta búsqueda nos permitió identificar una secuencia, no caracterizada en la base de datos, dentro del genoma total de *C. glutamicum* tomada como probable gen *gntK*. Es interesante señalar que cuando se realizó este trabajo se

disponía de la secuencia del genoma de *C. glutamicum* en “bruto”, es decir, no anotada. En la Figura 3.1 se representa un alineamiento de la proteína para la cual codificaba esta secuencia problema con respecto a 4 enzimas gluconato kinasa de los microorganismos que podrían considerarse como los más representativos a la hora de establecer identidades

Con la secuencia establecida como posible gen *gntK*, se realizó una búsqueda dentro del genoma completo no anotado de *C. glutamicum* para posicionarla. Para ello se utilizaron los primeros 40 nucleótidos de la secuencia encontrada (extremo 5' del gen) como palabra a buscar dentro de un archivo de texto que contenía el genoma completo de *C. glutamicum*; de esta forma se localizó el gen *gntK* con respecto al origen de replicación tomado como punto inicial del archivo que contenía la secuencia completa del genoma y se determinó la longitud total del gen correspondiente que es de 504 nucleótidos. Igualmente se identificaron los marcos de lectura adyacentes al gen *gntK* para posicionarlos dentro de un hipotético operón y comprobar si alguna de las secuencias adyacentes tenía alguna función relacionada con el metabolismo del ácido glucónico. Los resultados obtenidos nos indujeron a pensar que este gen se encuentra de forma aislada en el genoma de *C. glutamicum*, sin formar parte de operón alguno.



Figura 3.1.- Alineamiento proteico correspondiente al gen *gntK* (actividad gluconato kinasa) en algunos de los microorganismos analizados.

3.2.1 Amplificación del hipotético gen *gntK* por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Una vez identificado el posible gen *gntK* se procedió a realizar una amplificación de la secuencia problema. En primer lugar, se realizó una extracción de DNA total de *C. glutamicum* siguiendo el método previamente descrito (MyM 2.2.1.1). A partir de las secuencias adyacentes al gen *gntK* se diseñaron dos oligonucleótidos que serían utilizados como cebadores para dicha amplificación. A los oligonucleótidos diseñados se les añadieron extremos de reconocimiento para las endonucleasas *BamHI* (oligo de la región 5' del gen) y *HindIII* (oligo del extremo 3' del gen) para que el fragmento amplificado resultante del proceso de amplificación por PCR (MyM 2.2.6) pudiera insertarse de forma sencilla y dirigida en un vector de clonación. El resultado de la amplificación se sometió a una electroforesis en gel de azarosa (MyM 2.2.3.4) para establecer si el tamaño del fragmento obtenido se correspondía con el esperado: 738 nucleótidos (Fig. 3.2); el aislamiento de la banda del gel se realizó mediante el protocolo descrito (MyM 2.2.3.5).

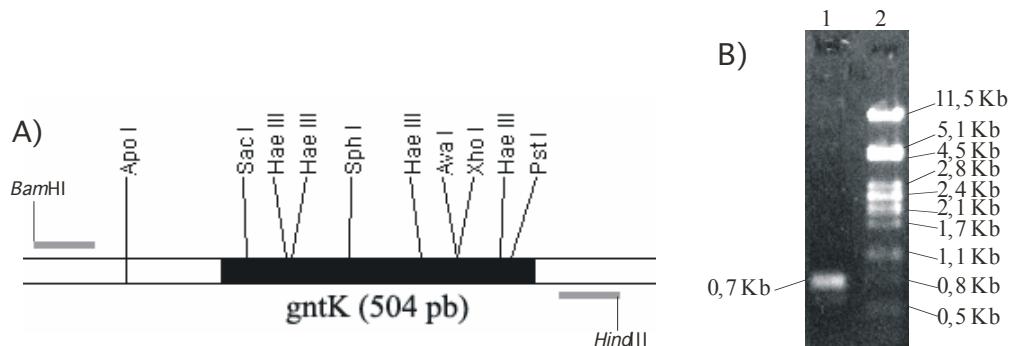


Figura 3.2.- A) Mapa de restricción del fragmento *gntK* incluyendo una representación gráfica de los oligonucleótidos diseñados que permitieron amplificar esta secuencia. B) Foto del gel realizado para comprobar el tamaño del fragmento amplificado por PCR. Carril 1, se observa una banda de DNA correspondiente al fragmento del tamaño esperado (738 pb); carril 2, como marcador de tamaños, genoma del fago lambda digerido con *PstI*.

3.2.2 Subclonación del gen *gntK*

El fragmento amplificado del genoma de *C. glutamicum* fue sometido a una digestión doble con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII* (MyM 2.2.3.1); al mismo tiempo se sometió al vector pBluescript SK a digestión con las mismas enzimas

de restricción, obteniéndose en el vector extremos compatibles con los del fragmento amplificado. La posterior ligación y selección de transformantes en la cepa *E. coli* XL1Blue (por resistencia al antibiótico ampicilina) nos permitió identificar el plásmido recombinante pKSK11 que presentaba un tamaño de 3,7 Kb acorde al esperado y con las características que se reseñan en la Figura 3.3.

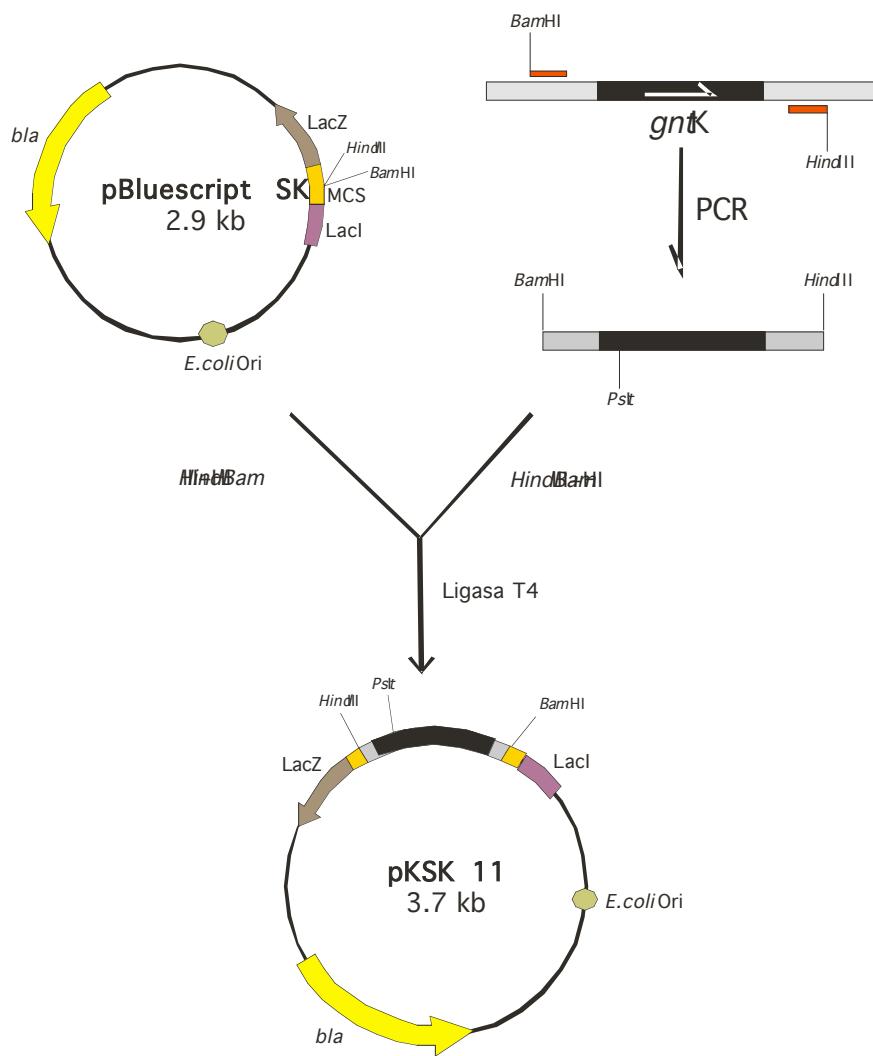


Figura 3.3.- Subclonación del fragmento contenido en el gen *gntK* en el vector pBluescript KS para obtener el plásmido recombinante pKSK11.

3.2.3 Secuenciación y análisis del gen *gntK*

Se realizó una secuenciación de la construcción pKSK11, utilizando para ello el método enzimático de Sanger o método de los didesoxinucleótidos (MyM 2.2.7.1) en un sentido y en el contrario, mediante primers directos y reversos correspondientes al vector pBluescriptSK. Se comprobó que el fragmento portado por esta construcción era

realmente el correspondiente al gen *gntK* y en la Figura 3.4 se muestra la secuencia nucleotídica obtenida. Posteriormente se obtuvieron los parámetros físico-químicos de la enzima (Tabla 3.1) y se estudiaron las secuencias adyacentes al gen para buscar potenciales regiones reguladoras, así como regiones internas que pudieran constituir motivos o dominios importantes. Se realizó una búsqueda de un posible promotor para la región 5' de la secuencia estudiada; de esta forma se identificó un potencial nucleótido de inicio de la transcripción (+1) posicionando las cajas -10 (^{5'}TATGAT^{3'}) y -35 (^{5'}CTTACA^{3'}) como se muestra en la Figura 3.4. De una forma análoga se localizó una posible región de unión con la proteína CRP en un sistema de represión catabólica, siendo la secuencia: ^{5'}TGTGA-N₆-ACACC^{3'} (De Combrudghe, 1984). Por último la comparación del gen *gntK* con la base de datos PROSITE, ha permitido localizar un sitio de unión a ATP/GTP propio de kinasas: 5'[AG]-x(4)-G-K-[ST]3'.

```
(BamHI) CGCGGATCC>>>>> >>>>>>> >>>
tatccgctcc acgtgagaat cattccgaaac ggaaaagacc aataaacata cagtcccggt gatgtgacca 70
tacacaccac gggactgtg cgcttaggtct tacaaaattc cccaaaaaga gtatgtatg taccataaag 140
tttttgtggc agcctcctgc attcggcagt cgagacgcca ccaaagaaag gataagacat gtcagcagcc 210
M S A A
gaaggcttac atattgtcgat catggcggtt tctggctcg gcaaatcctc cgtcggtaaa gccctagcag 280
E G L H I V V M G V S G C G K S S V G K A L A
cggagctcg aatcgaatac aaagacggcg acgaacttca cccccaggaa aacatcgaca agatggcctc 350
A E L G I E Y K D G D E L H P Q E N I D K M A S
cggccaggca cttagcgcacg acgaccgtgc atggcgcta gtccagggtt gcaagtggct ccgcgaccga 420
G Q A L D D D D R A W W L V Q V G K W L R D R
ccaaagcgccg tcatecgcatg ctccgcctc aagcgctct accgcgatct cctgcgcacc aaatgcccag 490
P S G V I A C S A L K R S Y R D L L R T K C P
gaaccgtctt cgtcccacctc cacggcgact acgatctctt acttccgcg atgaaggccc gcgaagatca 560
G T V F V H L H G D Y D L L L S R M K A R E D H
cttcatgcca tccaccctgc tagattccca atttgcAAC ctcgagccgc tcaagatga cgaagatg 630
F M P S T L L D S Q F A T L E P L E D D E D G
aagggtttcg acgttgccca caccatcagc gaactggccg cccaatctgc agagtgggtt cgcaacaat 700
K V F D V A H T I S E L A A Q S A E W V R N K
aaaccctaa cccatattag aacaaggatt tgtgcgttt ttcctgttct ggtgtggctt ttccctcacat 770
.
<<< <<<<<<<<
ctaaacaatcg aataactgtt cgaataaaaag gttgaagggtg tcccacccccc acggcacaat ggatggcaag 840
<<<<<<< <AAGCAAGGG (HindIII)
aacacatgaa tccaggggga tactcatgac cactgacatc tacttcagcc acaacaaccc acacgacc 910
tacggccacc acaccacccg actcaacccg gacaccacc acctctgggtt caccctcacc accgactcca 980
acttcgacgc agactccttc accaccgaag tcatccggat caccggctac tcccgccacg aagtcaacaa 1050
```

Figura 3.4.- Representación del gen *gntK*: en gris se resalta una posible secuencia de represión catabólica, en amarillo el posible promotor con sus cajas -10 y -35 y un posible inicio de la transcripción (+1), en rojo motivo de unión a ATP/GTP propio de una kinasa. También se han representado los oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen *gntK* por PCR.

Número de aminoácidos:	167
Teórico punto Isoeléctrico:	5.07
Peso Molecular:	18 KDa
Índice de inestabilidad (II):	48.33 (inestable)
Índice alifático:	86.47
Residuos de carga positiva (Asp + Glu):	28
Residuos de carga negativa (Arg + Lys):	19

Tabla 3.1.- Parámetros físico-químicos del enzima Gluconato Kinasa de *C. glutamicum*.

