



# INTERRUPCIÓN DE GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DEL ÁCIDO GLUCÓNICO EN *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

Letek M., Valbuena N., Mateos L.M., Ramos A., Gil J.A.

Área de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de León.

## Introducción

*Corynebacterium glutamicum* es un microorganismo Gram-positivo, saprófito perteneciente al grupo de las corinebacterias que tradicionalmente ha sido utilizado para la producción de aminoácidos y nucleótidos; este microorganismo presenta la capacidad de metabolizar ácido glucónico como única fuente de energía. La caracterización de los genes implicados en el metabolismo de glucónico en *C. glutamicum* fue iniciada por Mateos y col. (1996). Para ello se utilizaron vectores movilizables suicidas que permiten, bajo determinadas circunstancias su integración en el genoma bacteriano provocando interrupciones génicas. Uno de los mutantes aislados fue incapaz de crecer en un medio mínimo con ácido glucónico como única fuente de carbono (clon TRA-8). El plásmido integrado en TRA-8 fue rescatado del cromosoma y su posterior secuenciación determinó que la integración afectaba al gen *gntP* (gluconato permeasa; Valbuena, 1999). Los genes implicados en el catabolismo del ácido glucónico en la mayor parte de las bacterias analizadas conforman el operón *gntRKP* (Regulador-Kinasa-Permeasa de glucónico) en el cromosoma; por el contrario en *C. glutamicum* estos genes no conforman un operón, son funcionales y están regulados catabólicamente. En el presente trabajo se han clonado, secuenciado e interrumpido de forma dirigida los genes *gntK* y *gntP* de *C. glutamicum* para confirmar la existencia de una ruta metabólica funcional del ácido glucónico en esta corinebacteria.