3.2.4 Interrupción del gen *gntK* en corinebacterias

El objetivo de este apartado era realizar un análisis funcional que nos permitiera dilucidar que el gen clonado era realmente el gen *gntK*. Para este fin se realizó un ensayo de interrupción del hipotético gen *gntK* (Shortle y col., 1980) usando el vector movilizable pK18mob, el cual funciona como plásmido suicida en corinebacterias. Cuando se clona en pK18mob un fragmento interno de un gen de corinebacterias, la presión selectiva favorecerá la integración por recombinación homóloga del plásmido recombinante con la consiguiente interrupción de ese gen en *C. glutamicum* y *B. lactofermentum*. En el caso del gen *gntK*, y dado el pequeño tamaño del mismo, era difícil conseguir un fragmento interno que por una parte provoque una interrupción génica en el cromosoma del hospedador y que tenga un tamaño suficientemente grande para favorecer los procesos de recombinación homóloga. Para obtener este inserto se procedió a digerir el fragmento *BamHI-HindIII* de 0,8 Kb (gen *gntK*) con la endonucleasa *HaeIII* que reconoce una diana de 4 pares de bases; los fragmentos generados fueron adecuadamente separados en geles de agarosa (al 1,5 %), seleccionando la banda que presentaba un tamaño de 200 pb.

La banda *HaeIII* recuperada fue ligada con el plásmido móvil pK18mob que había sido previamente digerido con la endonucleasa *SmaI* y desfosforilado con fosfatasa alcalina (MyM 2.2.3.2) para evitar en la medida de lo posible los procesos de reasociación consigo mismo en vez de obtener moléculas recombinantes. Las construcciones fueron seleccionadas originalmente en la cepa *E. coli* XL1Blue mediante selección por resistencia al antibiótico kanamicina y fenotipo blanco en presencia de IPTG/X-gal para el sistema de α -complementación de la β -galactoxidasa (MyM 2.2.4.4). Los clones seleccionados como positivos fueron denominados pKMM, siendo

possible obtener dos tipos posibles de construcciones (pKMM3 y pKMM4) ya que los extremos romos generados en las digestiones no permiten mantener la direccionalidad en la ligación. Posteriormente los plásmidos pKMM3 y pKMM4 fueron utilizados para transformar la cepa *E. coli* S17-1 (MyM 2.2.4.1), cepa esta que permite la movilización de estas construcciones desde *E. coli* a distintas cepas de *C. glutamicum* y *B. lactofermentum*.

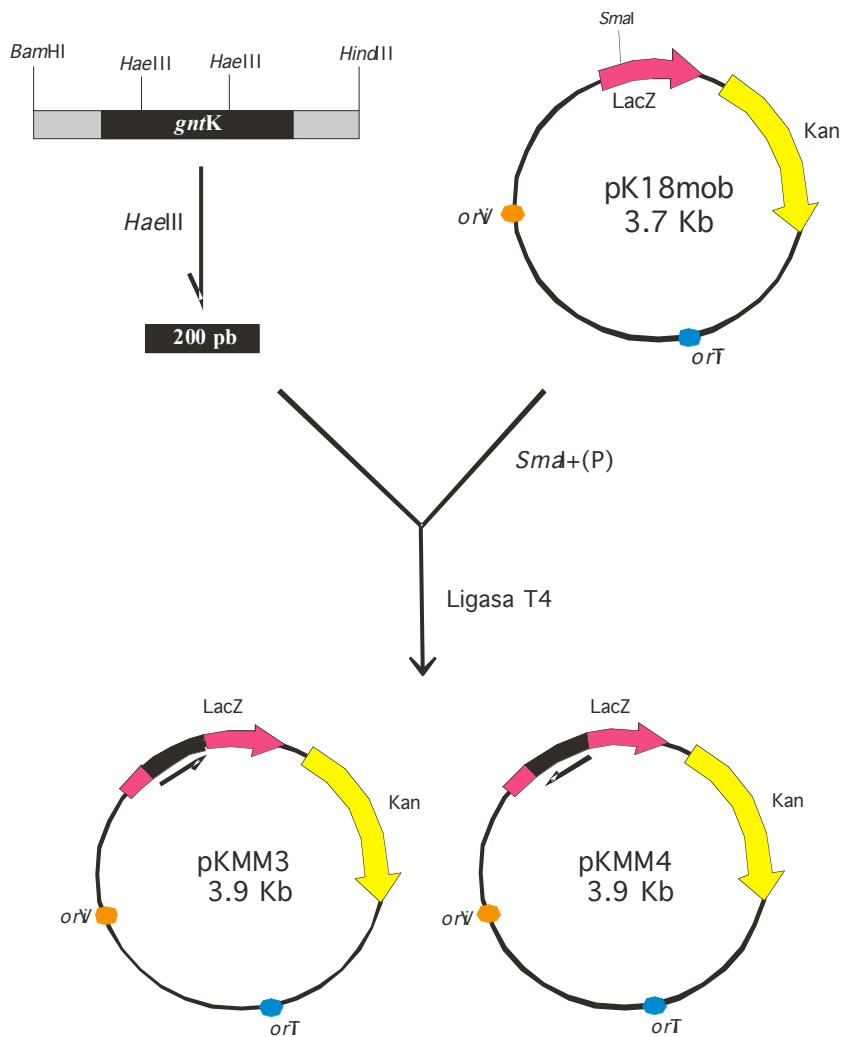


Figura 3.5.- Construcción de los plásmidos pKMM3 y pKMM4 por digestión *Hae*III del fragmento portador del gen *gntK* y ligación con el vector pK18mob. Las construcciones obtenidas se diferencian únicamente por el sentido del inserto.

3.2.5 Conjugación *E. coli*-corinebacterias y análisis de los transconjugantes

Una vez obtenidos las cepas de *E. coli* S17-1 portadores de los vectores pMM3/4, se realizaron experimentos de conjugación con las cepas de corinebacterias *C. glutamicum* ATCC 13032 (silvestre) y la cepa mutante *B. lactofermentum* R31 (MyM 2.2.4.5). Los clones transconjugantes de corinebacterias se seleccionaron por resistencia a kanamicina, y tal como se esperaba, el plásmido se integró en el cromosoma como se comprobó al intentar aislar plásmidos de estos clones. La integración de estos plásmidos movilizables recombinantes en el genoma de corinebacterias debe producir una interrupción génica a nivel del gen *gntK*, obteniéndose clones que deben presentar una alteración en la actividad gluconato kinasa. Cabe resaltar que debido al pequeño tamaño del fragmento homólogo interno al gen (200 pb) el número de transconjugantes obtenidos fue bajo, entre 30 y 60 por ensayo, utilizando 10^8 células donadoras. Los ensayos fueron realizados por duplicado, en todos los casos se obtuvieron resultados positivos.

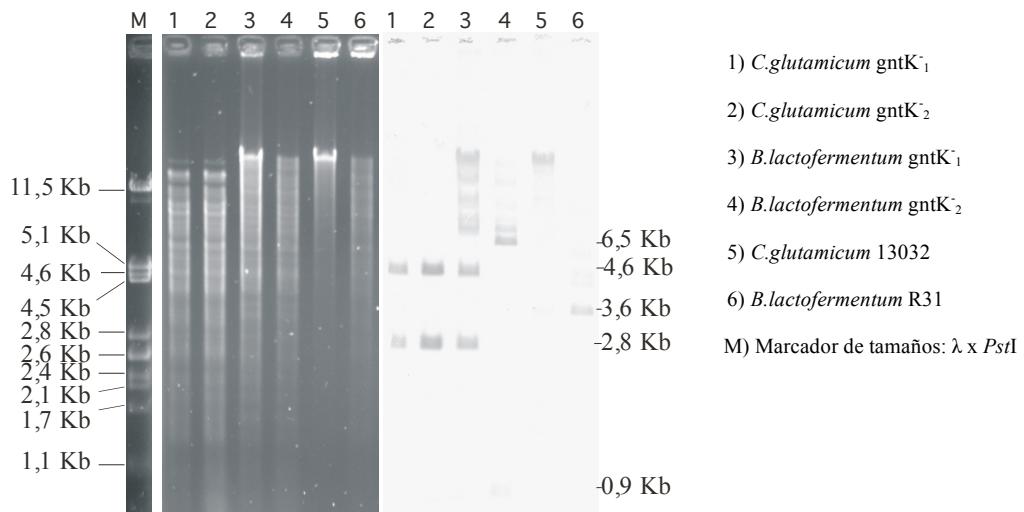
3.2.6 Comprobación de interrupción del gen *gntK* por hibridación Southern

Con el fin de comprobar si realmente se había producido una interrupción del gen en los transconjugantes, se realizaron ensayos de hibridación Southern (MyM 2.2.5). La sonda utilizada en la hibridación fue la banda *BamHI-PstI* de 0,7 Kb. obtenida a partir del plásmido pKSK11 (Fig. 3.3). El producto de esta digestión se sometió a una electroforesis en gel de agarosa y la banda correspondiente fue sometida a marcaje no radiactivo con digoxigenina.

Se extrajo DNA total de 4 clones transconjugantes distintos: 2 clones de la conjugación entre *E. coli* pKMM3/4 con la cepa silvestre de *C. glutamicum*, 2 clones del ensayo con el mutante *B. lactofermentum* R31; como controles se utilizaron las cepas *C. glutamicum* ATCC13032 y *B. lactofermentum* R31. Los DNAs totales de todas las muestras fueron digeridas con la endonucleasa *EcoRI* posteriormente sometidas a electroforesis en gel de agarosa. Las muestras del gel fueron posteriormente transferidas a una membrana de nylon y sometidas a hibridación con la sonda marcada. En la Figura 3.6-A se muestran los resultados de la hibridación donde se puede apreciar claramente que los procesos de integración de los vectores movilizables han ocurrido en todos los clones transconjugantes interrumpiendo el gen *gntK* en el cromosoma bacteriano. En el caso de los dos clones transconjugantes de *B. lactofermentum* se

observan las 2 posibilidades existentes de la interrupción génica. Los tamaños de las bandas de hibridación concuerdan con los tamaños estimados para esas bandas después de producirse la integración de los vectores, tal y como se muestra en el esquema de la Figura 3.6-B.

A)



B)

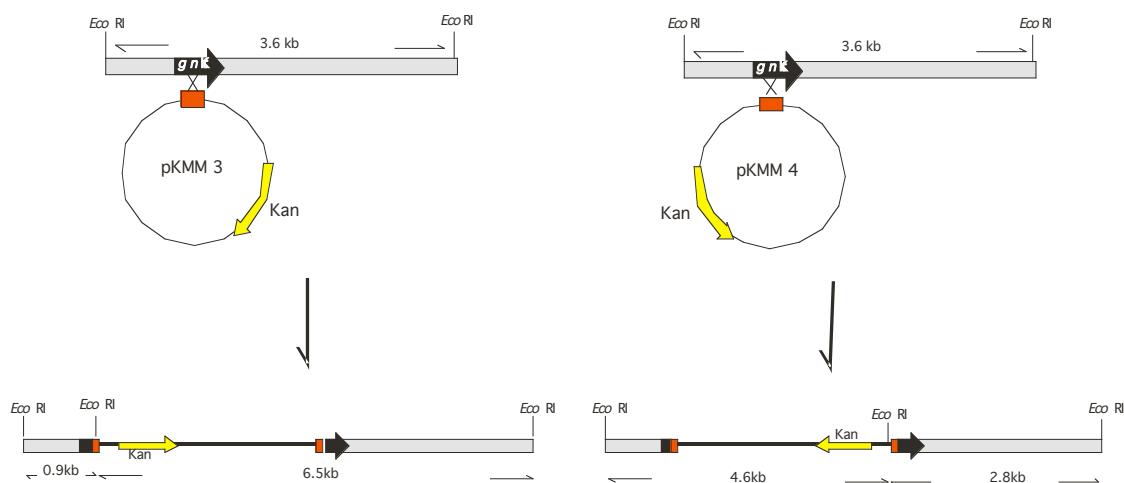


Figura 3.6.- A) Fotos del gel y membrana de hibridación Southern realizados para comprobar la interrupción génica de *gntK*. B) Esquema de los patrones de bandas esperados. En los carriles 1, 2 y 3 de la membrana de hibridación el patrón de bandas es el esperado para la integración con pKMM4, mientras que en el cuarto carril se ha producido el patrón de bandas esperado según la integración con pKMM3. En los controles (carriles 5 y 6) se observan bandas de 3,6 Kb por no presentar la integración del vector. El resto de las bandas observadas en la membrana de hibridación son producto de una incompleta digestión *EcoRI*.

3.2.7 Análisis nutricional de los transconjugantes obtenidos

Una vez establecida la interrupción génica hay que comprobar si realmente esta interrupción provoca algún tipo de mutación que sea fenotípicamente detectable; para

realizar estos análisis, los clones transconjugantes de corinebacterias fueron incubados en medio mínimo para corinebacterias (MyM 2.1.4.2) con glucosa o ácido glucónico como únicas fuentes de carbono. En todos los casos el crecimiento de las colonias analizadas en medio mínimo con glucosa fue positivo tanto en los clones transconjugantes como en los controles de las cepas originales. Por el contrario cuando se analizaron los clones transconjugantes en medio mínimo con glucónico como fuente de carbono, únicamente fueron capaces de crecer los controles correspondientes a las cepas originales, pero no los transconjugantes. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 3.7. La foto A) muestra un crecimiento normal de todos los clones ya que se trata de una placa petri que contiene medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono. En la foto B) (MM con glucónico como única fuente de carbono) se observa que sólo crecen correctamente las cepas silvestres; en el caso de *C. glutamicum* gntK⁻ se observa un cierto número de revertentes que surgen por la presión selectiva provocada por la falta de capacidad de metabolizar la única fuente de carbono presente en el medio. En el caso de las cepas de *B. lactofermentum* R31 gntK⁻ se observa que no existe crecimiento y que no hay revertentes, esto es debido a que esta cepa de *B. lactofermentum* no crece eficientemente en MM con glucónico.

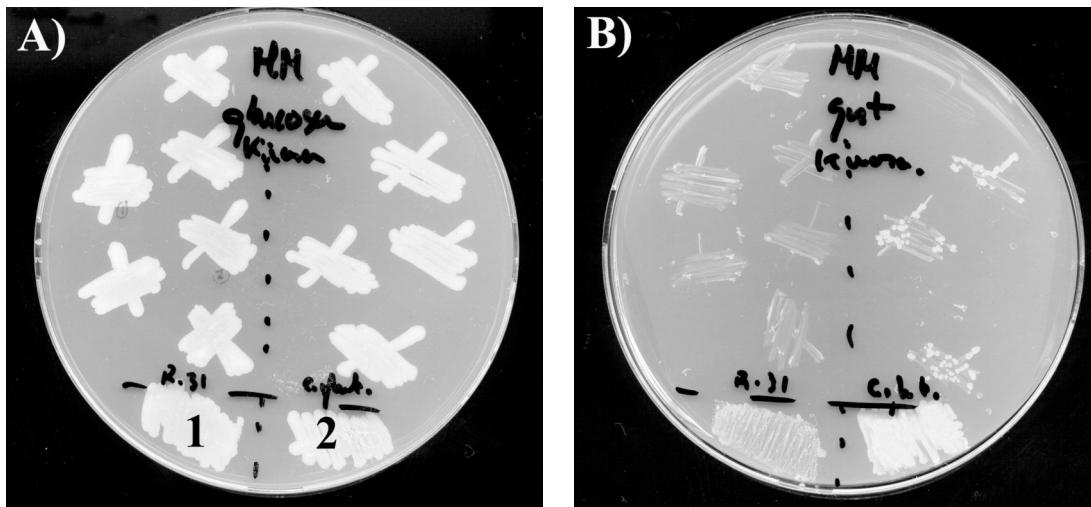


Figura 3.7.- A) Medio Mínimo con glucosa: 1) Control de positivo de *B. lactofermentum* R31, sobre ese control se observan los correspondientes transconjugantes gntK⁻ de esta cepa. 2) Control positivo de *C. glutamicum* ATCC13032, sobre este control se sembraron los correspondientes transconjugantes gntK⁻. B) Medio Mínimo con glucónico. Se sembraron en idéntica disposición tanto los controles como los transconjugantes.

3.3 Interrupción del gen *gntP* (gluconato permeasa)

Como ya hemos explicado, el origen de este estudio fue el descubrimiento del mutante *C. glutamicum* TRA-8 que presentaba el gen *gntP* interrumpido por integración al azar de un plásmido suicida. Esta interrupción se localizaba cercana al extremo 5' del gen *gntP*. En el presente trabajo se realizó un experimento similar al descrito para interrumpir el gen de la gluconato kinasa; mediante este procedimiento se pretendía interrumpir de forma dirigida el gen *gntP* de una manera distinta a la encontrada en el mutante TRA-8, es decir, más cercana al extremo 3' del gen. Para ello se eligió el fragmento *Bgl*II-*Pst*I como fragmento mutagénico (Fig. 3.8). Se esperaba conseguir un mutante que previsiblemente requerirá ácido glucónico en un medio definido, de forma análoga al requerimiento que presenta el mutante TRA-8.

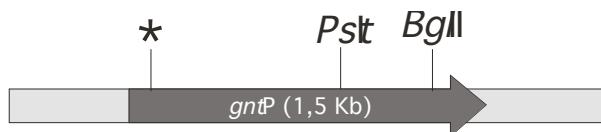


Figura 3.8.- Representación del gen *gntP* de *C. glutamicum*. El asterisco (*) indica la zona de integración en el mutante TRA-8. La zona delimitada por las endonucleasas *Pst*I y *Bgl*II ha sido la utilizada en este trabajo para interrumpir de forma dirigida el gen *gntP*.

El fundamento del ensayo es análogo al descrito para interrumpir el gen *gntK* (Resultados 3.2). Un fragmento *Pst*I-*Bgl*II interno al gen *gntP* fue obtenido del vector pULMV1 (MyM 2.1.3); el fragmento *Pst*I-*Bgl*II de 600 nucleótidos fue purificado de un gel de agarosa y ligado con el vector móvil pK18mob, el cual había sido a su vez digerido con las mismas enzimas de restricción. La mezcla de ligación fue usada para transformar la cepa *E. coli* XL1-blue, seleccionando los clones recombinantes por ausencia de color y resistencia al antibiótico kanamicina; el plásmido recuperado de estos clones de *E. coli* presentaba el tamaño y patrón de restricción esperado y se denominó pKP1 (Fig. 3.9).

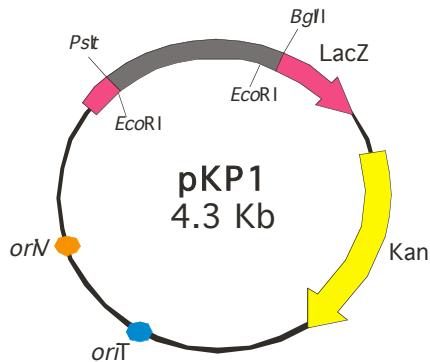


Figura 3.9.- Representación del vector pKP1 obtenido de la subclonación de un fragmento del gen *gntP* en el vector pK18mob.

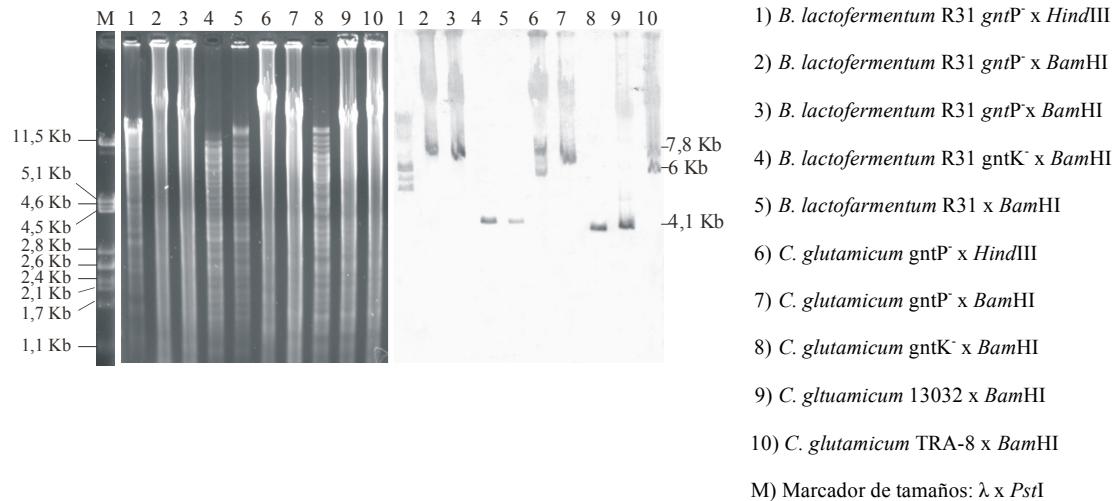
Para intentar interrumpir el gen *gntP* de corinebacterias, se transformaron células de la cepa *E. coli* S17-1 con el plásmido pKP1, y se conjugaron *C. glutamicum* ATCC13032 y *B. lactofermentum* R31, cepas en las que el plásmido pKP1 se comporta como plásmido suicida. Los transconjugantes se obtuvieron por medio TSB con kanamicina y carecían de plásmido tal y como se esperaba.

3.3.1 Hibridación Southern

Para comprobar que los transconjugantes de corinebacterias obtenidos con el plásmido pKP1 presentaban integración del plásmido suicida en el cromosoma, y que dicha integración había ocurrido en la diana cromosómica que estaba siendo objeto de nuestro análisis (gen *gntP*), se procedió a realizar un ensayo de hibridación Southern. Por una parte se realizaron extracciones del DNA total de varios de los transconjugantes obtenidos pertenecientes a las cepas *C. glutamicum* y *B. lactofermentum* R31; los DNAs totales fueron sometidos a digestión con las endonucleasas de restricción *BamHI* y *HindIII*. La sonda utilizada para la hibridación se obtuvo por digestión del plásmido pKP1 con la endonucleasa *EcoRI* (Fig. 3.9); el fragmento obtenido de aproximadamente 500 pb fue purificado y marcado con digoxigenina. Los resultados obtenidos en el ensayo de hibridación se muestran en la Figura 3.10-A; los tamaños de las bandas de hibridación obtenidas en cada una de las muestras concuerdan con los tamaños estimados para esos fragmentos después de recombinar con el gen *gntP*, tal y como se muestra en el esquema de la Figura 3.10-B. En los carriles 1 y 6 se pueden ver bandas de 7,9 y 6 Kb, correspondientes a las digestiones *HindIII* de DNA transconjugante con el gen *gntP* interrumpido. En los carriles 2, 3 y 7 se observa una banda de 7,8 Kb correspondiente a la digestión por *BamHI* de los DNA transconjugantes. Los carriles 4,

5, 8 y 9 presentan el patrón esperado para los controles, DNA de *B. lactofermentum* y *C. glutamicum* silvestres, digeridos por *BamHI*: una banda de 4,1 Kb. En el carril 10 se observa el patrón de bandas del mutante TRA-8 que posee un mapa de restricción distinto (Mateos y col, 1996).

A)



B)

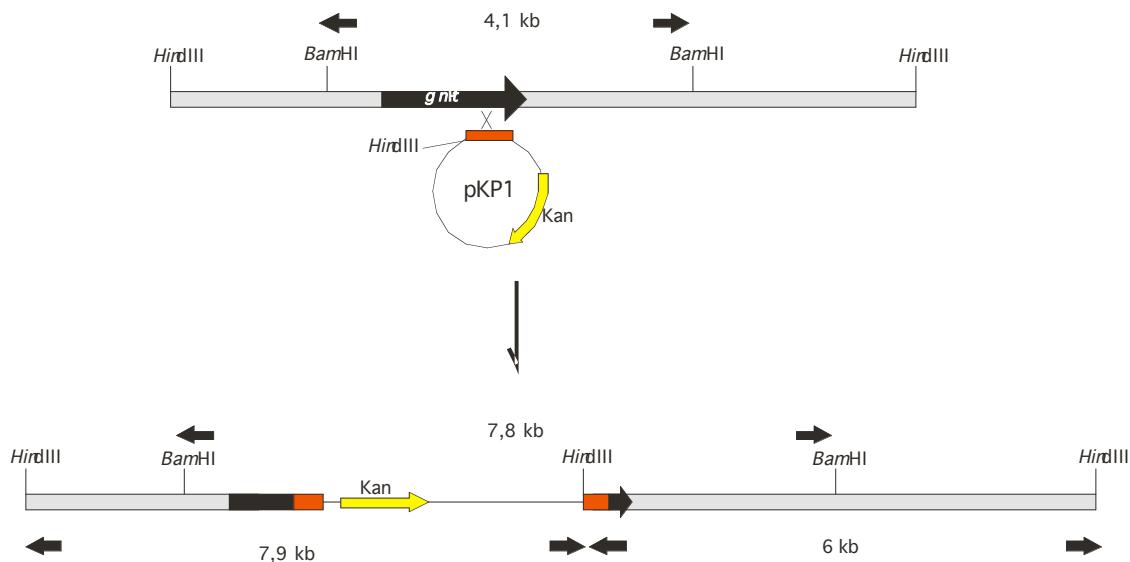


Figura 3.10.- A) Resultados de la hibridación Southern que demuestra la interrupción génica de *gntP*. B) Esquema de los patrones de bandas esperados.

3.3.2 Análisis nutricional de los transconjugantes obtenidos

Los clones transconjugantes que presentaban interrupción del gen *gntP* fueron analizados en diferentes medios de cultivo. Cuando estos clones fueron cultivados en medio mínimo de corinebacterias con glucosa como fuente de carbono y energía, todos ellos, tanto los controles como los transconjugantes crecieron eficientemente (Fig. 3.11-A). Esos mismos clones fueron cultivados en medio mínimo con ácido glucónico como única fuente de carbono. Los resultados mostraron incapacidad de crecimiento en este medio mínimo de los clones transconjugantes (tanto en cepas de *C. glutamicum* como de *B. lactofermentum*) mientras que las cepas control no interrumpidas crecieron en este mismo medio (Fig. 3.11-B). El comportamiento de estos clones recombinantes es análogo al observado en el mutante *C. glutamicum* TRA-8 previamente descrito (Valbuena 1999).