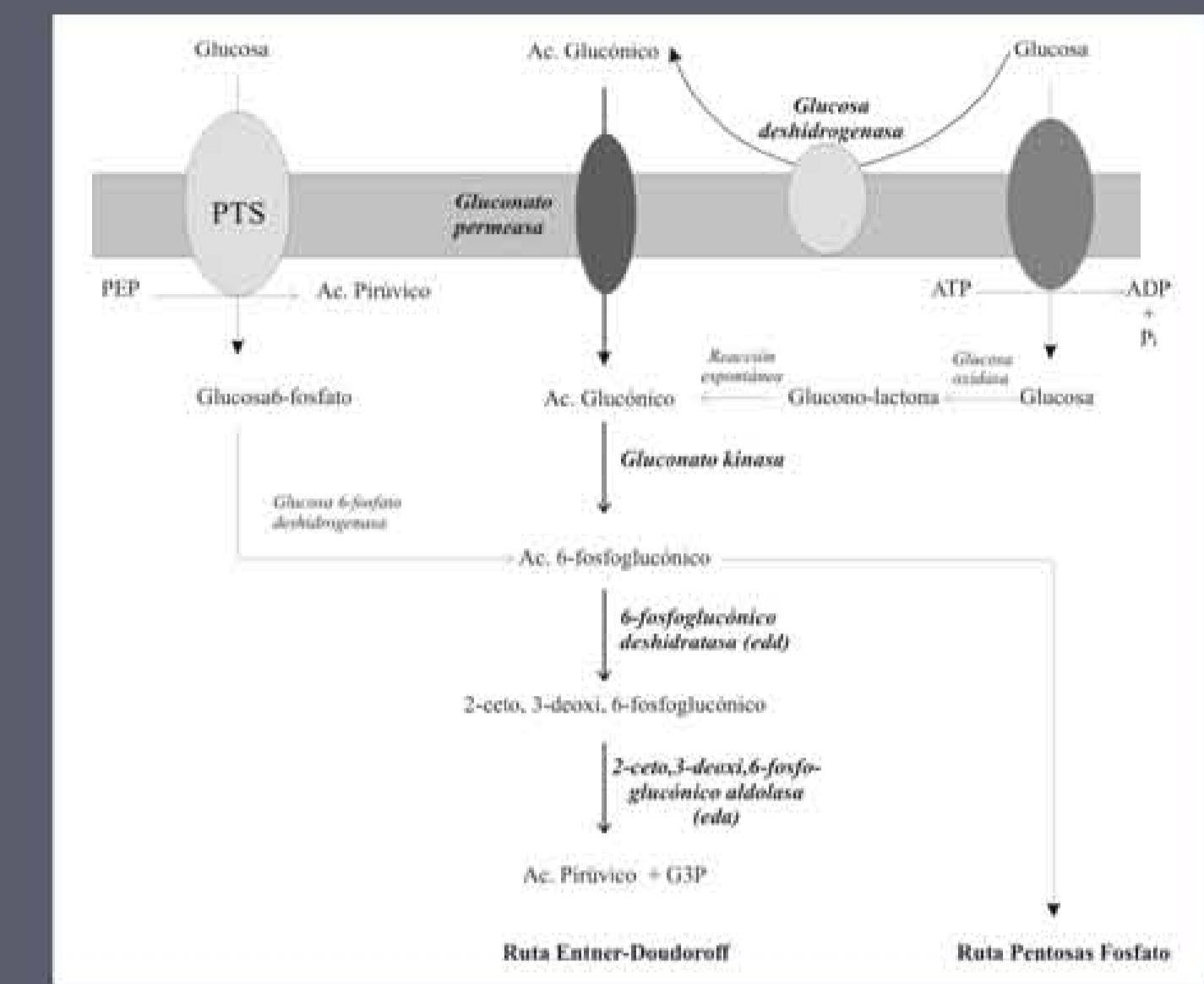


Figura 1. Mecanismos de entrada de glucosa y sus destinos catabólicos. La glucosa puede entrar por varios sistemas: transporte activo, translocación de grupo (PTS) o a través de su previa conversión a ácido glucónico. En corinebacterias se cree que el ácido glucónico se incorpora a la ruta de las pentosas fosfato.

## Resultados

### (i). Localización de los genes *gntK* y *gntP* en *C. glutamicum* ATCC13032

En los trabajos previos realizados con el gen *gntP* se observó que éste no se encontraba conformando el operón clásico *gntRKP* dentro del cromosoma de *C. glutamicum*. Al completarse recientemente la secuenciación del genoma de *C. glutamicum*, se pudieron realizar análisis bioinformáticos exhaustivos que permitieron la identificación del potencial gen *gntK* y su localización en el cromosoma con respecto al origen de replicación. La distancia entre los genes *gntK* y *gntP* es de aproximadamente 500 Kpb (Fig. 3). Los dos genes son funcionales y parecen estar regulados por un sistema de represión catabólica (Magasanik, 1970) por la presencia de una posible secuencia de unión a la proteína CRP (Catabolic Repression Protein; De Crombrugge y col., 1984) en las inmediaciones de las regiones promotoras de los genes.