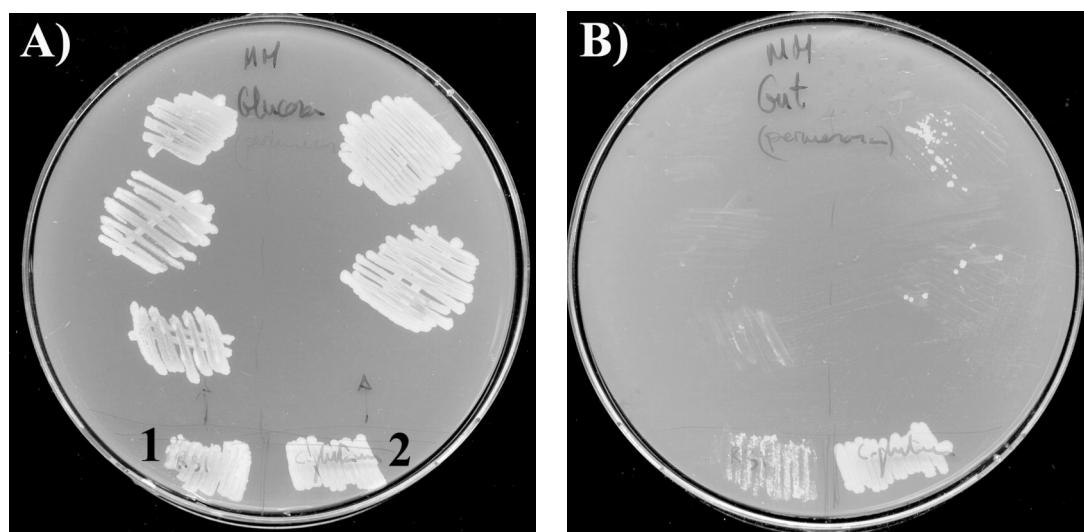


Figura 3.11.- A) Placa contenido MM de corinebacterias con glucosa: 1- Control positivo de *B. lactofermentum* R31, sobre el mismo se sembraron los transconjugantes *gntP*⁻ de la misma cepa. 2- Control positivo de *C. glutamicum* ATCC13032, sobre el mismo se sembraron a su vez sus correspondientes clones *gntP*⁻. B) Placa Petri contenido MM de corinebacterias con glucónico, se ha sembrado de forma idéntica a la placa A.

3.4 Mapa físico de *Corynebacterium glutamicum*

Teniendo en cuenta la identificación y caracterización de una serie de genes perteneciente al grupo de corinebacterias (dos de los cuales se mencionan en el apartado anterior) y dado que recientemente se depositó en la base de datos la secuencia completa sin anotar del genoma de *Corynebacterium glutamicum*, se procedió a la realización de un mapa físico de genes ya caracterizados y publicados con el fin de posicionarlos con respecto al origen de replicación del cromosoma bacteriano y ver su posición relativa.

Las secuencias obtenidas de la base de datos del EBI se introdujeron en el programa BLAST del genoma completo de *C. glutamicum* localizado en la página Web de NCBI en el apartado “BLAST of Microbial Genomes”. BLAST alinea las secuencias problema con respecto al genoma total en ambos sentidos (5'→3' y 3'←5' en complementaria) y proporciona su posición con respecto al origen de replicación (“Ori”) que se encuentra en el punto 0 del genoma circular. Una vez obtenida la posición se introduce en un archivo EXCEL junto con todas las demás secuencias problema obtenidas en la base de datos de EBI para posteriormente dibujar el mapa físico.

Como un control interno adicional, se utilizó en paralelo un archivo de texto que contenía el genoma completo de *C. glutamicum* para introducir las secuencias nucleotídicas encontradas en EBI, como palabras a buscar dentro del genoma total, cuyo punto inicial era también el origen de replicación.

Todos los genes analizados fueron agrupados en 9 categorías distintas, siendo estas categorías una simplificación de las utilizadas para clasificar los genes en *E. coli* establecidas por Monica Riley (Karp y col., 2002). Hemos posicionado genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos, genes de división celular, codificantes para proteínas y RNA ribosomales, implicados en el metabolismo celular, en el transporte de compuestos a través de la membrana y en la transcripción o la síntesis de cofactores.

Mapa físico de
Corynebacterium glutamicum

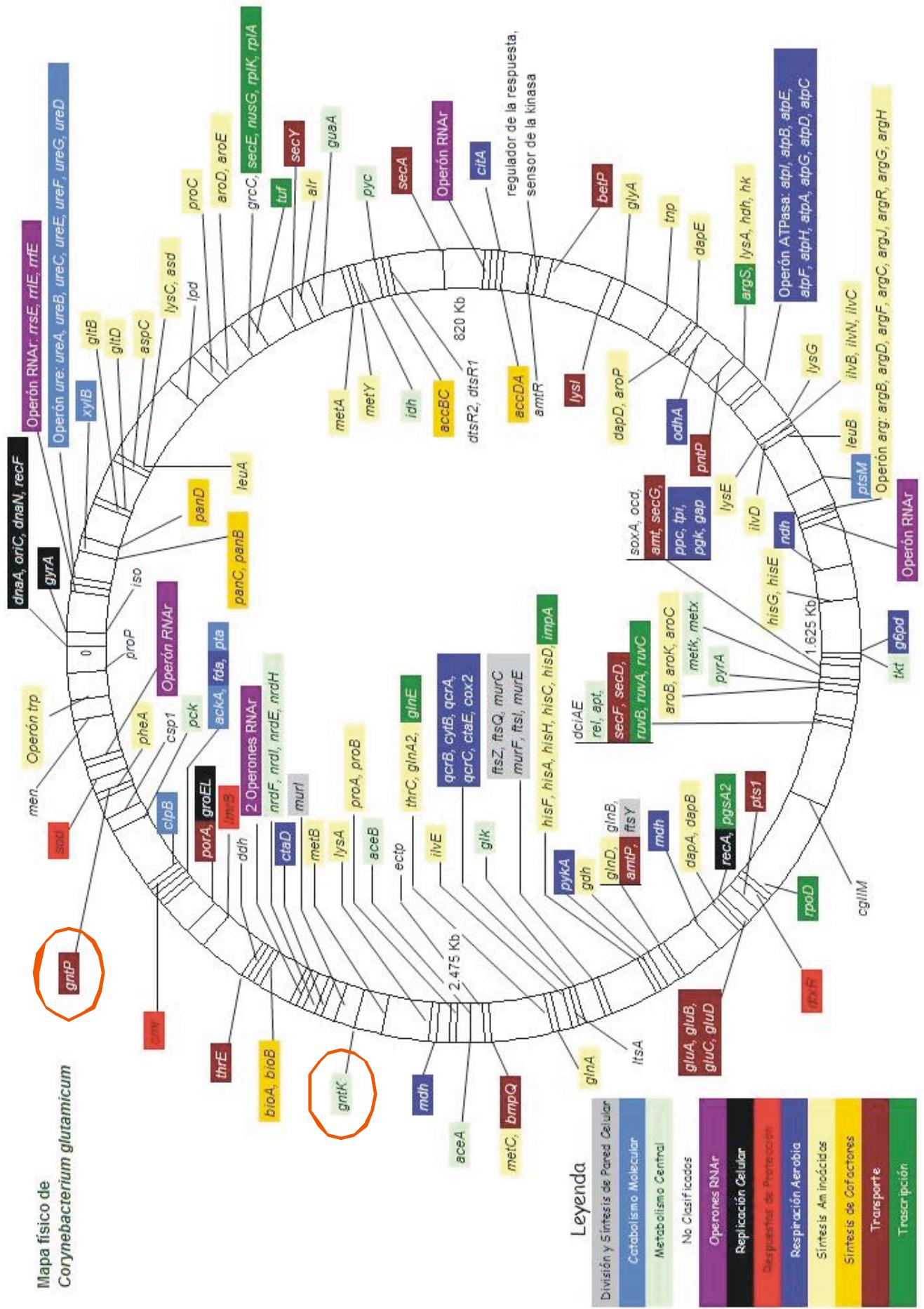


Figura 3.12.- Mapa físico de *C. glutamicum*. En el gráfico se representa la disposición de los genes, externamente al cromosoma bacteriano se representan los genes cuya transcripción se da en el sentido de las agujas del reloj e internamente al cromosoma se han dispuesto los nombres de aquellos genes cuyo sentido es el contrario. Resaltadas de rojo se encuentran los genes caracterizados en el presente trabajo.

En la siguiente tabla se representa un listado alfabético de los marcadores señalando el producto de su codificación, sentido en el cromosoma y posición. Los genes utilizados en la elaboración de este mapa físico provienen de la base de datos EBI. No se han incluido aquellas secuencias con una posible función no demostrada de forma experimental (secuencias putativas) ni aquellas presentes de forma parcial o repetida en la base de datos. Tan solo se han podido obtener 220 genes en total que cumplan estos requisitos, teniendo en cuenta que el genoma de *C. glutamicum* tiene un tamaño de 3.309 Kb en total se estima que deberían existir 3.300 genes en este microorganismo aproximadamente, por tanto el 93 % aún no se ha caracterizado de forma definitiva.

Gen	Proteina	Sentido	Inicio	Fin	Gen	Proteina	Sentido	Inicio	Fin
accBC	ACoA Carboxilasa	(-)	718576	720352	dnaN	DNA polimerasa III subunidad beta	(+)	2292	3476
accDA	Subunidad carboxiltransferasa de acetil-CoA carboxilasa	(-)	879638	881114	dtsR1	dtsR 1	(-)	728692	730324
aceA	Isocitrato Liasa	(+)	2470739	2472032	dtsR2	dtsR 2	(-)	726738	728351
aceB	Malato sintasa	(-)	2467921	2470141	dtxr	Represor de la toxina difterica	(+)	2022265	2022952
ackA	Acetato kinasa	(-)	2935311	2936505	ectp	Ectp proteina	(-)	2448324	2450172
alr	Alanina racemasa	(+)	600970	602056	fda	Fructosa bifosfato aldolasa	(-)	2954237	2955272
amt	Transporte de amonio	(-)	1675264	1676623	ftsI	Proteina de union a penicilina	(-)	2291208	2293323
amtP	Proteina de captacion de amonio de baja afinidad	(-)	2172150	2173467	ftsQ	ftsQ	(-)	2280466	2281135
amtR	Represor del sistema captacion de amonio de alta afinidad	(-)	922392	923061	ftsY	ftsY	(-)	2173755	2174163
apt	Adenina fosforibosil transferasa	(-)	1754915	1755473	ftsZ	ftsZ	(-)	2278886	2280203
argB	N-acetilglutamato kinasa	(+)	1460492	1461377	g6pd	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa	(+)	1667949	1669404
argC	N-acetilglutamato-5-semialdehido deshidrogenasa	(+)	1464082	1465126	gap	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa	(-)	1682616	1683627
argD	Actilornitina transaminasa	(+)	1461378	1462548	gdh	Glutamato deshidrogenasa	(-)	2194738	2196082
argF	Ornitina carbamoil transferasa	(+)	1462562	1463522	glk	Glucosa kinasa	(-)	2316578	2317550
argG	Argininosuccinato sintetasa	(+)	1470210	1471416	glnA	Glutamina sintetasa I	(+)	2348828	2350262
argH	Argininosuccinato liasa	(+)	1471476	1472913	glnA2	Glutamina sintetasa 2	(-)	2362814	2364098
argJ	Ornitina acetiltransferasa	(+)	1465210	1466377	glnB	Proteina PII	(-)	2171747	2172086
argR	Represor de la arginina	(+)	1469537	1470053	glnD	Uridiltransferasa	(-)	2169662	2171741
argS	Arginil-tRNA sintetasa	(+)	1238273	1239926	glnE	Adeniltransferasa	(-)	2359610	2362748
aroA	5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase	(-)	801186	802683	glt	Citrato sintasa	(+)	877837	879151
aroB	Deshidroquinato sintetasa	(-)	1717927	1719010	gltB	Glutamina 2 oxoglutarato aminotrasnferasa (subunidad grande)	(+)	195239	199772
aroC	Corismato sintasa	(-)	1719665	1720898	gltD	Glutamina 2 oxoglutarato aminotrasf. (subunidad pequena)	(+)	199772	201293
aroD	3-dehidroquinato deshidratasa	(+)	446086	446524	gluA	gluA	(+)	2059773	2060502
aroE	Shikimato deshidrogenasa	(+)	446537	447380	gluB	gluB	(+)	2060619	2061507
aroK	Shikimato kinasa	(-)	1719103	1719613	gluC	gluC	(+)	2061628	2062306
aroP	Permeasa de aminoacidos aromaticos	(-)	1153291	1154683	gluD	gluD	(+)	2062441	2063263
asd	Aspartato semialdehido deshidrogenasa	(+)	270659	271694	glyA	Serina hydroximethyltransferasa	(+)	1050623	1051928
aspC	Aspartato aminotransferasa	(+)	256598	257897	gntK	Gluconato kinasa	(+)	2630668	2631139
atpA	Subunidad alfa de ATPasa	(+)	1275012	1276656	gntP	Gluconato permeasa	(+)	3108130	3109523
atpB	Subunidad a de ATPasa	(+)	1272184	1273153	grcC	Heptaprenil difosfato syntetasa	(+)	494768	495113
atpC	Subunidad epsilon de ATPasa	(+)	1279158	1279533	groEL	GroEL	(-)	2888973	2890620
atpD	Subunidad beta de ATPasa	(+)	1277694	1279146	guaA	GMP-sintasa	(+)	620003	621575
atpE	Subunidad c de ATPasa	(+)	1273287	1273530	gyrA	DNA girasa (topoisomerasa II) subunidad A	(+)	11831	14401
atpF	Subunidad b de ATPasa	(+)	1273561	1274128	gyrB	DNA girasa (topoisomerasa II) subunidad B	(+)	5435	7489
atpG	Subunidad gamma de ATPasa	(+)	1275012	1276656	hdh	Homoserina deshidrogenasa	(+)	1242506	1243844
atpH	Subunidad delta de ATPasa	(+)	1274134	1274950	hisA	Fosforibosilformiminio-5-amino-1-fosforibosyl-4-imidazolcarboxamida isomerasa	(-)	2211878	2212616
atpI	atpI	(+)	1271879	1272122	hisC	Histidinol-phosphate aminotransferase	(-)	2216490	2217591
betP	Sistema de transporte glicina betaina	(+)	944995	946783	hisD	Histidinol deshidrogenasa	(-)	2217596	2218895
bioA	Diaminopelargonato aminotransferasa	(+)	2770713	2771985	hisE	Fosforibosil-ATP-pirofosfohidrolasa	(-)	1586461	1586725
brnQ	transportador de aa- branched-chain	(+)	2445716	2446997	hisF	Ciclasa	(-)	2210269	2211043
cglIM	cglIM	(+)	1878311	1879403	hisG	ATP fosforibosil transferasa	(-)	1585599	1586439
clpB	Proteina heat shock, ATP-binding protein	(-)	2963602	2966161	hisH	Glutamina amidotransferasa	(-)	2212630	2213266
cmr	Proteina de resistencia "multidrug"	(+)	2961341	2962723	hk	Homoserina kinasa	(+)	1243855	1244784
cop1	csp1	(-)	3071646	3073620	icd	Isocitrato deshidrogenasa	(-)	677827	680044
cox2	Citocromo c oxidasa subunidad 2	(-)	2326917	2327997	ilvB	Acetohidroxiacido sintasa subunidad grande	(+)	1338130	1340011
ctaD	Citocromo aa3 oxidasa subunidad I	(-)	2671059	2672814	ilvC	Acetohidroxiacido isomeroreductasa	(+)	1340723	1341740
ctaE	Citocromo aa3 oxidasa	(-)	2325269	2325887	ilvD	Dihidroacido deshidratasa	(-)	1333438	1335277
cytB	Citocromo b subunidad	(-)	2321468	2323088	ilvE	Transaminasa B	(-)	2335911	2337051
dapA	Dihidrodipicolinato sintetasa	(-)	2079277	2080183	ilvN	Acetohidroxiacido sintasa subunidad pequena	(+)	1340024	1340543
dapB	Dihidrodipicolinato reductasa	(-)	2081187	2081934	impA	Inositol monofosfato fosfatasa	(-)	2211047	2211827
dapD	Tetrahidrodipicolinato succinilasa	(-)	1152369	1153062	iso	HCCA isomerasa	(-)	18792	19557
dapE	Succinil diaminopimelato desuccinilasa	(+)	1155730	1156840	leuA	2-isopropilmalato sintasa	(-)	266150	268067
dciAE	Proteina de union a dipeptidos	(-)	1755714	1757223	leuB	3-isopropilmalato sintasa	(+)	1353488	1354511
ddh	Mesodiaminopimelato D-deshidrogenasa	(-)	2786752	2787715	lpd	Dihidrolipoamida deshidrogenasa	(+)	387691	389101
dnaA	ATPasa de iniciación de la replicación	(+)	1	1575	irmB	Resistencia a lincomicina	(-)	2857609	2859055