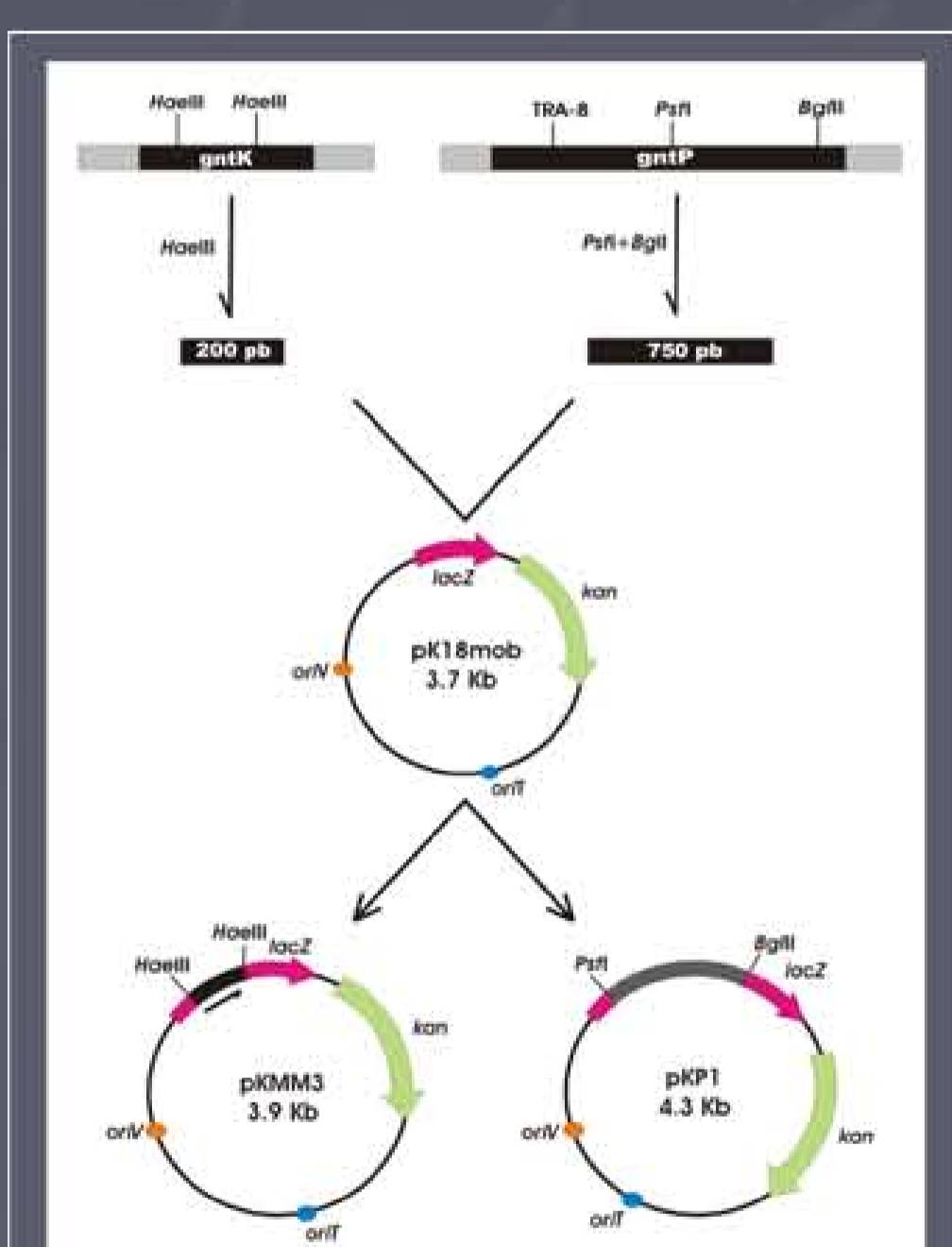


Figura 2. Obtención de los vectores pKMM3 y pKP1. Se introducen en corinebacterias por conjugación, donde actúan como vectores suicidas.