Gen	Proteina	Sentido	IInicio	Fin	Gen	Proteina	Sentido	IInicio	Fin
<i>itsA</i>	ItsA	(+)	2328515	2330438	<i>rplA</i>	Proteina ribosomal L1	(+)	499161	499872
<i>lysA</i>	Diaminopimelato descarboxilasa	(+)	1239932	1241266	<i>rplK</i>	Proteina ribosomal 50S L11	(+)	498598	499036
<i>lysA</i>	Diaminopimelato deshidrogenasa	(-)	2523232	2524195	<i>rpoD</i>	Factor sigma de RNA polimerasa	(+)	2012244	2013360
<i>lysC</i>	Aspartato kinasa	(+)	269370	270636	<i>rrfE</i>	rRNA 5s	(+)	81753	81873
<i>lysE</i>	Proteína exportadora de Lys	(-)	1328242	1328944	<i>rrfE</i>	rRNA 5s	(+)	861222	861342
<i>lysG</i>	Proteina de regulacion de la exportacion de lisina	(+)	1329014	1329887	<i>rrfE</i>	rRNA 5s	(+)	1484475	1484595
<i>lysI</i>	L-Lisina permeasa	(-)	1030365	1031871	<i>rrfE</i>	rRNA 5s	(-)	2703710	2703830
<i>mdh</i>	L-malato deshidrogenasa	(-)	2113860	2115363	<i>rrfE</i>	rRNA 5s	(-)	2712577	2712697
<i>mdh</i>	Malato deshidrogenasa	(+)	2522261	2523248	<i>rrfE</i>	rRNA 5s	(-)	3145969	3146089
<i>men</i>	Enzima malica	(+)	3208278	3209457	<i>rrlE</i>	rRNA 23s	(+)	78554	81641
<i>metA</i>	Homoserina O-acetyl transferasa	(-)	665179	666319	<i>rrlE</i>	rRNA 23s	(+)	858033	861120
<i>metB</i>	Cistathionina gamma-sintasa	(-)	2590308	2591469	<i>rrlE</i>	rRNA 23s	(+)	1481277	1484364
<i>metC</i>	Cistathionina beta-lisasa	(+)	2444605	2445712	<i>rrlE</i>	rRNA 23s	(-)	2703946	2707033
<i>metK</i>	Metionina adenosil trasnferasa	(-)	1699173	1700397	<i>rrlE</i>	rRNA 23s	(-)	2712813	2715900
<i>metX</i>	S-adenosil metionina sintetasa	(-)	1699160	1700807	<i>rrsE</i>	rRNA 16s	(+)	76642	78165
<i>metY</i>	O-acetylhomoserine sulfhydrylase	(-)	666456	667770	<i>rrsE</i>	rRNA 16s	(+)	856118	857641
<i>murC</i>	murC	(-)	2281162	2282623	<i>rrsE</i>	rRNA 16s	(+)	1479363	1480886
<i>murE</i>	Mesodiaminopimelato ligasa	(-)	2289529	2291196	<i>rrsE</i>	rRNA 16s	(-)	2707424	2708947
<i>murF</i>	D-alanil-D-alanina ligasa	(-)	2288639	2289519	<i>rrsE</i>	rRNA 16s	(-)	2716291	2717814
<i>murI</i>	D-glutamato racemasa	(-)	2658602	2659457	<i>rrsE</i>	rRNA 16s	(-)	3149678	3151201
<i>ndh</i>	NADH deshidrogenasa	(-)	1543150	1544554	<i>rvuA</i>	Holliday junction DNA-helicasa	(-)	1762512	1763133
<i>nrdE</i>	Ribonucleotido reductasa subunidad alfa	(-)	26777474	2679598	<i>rvuB</i>	Holliday junction DNA-helicasa	(-)	1761413	1762505
<i>nrdF</i>	Ribonucleotido reductasa subunidad beta	(-)	2673335	2673943	<i>rvuC</i>	Crossover junction endodeoxiribonucleasa	(-)	1763173	1763839
<i>nrdH</i>	Glutaredoxina	(-)	2680415	2680649	<i>secA</i>	Proteina secA	(+)	796249	798787
<i>nrdI</i>	nrdI	(-)	2679679	2680126	<i>secD</i>	SecD	(-)	1758796	1760710
<i>nusG</i>	Antiterminador transcripcional	(+)	497373	498330	<i>secE</i>	Componente del sistema de translocacion de proteinas	(+)	496809	497145
<i>ocd</i>	Ornitina ciclodescarboxilasa	(-)	1674119	1675208	<i>secF</i>	SecF	(-)	1757581	1758793
<i>odhA</i>	2-oxoglutarato deshidrogenasa	(-)	1172497	1176271	<i>secG</i>	Proteina secG	(-)	1677045	1677279
<i>oriC</i>	Origen de replicación	(+)	1575	2292	<i>secY</i>	Subunidad secY de la preproteina translocasa	(+)	569451	570774
<i>panB</i>	3-metil-2-oxobutanoato hydroxymetiltransferasa	(-)	127188	128004	<i>sod</i>	Superoxido dismutasa	(+)	3126391	3126994
<i>panC</i>	Pantoato-beta alanina ligasa	(-)	126349	127189	<i>soxA</i>	Sarcosina oxidasa	(-)	1673489	1674105
<i>panD</i>	Precursor L-aspartato-alpha-decarboxilasa	(-)	147569	147980	<i>thrC</i>	Treonina sintasa	(-)	2353596	2355042
<i>pck</i>	PEP carboxikinasa	(-)	3052058	3053891	<i>thrE</i>	Exportador de treonina	(+)	2790981	2792451
<i>pgk</i>	Fosfoglicerato kinasa	(-)	1681186	1682398	<i>tkt</i>	Transketolasa	(+)	1664474	1666505
<i>pgsA2</i>	Fosfatidil glicerofosfato sintasa	(-)	2070515	2071148	<i>tsp</i>	Transposasa	(+)	1114485	1115796
<i>pheA</i>	Prefenato deshidratasa	(-)	3098574	3099522	<i>tpi</i>	Triosafosfato isomerasa	(-)	1680328	1681108
<i>pntP</i>	Transporte de prolina	(-)	1218027	1219602	<i>trp</i>	Operon triptofano	(+)	3232696	3240422
<i>porA</i>	Porina	(-)	2887940	2888078	<i>trpA</i>	Triptofano sintasa	(+)	3239817	3240438
<i>ppc</i>	PEP carboxilasa	(-)	1677383	1680143	<i>trpD</i>	Antranilato fosforibosiltransferasa	(+)	3235601	3236648
<i>proA</i>	Gamma glutamil fosfato reductasa	(-)	2494335	2495634	<i>trpE</i>	Antranilato sintasa componente I	(+)	3233402	3234959
<i>proB</i>	Gamma glutamil kinasa	(-)	2496666	2497776	<i>trpL</i>	Secuencia leader de operon triptofano	(+)	3233150	3233204
<i>proC</i>	L-prolina NADP+ 5-oxidoreductasa	(+)	434885	435698	<i>tuf</i>	Proteina del factor de elongacion Tu	(+)	526375	527566
<i>proP</i>	proP	(-)	3272559	3274074	<i>ureA</i>	Subunidad gamma de ureasa	(+)	91173	91476
<i>pta</i>	Fosfato acetil transferasa	(-)	2936504	2937494	<i>ureB</i>	Subunidad beta de ureasa	(+)	91502	91991
<i>pts1</i>	PEP fosfotransferasa sistema 1	(-)	2039614	2041312	<i>ureC</i>	Subunidad alfa de ureasa	(+)	91992	93705
<i>ptsM</i>	PEP fosfotransferasa sistema 2	(+)	1423216	1425268	<i>ureD</i>	Proteina accesoria de ureasa	(+)	95521	96373
<i>pyc</i>	Piruvato carboxilasa	(+)	705210	708633	<i>ureE</i>	Proteina accesoria de ureasa	(+)	93730	94294
<i>pykA</i>	Piruvato kinasa	(-)	2205664	2207092	<i>ureF</i>	Proteina accesoria de ureasa	(+)	94294	94885
<i>pyrA</i>	Carbamilo fosfato sintetasa	(-)	1707702	1708884	<i>ureG</i>	Proteina accesoria de ureasa	(+)	94902	95529
<i>qcrA</i>	Proteina rieske (operon QcrCAB)	(-)	2321891	2323117	<i>xylB</i>	Xilulokinasa	(+)	126190	126353
<i>qcrB</i>	Citocromo del complejo bc1	(-)	2320269	2321888	<i>ytqA</i>	Desthiobiotin sintasa	(+)	2771692	2772367
<i>qcrC</i>	Citocromo c1	(-)	2323120	2323971		Regulador de Respuesta	(+)	928116	928815
<i>recA</i>	recA	(-)	2063985	2065116		Sensor de la kinasa	(+)	928883	930251
<i>recF</i>	ATPasa de reparación en recombinación	(+)	3585	4769					
<i>rel</i>	GTP pirofosfokinasa	(-)	1752604	1754887					

3.5 Análisis de la disposición cromosómica de los genes *gnt* en *C. glutamicum*

Los trabajos previos realizados sobre el metabolismo del ácido glucónico en *C. glutamicum* indicaban que los genes implicados, a diferencia de otros microorganismos tales como *E. coli* o *Bacillus subtilis*, no forman un operón. En el presente trabajo se han localizado dentro del genoma de este microorganismo ambos genes y se observa una distancia entre ellos de aproximadamente 500 Kb. Para establecer si este patrón se repite en otras bacterias se ha realizado la siguiente comparación.