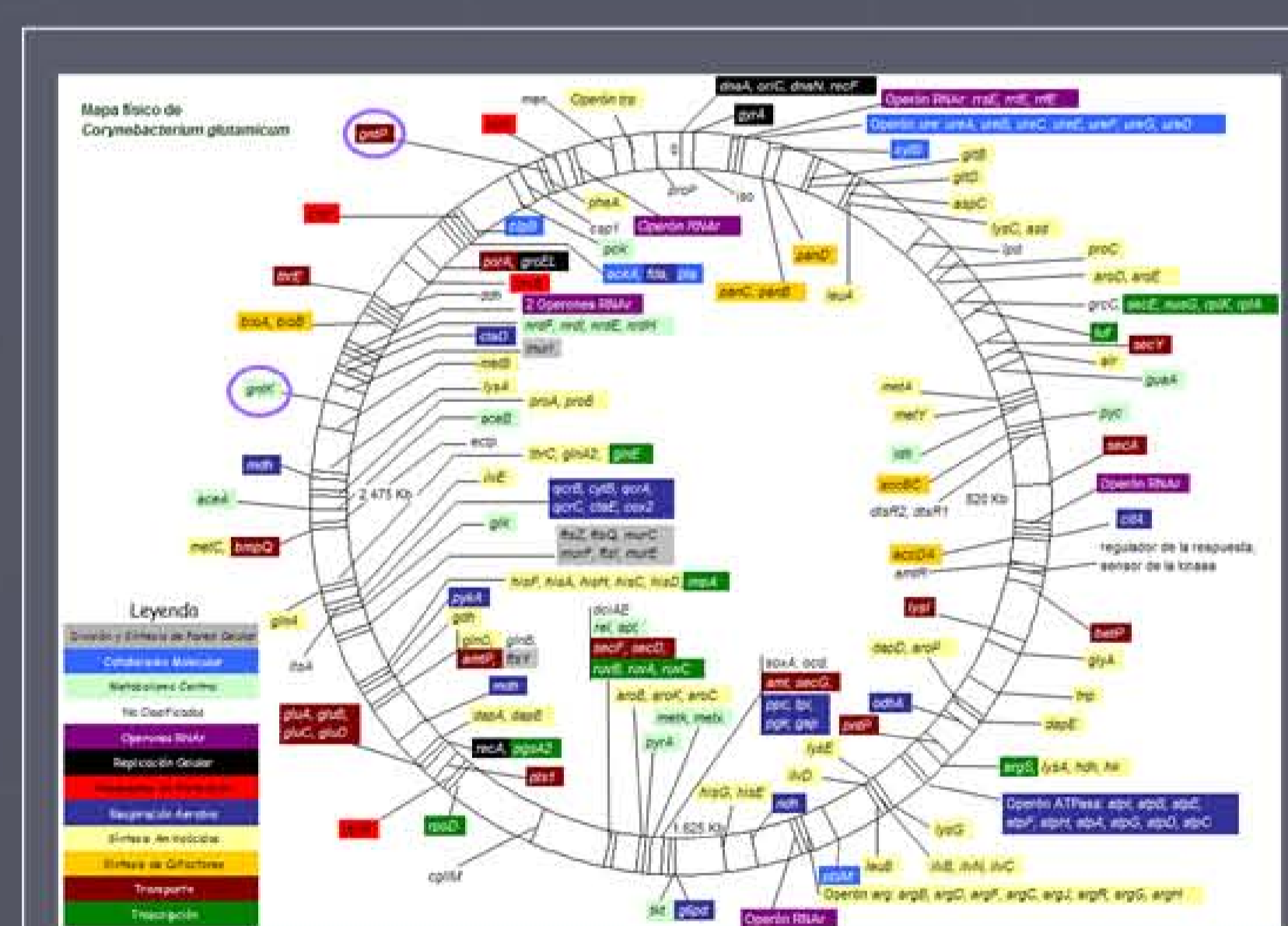


Figura 3. Mapa físico de *C. glutamicum* ATCC13032. En círculos se encuentran destacados los genes *gntK* y *gntP*.

### (ii). Interrupción dirigida de los genes *gntK* y *gntP* en corinebacterias.

Los ensayos se realizaron utilizando el vector conjugativo pK18mob, suicida para corinebacterias (Schafer y col., 1994). Cuando se clona en pK18mob un fragmento interno de un gen de corinebacterias y se transfiere por conjugación a un receptor, la presión selectiva favorecerá la integración por recombinación homóloga del plásmido recombinante, obteniéndose con ello la consiguiente interrupción del gen objeto de estudio. Como cepas receptoras de los ensayos de conjugación *E. coli*-corinebacterias, se utilizaron *C. glutamicum* ATCC13032 y *Brevibacterium lactofermentum* R-31 (corinebacteria con los mecanismos de restricción alterados). El gen *gntP* (1,5 Kpb) codifica una actividad gluconato permeasa que permite la entrada del ácido glucónico a través de la membrana celular (Fig. 1); un fragmento interno de este gen obtenido del ensayo de rescate del plásmido integrado en el mutante TRA-8 (Valbuena, 1999) fue subclonado en pK18mob, obteniéndose la construcción pKP1 (Fig. 2). La interrupción génica (dirigida) generó mutantes que se comportaron nutricionalmente de forma similar al clon TRA-8 (Fig. 4); los transconjugantes *gntP*<sup>-</sup> son incapaces de crecer en medio mínimo con ácido glucónico como única fuente de carbono y energía, mientras que las cepas silvestres de ambas corinebacterias pueden catabolizarlo y presentan un crecimiento normal.

El gen *gntK* (0,5 Kpb) codifica una actividad gluconato kinasa, cuya función es de fosforilar el carbono 6 del ácido glucónico produciendo ácido 6-fosfogluconico; este derivado fosforilado se cataboliza totalmente mediante la ruta de las pentosas fosfato en *C. glutamicum* (Fig. 1). La secuencia codificante se ha identificado en esta corinebacteria por homología con genes *gntK* ya descritos en un amplio rango de bacterias; mediante procedimientos bioinformáticos se ha obtenido además su localización dentro del cromosoma y esto ha permitido su amplificación por PCR. Se ha subclonado un fragmento interno de *gntK* en el vector pK18mob, obteniéndose la construcción pKMM3 (Fig. 2). Después de realizar un ensayo de conjugación *E. coli*-corinebacterias con esta construcción, se han obtenido transconjugantes con un fenotipo *gntK*<sup>-</sup>, los cuales se comportaban de forma similar a los mutantes TRA-8 y *gntP*<sup>-</sup> tal y como se observa en la Figura 4. A priori, el pequeño tamaño de este gen podría dificultar su interrupción por procedimientos de recombinación simple, aunque los ensayos han sido satisfactorios.