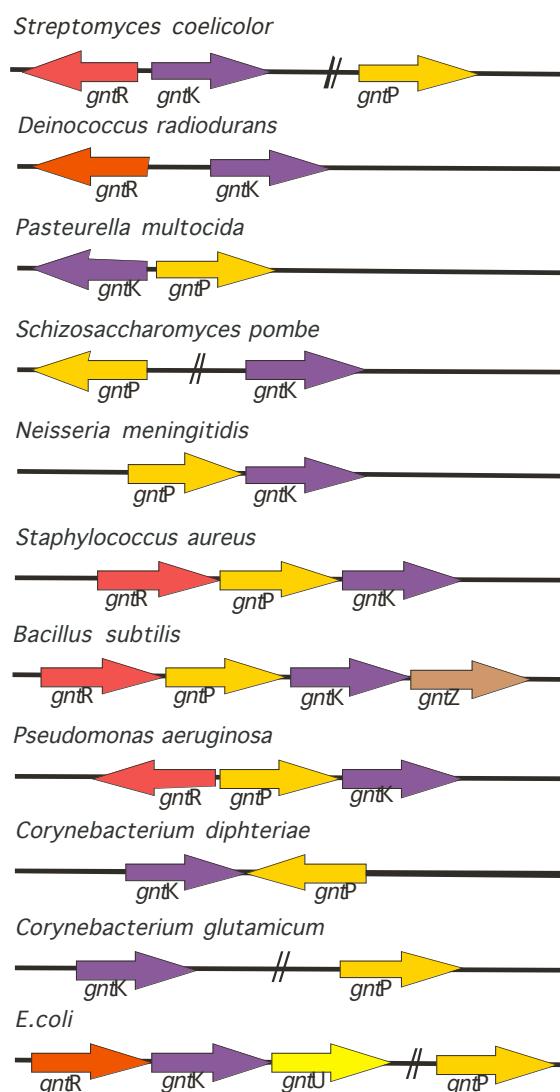


Figura 3.13.- Comparativa de la disposición cromosómica de genes implicados en el metabolismo del glucónico. Genes: *gntK*, gluconato kinasa; *gntP*, gluconato permeasa; *gntR*, regulador del operón *gnt*; *gntU*, permeasa de glucónico de baja afinidad; *gntZ*, glucosa-6-P deshidrogenasa.

Los datos reflejan que la disposición de los genes *gnt* en los distintos microorganismos analizados es dispar, no hay un patrón que se repita. Se puede deducir que la necesidad de una forma de regulación finamente establecida solo es necesaria en aquellas bacterias que utilicen ácido glucónico como una fuente de energía y carbono constante, como es el caso de *E. coli* y algunos patógenos. El hábitat natural de las corinebacterias no patógenas es el suelo, donde este compuesto tiene menor importancia, aunque puedan tener contacto con él pues son microorganismos saprofitos y durante el proceso de descomposición orgánica se generan este tipo de compuestos. En cambio, en el caso de corinebacterias patógenas, al poder crecer en un medio interno rico en nutrientes, tienen un contacto mayor con todo tipo de derivados orgánicos y por ello la coordinación en la expresión de estos genes puede tener mayor relevancia, por ello se da una disposición adyacente de los genes *gnt* dentro del cromosoma bacteriano de *C. diphtheriae*. Si las actividades enzimáticas no son esenciales para la célula, no están sometidas a una presión selectiva tal que impida la ruptura de la disposición en operones por movimientos de estos genes, de forma que pueden haberse originado pérdidas y adquisiciones de los mismos a lo largo de la historia evolutiva de *C. glutamicum*. Esto en principio es lo que refleja un análisis filogenético de las secuencias proteicas de las enzimas gluconato kinasa y permeasa donde se observa que tienen relaciones filogenéticas distintas (Fig. 3.14 y 3.15).

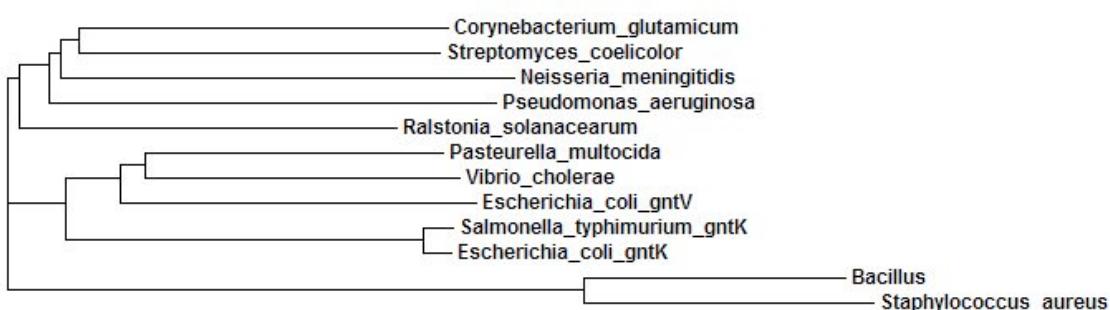


Figura 3.14.- Filograma de distintas enzimas gluconato kinasas.

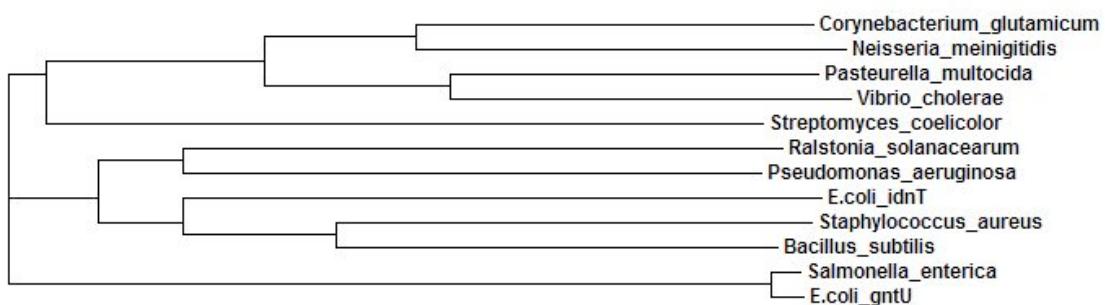


Figura 3.15.- Filograma de distintas enzimas gluconato permeasas.

Otro dato adicional es el obtenido mediante una búsqueda en el cromosoma de *C. glutamicum* de los genes *edd* y *eda*, implicados en la ruta de Entner-Doudoroff, encontrándose solo al primero de estos genes. Esto puede indicar que de forma ancestral *C. glutamicum* pudo tener esta vía activa, que es un destino catabólico del ácido glucónico introducido en la célula gracias a los productos de la expresión de los genes *gnt*, pero la falta de una ventaja evolutiva clara de dicha ruta en el ambiente de estos microorganismos hizo que se perdiese el gen *eda*. Por ello se piensa que el único destino final en *C. glutamicum* para el glucónico introducido debe ser la ruta de las pentosas fosfato.

3.6 Aplicaciones prácticas del presente trabajo

La caracterización de las rutas biosintéticas de aminoácidos en corinebacterias ha sido objetivo fundamental en la investigación centrada en estos microorganismos, dejando de lado aspectos metabólicos de los mismos. Por otro lado, el estudio de la vía de catabolismo del ácido glucónico en corinebacterias ha cobrado especial relevancia gracias a la caracterización de la enzima 2,5-diketo-D-gluconato reductasa. Se ha descubierto que dicha enzima puede participar en una nueva forma de producción de vitamina C alternativa a la síntesis orgánica de Reichstein y Grussner, procedimiento actualmente empleado en su producción industrial y que tiene cierta problemática debido a lo complejo del proceso. Mediante el uso de bacterias capaces de oxidar parcialmente glucosa por fermentación, se obtiene 2,5-diketo-D-gluconato (25DKG) el cual es reducido por esta reductasa de corinebacterias produciéndose 2-keto-L-gulonato (2KLG), intermediario directo del ácido L-ascórbico (vitamina C) (Khurana y col., 2000). Se desconocían las características de los genes capaces de permitir un crecimiento de corinebacterias con glucónico como única fuente de carbono debido a la falta de información sobre las rutas metabólicas en estos microorganismos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo han confirmado la existencia de esta ruta catabólica, lo cual permite comprender mejor el comportamiento de estas bacterias en los medios de cultivo utilizados para la producción industrial de la vitamina y da pie a posibles alteraciones de los genes *gnt* para una posible mejora de las cepas utilizadas.

4

Conclusiones

4. Conclusiones

1.- Se ha identificado el gen *gntK* en *Corynebacterium glutamicum* que codifica para una actividad enzimática gluconato kinasa que, junto con la actividad gluconato permeasa, establece la existencia de una ruta catabólica del ácido glucónico en este microorganismo.

2.-La interrupción del gen *gntK* conduce a la incapacidad de crecer en medio mínimo con ácido glucónico como única fuente de carbono. La interrupción del gen *gntP* en el extremo carboxilo conduce igualmente a la obtención de mutantes incapaces de crecer en medio mínimo con ácido glucónico.

3.-Los análisis realizados sobre la disposición cromosómica de los genes *gntK* y *gntP* en *C. glutamicum*, una corinebacteria no patógena, ponen de manifiesto que no se encuentran agrupados como ocurre en la mayoría de las bacterias patógenas analizadas.

5

Bibliografía

5. Bibliografía

- Abe, L., Takayama, K. and Kinoshita, S.** 1967. Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**, 279-301.
- Aida, K., Chibata, K., Nakayama, K., Takinami, K. and Yamada, H.** (Eds). 1986. Biotechnology of amino acid production. *Progress in Industrial Microbiology*. **24**. Elsevier, Amsterdam.
- Altenbuchner, J. and Cullum, J.** 1984. DNA amplification and an unstable arginine gene in *Streptomyces lividans* 66. *Mol. Gen. Genet.* **195**, 134-138.
- Altschul, S.F. et al.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–402.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J.** 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* **10**, 215-403.
- Anderson, S., Marks, C.B., Lazarus, R., Miller, J., Stafford, K., Seymour, S., Light, D., Rastetter, W. and Estell, D.** 1985. Production of 2-keto-L-gluconate, an intermediate in L-ascorbate synthesis, by a genetically modified *Erwinia herbicola*. *Science* **230**, 144-149.
- Archer, J.A.C., Folletie, M.T. and Sinskey, A.J.** 1989. Biology of *Corynebacterium glutamicum*: a molecular approach. Genetics and molecular biology of industrial microorganisms. Hershberger, C.L., Quener, S.W. and Henegan, G. eds. American Society for Microbiology. Washington, pp 27-33.
- Bächi, B. and Kornberg, H.L.** 1975. Genes involved in the uptake and catabolism of gluconate by *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **90**, 321-325.
- Bairoch, A. and Boeckmann, B.** 1992. The SWISS-PROT Protein Sequence Data Bank. *Nucleic Acids Research*, vol. **20**, pp. 2,019-2,022.
- Bairoch, A., Bucher, P., Hofmann, K.** 1997. The PROSITE database its status in 1997. *Nucleic Acids Res.* **25**, 217-221.
- Bairoch, A., Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Lachaize, C., Mostaguir, K., Ivan Ivanyi, I. and Appel, R.D.** 2002. The ExPASy proteome WWW server in 2002. Swiss Institute of Bioinformatics; 1, Rue Michel Servet, 1211 Geneva 4; Switzerland.
- Bak, A.L., Christiansen, C. and Stenderup, A.** 1970. Bacterial genome sizes determined by DNA renaturation studies. *J. Gen. Microbiol.* **64**, 377-380.
- Barák, I., Koptides, M., Jucovic, M., Sisova, M. and Timko, J.** 1990. Construction of a promoter-probe shuttle vector for *Escherichia coli* and brevibacteria. *Gene* **95**, 133-135
- Barksdale, L.** 1970. *Corynebacterium diphtheriae* and its relatives. *Bacteriol. Rev.* **36**, 407-477.
- Bathe, B., Kalinowski, J. and Pühler, A.** 1996. A physical and genetic map of the *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 chromosome. *Mol. Gen. Genet.* **252**, 255-265.
- Bausch, C., Peekhaus, N., Utz, C., Blais, T., Murray, E., Lowary, T. and Conway, T.** 1998. Sequence analysis of the GntII (subsidiary) system for gluconate metabolism reveals a novel pathway for L-idonic acid catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 3704-3710.