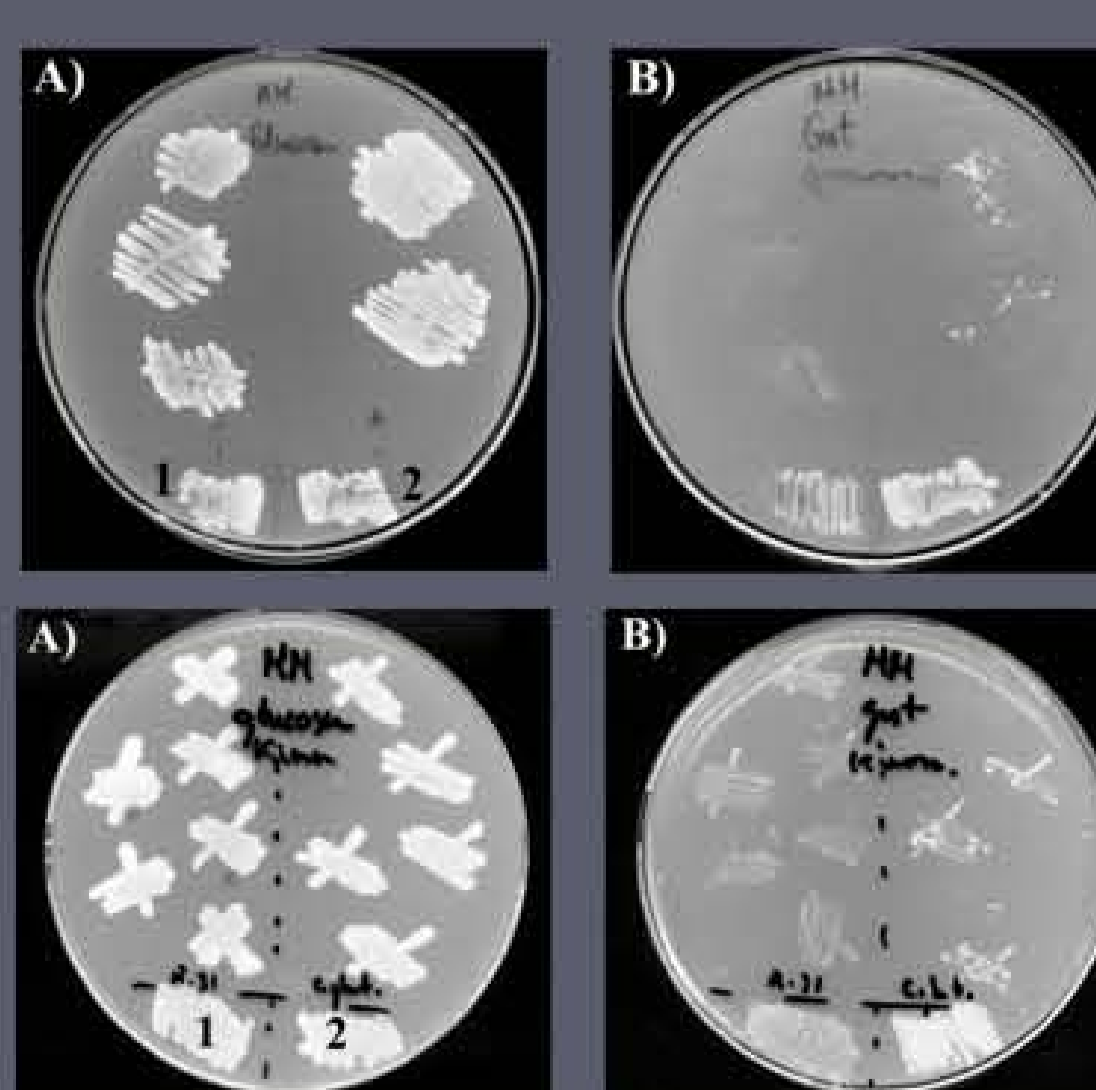


Figura 4. Mutantes *gntP*<sup>-</sup> (superior) y *gntK*<sup>-</sup> (inferior).

A) Medio Mínimo Corinebacterias (MMC) suplementado con glucosa como única fuente de carbono (control positivo). A la izquierda de la placas se han sembrado mutantes *gntP*<sup>-</sup> de *Brevibacterium lactofermentum* R31; a la derecha mutantes *gntP*<sup>-</sup> de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. Como control positivo se sembraron en la parte inferior las cepas silvestres correspondientes.  
B) MMC suplementado con ácido glucónico como única fuente de carbono. Los mutantes *gntP*<sup>-</sup> son incapaces de crecer en este medio.

## Bibliografía

- De Crombrugge B., Busby S., Buc H. 1984. Science. 224, 831-838.
- Letek M., 2002. Tesina, Universidad de León, León.
- Magasanik B., 1970. Beckwith J.R., Zipser D. (eds). 189-220. Cold Spring Harbor, New York.
- Mateos L.M., Schafer A., Kalinowski J., Martin J.F., Pühler A. 1996. J. Bacteriol. 178, 5768-75.
- Schafer A., Tauch A., Jager W., Kalinowski J., Thierbach G., Pühler A. 1994. Gene. 145, 69-73.
- Valbuena N., 1999. Tesina, Universidad de León, León.