- Benson, D., Lipman, D.J., and Ostell, J.** 1993. GenBank, Nucleic Acids Research, **21**, 2963-2965.
- Bernstein, F.C., Koetzle, T.F., Williams, G.J.B., Meyer Jr., E.F., Brice, M.D., Rodgers, J.R., Kennard, O., Shimanouchi, T. and Tasumi, M.** 1977. The Protein Data Bank: A Computer-based Archival File for Macromolecular Structures. J. Molecular Biology, **112**, 535-542.
- Birboim, H.C. and Doly, J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. **7**, 1513-1523.
- Boc, S.F. and Martone, J.D.** 1995. Osteomyelitis caused by *Corynebacterium jeikeium*. J Am Podiatr Med Assoc. **85**, 338-9.
- Bonamy C., Labarre J., Reyes O. and Leblon G.** 1994. Identification of IS1206, a *Corynebacterium glutamicum* IS3-related insertion sequence and phylogenetic analysis. Mol. Microbiol. **14**, 571-581.
- Bonamy, C., Guyonvarch, A., Reyes, O., David, F. and Lebion, G.** 1990. Interspecies electro-transformation in corynebacteria. FEMS Microbiol. Lett. **66**, 263-270.
- Bonnassie, S., Burini, J.F., Oreglia, J., Trautwetter, A., Patte, J.C. and Sicard, A.M.** 1990. Transfer of plasmid DNA to *Brevibacterium lactofermentum* by electrotransformation. J. Gen. Microbiol. **136**, 2107-2112.
- Brown, S.E., Knudson, D.L., Ishimaru, C.A.** 2002. Linear plasmid in the genome of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. J Bacterial. **184**, 2841-4.
- Cadenas, R.F., Fernández-González, C., Martín, J.F. and Gil, J.A.** 1996. Construction of new cloning vectors for *Brevibacterium lactofermentum*. FEMS Microbiol. Lett. **137**, 63-68.
- Cadenas R.F., Gil J.A. and Martín J.F.** 1992. Expression of *Streptomyces* genes encoding extracellular enzymes in *Brevibacterium lactofermentum*: secretion proceeds by removal of the same leader peptide as in *Streptomyces lividans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **38**, 362-369.
- Cadenas, R.F., Martín, J.F. and Gil, J.A.** 1991. Construction and characterization of promoter-probe vectors for corynebacteria using the kanamycin-resistance reporter gene. Gene **98**, 117-121.
- Carlson, R.R. and Vidaver A.K.** 1982. Taxonomy of *Corynebacterium* plant pathogens, including a new pathogen of wheat, based on polyacrilamide gel electrophoresis of cellular proteins. Int. J. Syst. Bacteriol. **32**, 315-326.
- Collins M.D. and Cummins, C.S.** 1986. Genus *Corynebacterium* Lehmann and Neumann 1896, 359AL, 2. p1266-1276. En:P.H.A. Sneath (ed.) Bergey's manual of systematic bacteriology. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Collins, M.D., Jones, D. and Kroppenstedt, R.M.** 1982. In validation of the publication of new names and combinations previously effectively published outside the IJSB. List No 9. Int. Syst. Bacteriol. **32**, 384-385.
- Constantinides, A.** 1980. Steroid transformation at high substrate concentrations using immobilized *Corynebacterium simplex* cells. Biotechnol. Bioeng. **22**, 119-136.
- Cooper, D.G., Zajic, J.E. and Gracey, D.E.F.** 1979. Analysis of corynemycolic acids and other fatty acids produced by *Corynebacterium lepus* grown on kerosene. J. Bacteriol. **137**, 795-801.

- Cordes, C., Mockel, B., Eggeling, L. and Sahm, H. 1992.** Cloning, organization and functional analysis of *ilvA*, *ilvB* and *ilvC* genes from *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*. **112**, 113-116.
- Cornelis, K., Maes, T., Jaziri, M., Holsters, M., Goethals, K. 2002.** Virulence genes of the phytopathogen *Rhodococcus fascians* show specific spatial and temporal expression patterns during plant infection. *Mol Plant Microbe Interact*. **15**, 398-403.
- Correia, A., Pisabarro, A., Martín, J.F. and Castro, J.M. 1996.** Cloning and characterization of an IS-like element present in the genome of *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869. *Gene*. **170**, 91-94.
- Costa, J.J., Michel, J.L., Rappuoli, R. and Murphy, J.R. 1981.** Restriction map of corynebacteriophages β_c and β_{vir} and physical localization of the diphtheria *tox* operon. *J. Bacteriol.* **148**, 124-130.
- Cremer, J., Eggeling, L. and Sahm, H. 1991.** Control of the lysine biosynthesis sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1746-1752.
- Cremer, J., Eggeling, L. and Sahm, H. 1990.** Cloning the *dapA dapB* cluster of the lysine-secreting bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.* **220**, 478-480.
- Crombach, W.H.J. 1978.** DNA base ratios and DNA hybridation studies of coryneform bacteria, mycobacteria and nocardiae. In: *Coryneform Bacteria*. Bousfield, I.J. and Callely, A.G. (eds). pp. 161-179. London, Academic Press.
- Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G. and Elofsson, A. 1997.** Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method. *Prot. Eng.* **10**, 673-676.
- Cure, G.L. and Keddie, R.M. 1973.** Methods for morphological examination of aerobic coryneform bacteria. Sampling Microbiological Monitoring of Environments. Board, R.G. and Lovelock, D.M., eds. Society for Applied Bacteriology Technical Series 7. Academic Press. New York. pp. 123-135.
- Davis, M.J., Gillaspie, Fr. A.G., Vidaver, A.K. and Harris, R.W. 1984.** *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov., and *Clavibacter xyli* subsp. *cyanodotis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**, 107-117.
- Dayhoff, M. O., Schwartz, R. M. and Orcutt, B. C. 1978.** A model of evolutionary change in proteins. *Atlas of Protein Sequence and Structure*. **5**, Suppl. 3, 345-352.
- De Crombrugghe, B., Busby, S. and Buc, H. 1984.** Cyclic AMP receptor protein: role in transcription activation. *Science*. **224**, 831-838.
- Deb, J.K. and Nathe, N. 1999.** Plasmids of corynebacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **175**, 11-20.
- DNA Data Bank of Japan Nat'l Inst. of Genetics**, Yata, Mishima, 411, Japan, ftp address: ddbj@ddbj.nig.ac.jp.
- Duncan, L.K. and Shivnan, E. 1989.** High frequency transformation of whole cells of amino acid producing coryneform bacteria using high voltage electroporation. *Biotechnology*. **7**, 1067-1070.

- Egan, S., Fliege, R., Tong, S., Shibata, A., Wolf, Jr, R.E. and Conway, T. 1992.** Molecular characterization of the Entner-Doudoroff pathway in *Escherichia coli*: sequence analysis and localization of promoters for the *edd-edd* operon. *J. Bacteriol.* **174**, 4638-4646.
- Eikmanns, B.J. 1992.** Identification, sequence analysis, and expression of a *Corynebacterium glutamicum* cluster gene encoding the three glucoytic enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 3-phosphoglycerate kinase, and triosephosphate isomerase. *J. Bacteriol.* **174**, 6076-6086.
- Eisenberg, R.C. and Dobrogosz, W.J. 1967.** Gluconate metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **93**, 941-949.
- European Molecular Biology Laboratory**, Postfach 10.2209, D-6900 Heidelberg, Federal Republic of Germany.
- Farber, J.M. and Idziak, E.S. 1982.** Detection of glucose oxidation products in chilled fresh beef undergoing spoilage. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 521-524.
- Fernandez, E.P., Vela, A.I., Las Heras, A., Domínguez, L., Fernandez-Garayzabal, J.F., Moreno, M.A. 2001.** Antimicrobial susceptibility of corynebacteria isolated from ewe's mastitis. *Int J Antimicrob Agents*. **18**, 571-4.
- Fernández, M.R. 1991.** Estudio del plásmido de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 21798 y construcción de nuevos vectores de clonación para corinebacterias. Tesis Doctoral, Universidad de León. León.
- Fernández-González, C., Cadenas, R.F., Noirot-Gros, M.F., Martín, J.F. and Gil, J.A. 1994.** Characterization of a region of plasmid pBL1 of *Brevibacterium lactofermentum* involved in replication via the rolling circle model. *J. Bacteriol.* **176**, 3154-3161.
- Folletie M.T., Shin H.K. and Sinskey A.J. 1988.** Organization and regulation of the *Corynebacterium glutamicum hom-thrB* and *thrC* loci. *Mol. Microbiol.* **2**, 53-62.
- Fujita, Y. and Fujita, T. 1989.** Effect of mutations causing gluconate kinase or gluconate permease deficiency on expression of the *Bacillus subtilis gnt* operon. *J. Biol. Chem.* **171**, 1751-1754.
- Fujita, Y. and Fujita, T. 1987.** The gluconate operon *gnt* of *Bacillus subtilis* encodes its own transcriptional negative regulator. *Genetics*. **84**, 4524-4528.
- Fujita, Y., Fujita, T., Miwa, Y., Nihashi, J. and Aratani, Y. 1986.** Organization and transcription of the gluconate operon, *gnt*, of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **261**, 13744-13753.
- Garrity M.G., Winters M., Kuo A.W. and Searles D.B. 2002.** Taxonomic Outline of the Prokaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition.
- George, D.G., Barker, W.C. and L.T. Hunt, 1986.** The Protein Identification Resource (PIR), Nucleic Acids Research., vol. **14**, pp. 11-15,1986.
- Goodfellow, M. 1989.** Suprageneric classification of actinomycetes Vol 4. pp 2333-2339. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriol. Williams ST, Sharpe ME, Holt JG (eds). The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Goodfellow, M. 1984.** Reclssification of *Corynebacterium fascians* (Tilford) Dowson in the genus *Rhodococcus*, as *Rhodococcus fascians* cinv. nov. *System. Appl. Microbiol.* **5**, 225-229
- Guerrero, C., Mateos, L.M., Malumbres, M. and Martín, J.F. 1994** Directed mutagenesis of a regulatory palindromic sequence upstream from the *Brevibacterium lactofermentum* tryptophan operon. *Gene*. **138**, 35-41

- Guerrero, M.C., Mateos, L.M. and Martín, J.F. 1988.** Cloning and expression of the complete tryptophan operon of *Brevibacterium lactofermentum*. Abstracts of the 8th International Biotechnology Symposium, pp. 305. París.
- Hanahan, D. 1985.** Techniques for transformation of *Escherichia coli*. En : DNA cloning. A practical approach. Glover, D.M., ed. Irl. Press oxford. pp. 109-135.
- Hanahan, D. 1983.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166**, 557-580.
- Hawley, D.K. and McClure, W.R. 1983.** Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter sequences. Nucleic Acids Res. **11**, 2237-3355.
- Haynes, J.A. and Britz, M.L. 1990.** The effect of growth conditions of *Corynebacterium glutamicum* on the transformation frequency obtained by electroporation. J. Gen. Microbiol. **136**, 255-263.
- Heijne, G. 1992.** Membrane Protein Structure Prediction, Hydrophobicity Analysis and the Positive-inside Rule. J. Mol. Biol. **225**, 487-494.
- Henikoff, S. and Henikoff, J. G. 1992.** Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **89**, 10915-10919.
- Higgins, D.G., Sharp, P.M. 1988.** CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. Gene. **73**, 237-244.
- Hirsbrunner, G., Lang, J., Nicolet, J., Steiner, A. 1996.** Nephrectomy for chronic, unilateral suppurative pyleonephritis in cattle. Tierarztl Prax. **24**, 17-21.
- Holmes, D.S. and Quigley, M. 1981.** A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. **114**, 193-197.
- Huber, S.M., Gamper, N., Lang, F. 2001.** Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts. Pflugers Arch. **441**, 551-8.
- Ishino, S., Mizukami, T., Yamaguchi, K., Katsumata, R. and Araki, K. 1987.** Nucleotide sequence of the *meso*-diaminopimelate *D*-dehydrogenase gene from *Corynebacterium glutamicum*. Nucleic Acids Res. **15**, 3917.
- Istúriz, T., Palmero, E. and Vitelli-Flores, J. 1986.** Mutations affecting gluconate catabolism in *Escherichia coli*. Genetic mapping of the locus for the thermosensitive glucokinase. J. Gen. Microbiol. **132**, 3209-3212.
- Izu, H., Kawai, T., Yamada, Y., Aoshima, H., Adachi, O. and Yamada, M. 1997.** Characterization of the *gntT* gene encoding a high-affinity gluconate permease in *Escherichia coli*. Gene. **199**, 203-210.
- Jones, D. and Collins, M.D. 1986.** Irregular nonsporing Gram-positive rods. Vol. 2. pp. 1261-1434. En: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G., (eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Kalinowski, J., Bachmann, B., Thierbach, G. and Pühler, A. 1990.** Aspartatokinase genes *lysC α* and *lysC β* overlap and are adjacent to the aspartate β -semialdehyde dehydrogenase gene *asd* in *Corynebacterium glutamicum*. Mol. Gen. Genet. **224**, 317-324.
- Kaneko, H. and Sakaguchi, K. 1979.** Fusion of protoplasts and genetic recombination of *Brevibacterium flavum*. Agric. Biol. Chem. **43**, 1007-1013.
- Katsumata, R., Ozaki, A., Oka, T. and Furuya, A. 1984.** Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid DNA. J. Bacteriol. **159**, 306-311.

- Katsumata R., Ozaki A., Oka T. and Furuya A.** 1982. European Patent Application. **82**, 485.
- Karp, P.D., Riley, M., Saier, M., Paulsen, I.T., Paley, S. and Pellegrini-Toole, A.** 2002. [The Ecocyc Database](#). Nucleic Acids Research. **30**, 56.
- Kerry-Williams, S.M. and Noble, W.C.** 1984. Plasmid-associated bacteriocin production in a JK-type coryneform bacterium. FEMS Microbiol. Lett. **25**, 179-182.
- Khurana, S., Sanli, G., Powers, D.B., Anderson, S., Blaber, M.** 2000. Molecular modeling of substrate binding in wild-type and mutant Corynebacteria 2,5-diketo-D-gluconate reductases. Proteins. **39**, 68-75.
- Klemm, P., Tong, S., Nielsen, H. and Conway, T.** 1996. The *gntP* gene of *Escherichia coli* involved in gluconate uptake. J. Bacteriol. **178**, 61-67.
- Kono, M. Sasatsu, M. and Aoki, T.** 1983. R plasmids in *Corynebacterium xerosis* strains. Antimicrob. Agents Chem. **23**, 506-508.
- Koptides, M., Barak, I., Sisova, M., Baloghova, E., Ugorcakova, J. and Timko, J.** 1992. Characterization of bacteriophage BFK20 from *Brevibacterium flavum*. J. Gen. Microbiol. **138**, 1387-1391.
- Kurusu, Y., Kainuma, M., Inui, M., Satoh, Y. and Yukawa, H.** 1990. Electroporation-transformation system for coryneform bacteria by auxotrophic complementation. Agric. Biol. Chem. **54**, 443-447.
- Laemli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. **227**, 145-151
- Lee, C.W., Lucas, S. and Desmazeaud, M.J.** 1985. Phenylalanine and tyrosine catabolism in some cheese coryneform bacteria. FEMS Microbiol. Lett. **26**, 201-205.
- Lehmann, K.B. and Neumann, R.** 1896. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speciellen Bakteriologischen Diagnostik. 1st. ed. JF Lehmann, München. pp. 1-448
- Lessie, T.G. and Phibbs, P.V.Jr.** 1984. Alternative pathways of carbohydrate utilization in Pseudomonads. Annu. Rev. Microbiol. **38**, 359-387.
- Lipman, D. and Pearson, W.** 1985. Rapid and sensitive protein similarity searches. Science. **22**, 1435-1441.
- Lipman, D. and Pearson, W.** 1988. Improved tools for biological sequence comparison. Proceedings of the National Academy of Science USA. **85**, 2444-2448.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J.** 1997. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall, INC.
- Magasanik, B.** 1970. Glucose effects: Inducer exclusion and repression. En The Lactose Operon. Beckwith, J.R., and Zipser, D. (eds) Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 189-220.
- Mak, I.T., Komarov, A.M., Kramer, J.H., Weglicki, W.B., 2000.** Protective mechanisms of Mg-gluconate against oxidative endothelial cytotoxicity. Cell Mol Biol. **46**, 1337-44.
- Martín, J.F.** 1989. Molecular genetics of amino acid-producing corynebacteria. En: Microbial products: New approaches. pp. 25-59. Baumberg, S., Hunter, I., Rhodes, M., (eds.). Society for General Microbiology Symposium, **44**. Cambridge University Press, Cambridge.

- Mateos, L.M., Schäfer, A., Kalinowski, J., Martin, J.F. and Pühler, A. 1996.** Integration of narrow-host-range vectors from *Escherichia coli* into the genomes of aminoacid-producing corynebacteria after intergeneric conjugation. *J. Bacteriol.* **178**, 5768-5775.
- Mateos L.M. 1990.** Clonación, caracterización y expresión del “cluster” *hom-thrB* de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869. Tesis Doctoral, Universidad de León, León.
- Mateos, L.M., del Real, G., Aguilar, A. and Martín, J.F. 1987a.** Cloning and expression in *Escherichia coli* of the homoserine kinase (*thrB*) gene from *Brevibacterium lactofermentum*. *Mol. Gen. Genet.* **206**, 361-367.
- Mateos, L.M., del Real, G., Aguilar, A. and Martín, J.F. 1987b.** Nucleotide sequence of the homoserine kinase (*thrB*) gene of *Brevibacterium lactofermentum*. *Nucl. Acids Res.* **15**, 3922.
- Meynadier, J. 2000.** Efficacy and safety study of two zinc gluconate regimens in the treatment of inflammatory acne. *Eur J Dermatol.* **10**, 269-73.
- Milas, L. and Scott, M.T. 1978.** Antitumor activity of *Corynebacterium parvum*. *Adv. Cancer Res.* **26**, 257-306.
- Miller, J.H. 1972.** En: *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Miwa, K., Matsui, H., Terabe, M., Ito, K., Ishida, M., Takagi, H., Nakamori, S. and Sano, K. 1985.** Construction of novel shuttle vectors and a cosmid vector for the glutamic acid-producing bacteria *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **39**, 281-286.
- Moreau, S., Blanco, C., Trautwetter, A. 1999.** Site-specific integration of corynephage phi16: construction of an integration vector. *Microbiology* **145**, 539-48.
- Morinaga, Y., Tsuchiya, M., Miwa, K. and Sano, K. 1987a.** Expression of *Escherichia coli* promoters in *Brevibacterium lactofermentum* using the shuttle vector pEB003. *J. Biotechnol.* **5**, 305-312.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. 1987.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
- Nakagawa, S., Mizoguchi, H., Ando, S., Hayashi, M., Hattori, M., Shiba, T., Sakaki, Y., Yokoi, H. and Ozaki, A. 2000.** Genome sequencing of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. Genomes 2000: International Conference on Microbial and Model Genomes, Paris, 11-15 April 2000, p 36.
- Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. 1970.** A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* **48**, 443-453.
- Oteo, J., Aracil, B., Ignacio Alos, J. and Luis Gomez-Garces, J. 2001.** Significant bacteremias by *Corynebacterium amycolatum*: an emergentpathogen. *Enferm Infect Microbiol Clin.* **19**, 103-6.
- Ozaki, A., Katsumata, R., Oka, T. and Furuya, A. 1984.** Functional expression of the genes of *Escherichia coli* in gram-positive *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.* **196**, 175-178.
- Paradis F.W., Warren R.A.J., Kilburn D.G. and Miller R.C.Jr. 1987.** The expression of *Cellulomonas fimi* cellulase genes in *Brevibacterium lactofermentum*. *Gene* **61**, 199-206.

- Pátek, M., Eikmanns, B.J., Pátek, J and Sahm, H. 1996.** Promoters from *Corynebacterium glutamicum*: cloning, molecular analysis and search for a consensus motif. *Microbiology*. **142**, 1297-1309.
- Pérez-Martín J., Rojo F. and Lorenzo V. 1994.** Promoters responsive to DNA bending: a common theme in prokaryotic gene expression. *Microbiol. Rev.* **58**, 268-290.
- Pitcher, D., Soto, A., Soriano, F. and Valero-Guillen, P. 1992.** Classification of coryneform bacteria associated with human urinary tract infection (group D2) as *Corynebacterium urealyticum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 178-181.
- Porco, A., Alonso, G. and Isturiz, T. 1998.** The gluconate high affinity transport of GntI in *Escherichia coli* involves a multicomponent complex system. *J. Basic Microbiol.* **38**, 395-404.
- Porco, A., Peekhaus, N., Bausch, C., Tong, S., Isturiz, T. and Conway, T. 1997** Molecular genetic characterization of the *Escherichia coli gntT* gene of GntI, the main system for gluconate metabolism. *J. Bacteriol.* **179**, 1584-1590.
- Pribnow D. 1975.** Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**, 784-789.
- Puech V, Chami M, Lemassu A, Laneelle MA, Schiffler B, Gounon P, Bayan N, Benz R, Daffe M. 2001.** Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology* 2001 May; **147** (Pt 5):1365-82.
- Rabus, R., Jack, D.L., Kelly, D.J. and Saier, M.H. Jr. 1999.** TRAP transporters: an ancient family of extracytoplasmic solute-receptor-dependent secondary active transporters. *Microbiology*. **145**, 3431-3445.
- Reese, M.G. and Eeckman, F.H. 1995.** Novel Neural Network Algorithms for Improved Eukaryotic Promoter Site Recognition. Accepted talk for The seventh international Genome sequencing and analysis conference, Hyatt Regency, Hilton Head Island.
- Reizer, A., Deutscher, M.H.Je. and Reizer, J. 1991.** Analysis of the gluconate (*gnt*) operon of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **5**, 1081-1089.
- Rosenberg, M. and Court, D. 1979.** Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Ann. Rev. Genet.* **13**, 319-353.
- Sambrook, J., Fritsch, E.H. and Maniatis, T. 1989.** Molecular Cloning. A Laboratory Manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. USA.* **74**, 5463-5467.
- Sano K. and Matsui K. 1987.** Structure and function of the *trp* operon control regions of *Brevibacterium lactofermentum*. *Gene*. **53**, 191-200.
- Santamaría R., Martín J.F. and Gil J.A. 1987.** Identification of a promoter sequence in the plasmid pUL340 of *Brevibacterium lactofermentum* and construction of new cloning vectors for corynebacteria containing two selectable markers. *Gene* **56**, 199-208.
- Santamaría, R., Gil, J.A. and Martín, J.F. 1985.** High-frequency transformation of *Brevibacterium lactofermentum* protoplasts by plasmid DNA. *J. Bacteriol.* **162**, 463-467.

- Santamaría, R., Gil, J.A., Mesas, J.M. and Martín, J.F.** 1984. Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum*. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 2237-2246.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. and Pühler, A.** 1994 Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**, 69-73.
- Schäfer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A.H. and Pühler, A.** 1990. High frequency conjugal plasmid transfer from Gram-negative *Escherichia coli* to various Gram-positive coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* **172**, 1663-1666.
- Schleissner, C., Reglero, A. and Luengo, J.M.** 1997. Catabolism of D-glucose by *Pseudomonas putida* U occurs via extracellular transformation into D-gluconic acid and induction of a specific gluconate transport system. *Microbiology*. **143**, 1595-1603.
- Shortle, D., Haber, J.E., and Botstein, D.** 1980. Lethal disruption of the yeast actin by integrative DNA transformation. *Science* **217**, 371-373.
- Smith M.D., Flickinger J.L., Lineberger D.W. and Schmidt B.** 1986. Protoplast transformation in coryneform bacteria and introduction of an α -amilase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* into *Brevibacterium lactofermentum* *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 634-639.
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S. and Sharpe, M.E., eds.** 1986. Vol 2. En:Bergey's manual of systematic bacteriology. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Southern, E.** 1985. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Suzuki, T., Honda, H. and Katsumata, R.** 1972. Production of antibacterial compounds analogous to chloramphenicol by n-paraffin-grown bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **36**, 2223-2228.
- Tegli, S., Sereni, A., Surico, G.** 2002. PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. *Lett Appl Microbiol.* **35**, 331-7
- Thierbach, G., Schwarzer, A. and Pühler, A.** 1988. Transformation of spheroplasts and protoplasts of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 356-362.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J.** 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- Tieng, K., Frieder, O. and Martino, R.L.** 1996. Parallel Computation in Biomedicine: Genetic and Protein Sequence Analysis. Handbook of Parallel and Distributing Computing, A.Y. Zomaya, ed., pp. 1,071-1,096. McGraw-Hill.
- Trautwetter, A. and Blanco, C.** 1988. Isolation and preliminary characterization of twenty bacteriophages infecting either *Brevibacterium* or *Arthrobacter* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1466-1471.
- Tsuchiya M. and Morinaga Y.** 1988. Genetic control systems of *Escherichia coli* can confer inducible expressions of cloned genes in coryneform bacteria. *Biotechnology*. **6**, 428-430.

- Tong, S., Porco, A., Isturiz, T. and Conway, T. 1996.** Cloning and molecular characterization of the *Escherichia coli* *gntR*, *gntK* and *gntU* genes of GntI, the main system for gluconate metabolism. *J. Bacteriol.* **178**, 3260-3269.
- Van de Rest, M.E., Lange, C. and Molenaar, D. 1999.** A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 541-545.
- Valbuena, N., 1999.** Caracterizacion del gen *gntP* en *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. Tesina, Universidad de León, León.
- Vasicova, P., Patek, M., Nesvera, J., Sahm, H. and Eikmanns, B.J. 1999.** Analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *dapA* promoter. *J. Bacteriol.* **181**, 6188-6191.
- Vengust, M., Staempfli, H., Prescott, JF. 2002.** *Rhodococcus equi* pleuropneumonia in an adult horse. *Can Vet J.* **43**, 706-8.
- Vertés, A.A., Inui, M., Kobayashi, M., Kurusu, Y. and Yukawa, H. 1994.** Isolation and characterization of IS31831, a transposable element from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **11**, 738-746.
- Vidaver, A.K. 1982.** The plant pathogenic corynebacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **36**, 495-517.
- Vieira, J. and Messing, J. 1982.** The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene.* **19**, 259-268.
- Wallace, D.C. and Morowitz, H.J. 1973.** Genome size and evolution chromosome (Berlin). Springer-Verlag. **40**, 121-126.
- Watts JL, Lowery DE, Teel JF, Ditto C, Horng JS, Rossbach S. 2001.** Phylogenetic studies on *Corynebacterium bovis* isolated from bovine mammary glands. *J Dairy Sci.* **84**, 2419-23.
- Witteveen, C.F.B., van de Vordervoort, P., Swart, K. and Visser, J. 1990.** Glucose oxidase overproducing and negative mutants of *Aspergillus nidulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 683-686.
- Woese, C.R. 1987.** Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271.
- Yamada, K., Kinoshita, S., Tsunoda, T. and Aida, K. Eds. 1972.** En: The Microbial Production of Amino Acids. Kodansha Ltd, Tokyo.
- Yeh, P., Sicard, A.M. and Sinskey, A.J. 1988a.** General organization of the genes specifically involved in the diaminopimelate-lysine biosynthetic pathway of *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.* **212**, 105-111.
- Yeh P., Sicard A.M. and Sinskey A.J. 1988b.** Nucleotide sequence of the *lysA* gene of *Corynebacterium glutamicum* and possible mechanisms for modulation of its expression. *Mol. Gen. Genet.* **212**, 112-119.
- Yoshihama, M., Higashiro, K., Rao, E.A., Akedo, M., Shanabruach, W.G., Follettie, M.T., Walker, G.C. and Sinskey, A.J. 1985.** Cloning vector system for *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **162**, 591-597.