

31/184 Sep 186



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

*Caracterización Física y Genética de
una Mutación en el Gene Regulador
glnL de Escherichia coli*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

BIOLOGO

PRESENTA:

JULIO CESAR URBINA ORANTES

MEXICO, D. F.

1984



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	16
ANTECEDENTES	28
RESULTADOS	29
DISCUSION	56
BIBLIOGRAFIA	61

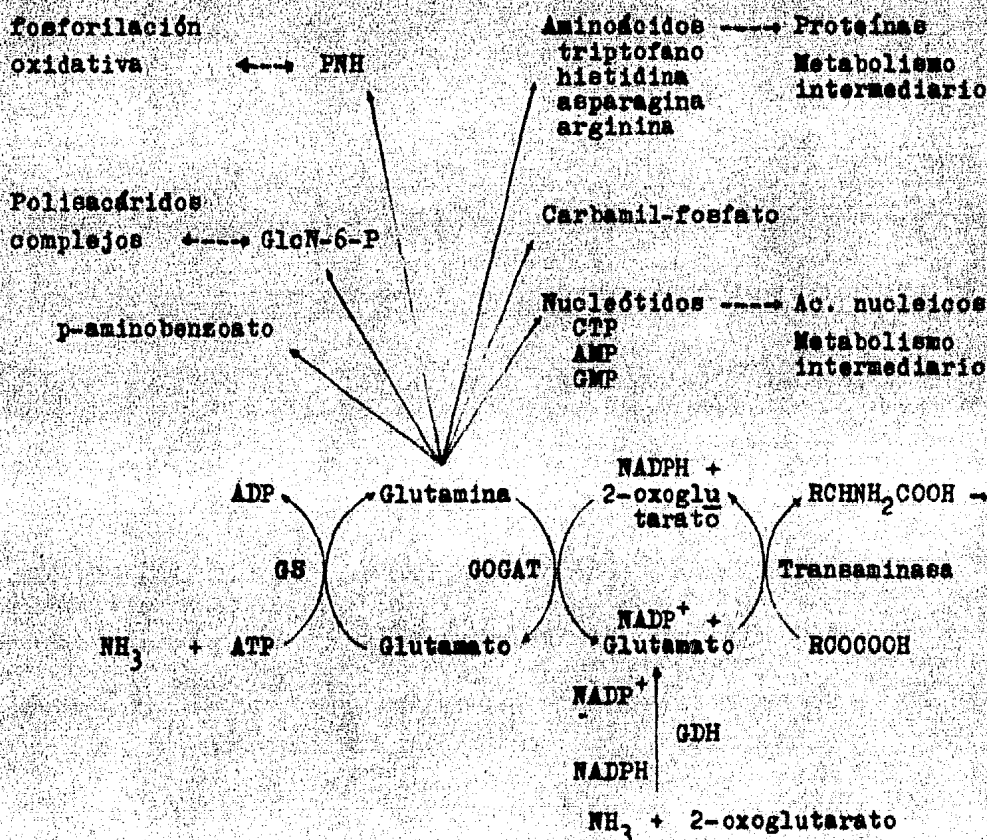
INTRODUCCION

Desde los albores de la vida, el nitrógeno ha sido un elemento fundamental en la estructura y función de las macromoléculas biológicas, de tal suerte que la capacidad de utilizar las fuentes de nitrógeno disponibles en el medio ambiente ha sido un factor determinante en el desarrollo y evolución de los organismos. Así, merced a la larga trayectoria evolutiva recorrida, los seres vivientes han incorporado en su patrimonio genético la información necesaria que les permite utilizar, de manera eficaz y versátil, los recursos nitrogenados que se encuentran en el medio. Para esto, cuentan con sistemas de suministro y distribución de nitrógeno a fin de satisfacer sus requerimientos metabólicos. Tales sistemas pueden dividirse en dos tipos: 1) vías de asimilación necesarias para la utilización de compuestos nitrogenados; y 2) rutas metabólicas encargadas de la producción de biomoléculas que contienen nitrógeno en su estructura primaria (1).

Los microorganismos procariotes poseen la facultad de utilizar el amonio y una amplia gama de compuestos nitrogenados como fuente de nitrógeno celular. Esto es particularmente patente en los seres unicelulares que habitan medios susceptibles a cambios repentinos en su composición química, de manera que la amplitud de posibilidades de asimilar desde compuestos inorgánicos muy simples, hasta derivados orgánicos como son algunos aminoácidos (2), obedece a la sorprendente capacidad adaptativa lograda a lo largo del tiempo.

En las enterobacterias, la incorporación del amonio a moléculas orgánicas ocurre mediante dos vías conocidas: una que se debe a la participación de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH), que cataliza la formación de glutamato a través de la aminación reductiva del 2-oxoglutarato por el amonio; y la otra que ocurre gracias a la formación de glutamina a partir de amonio y glutamato,

en una reacción, dependiente de ATP, catalizada por la enzima glutamino sintetasa (GS). Las reacciones de estas enzimas, aunadas a la actividad de la glutamato sintasa (GOGAT), encargada de la síntesis de glutamato por la transaminación reductiva del 2-oxoglutarato, donde la glutamina funge como donador de su grupo amido; se encuentran articuladas dentro de un sistema coordinado de asimilación de amonio y producción de glutamato y glutamina. En la siguiente figura se esquematiza dicha red metabólica (1).

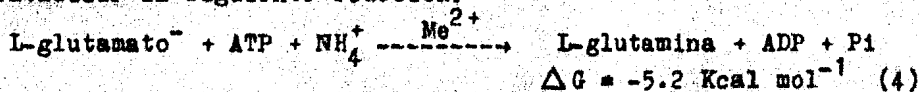


Por su participación como donador directo de nitrógeno en la biosíntesis de diversos aminoácidos, CTP, AMP, glucosamina-6-fosfo

to y NAD^+ ; la glutamina se sitúa como un intermediario clave en los procesos de síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos complejos. Además, dado que la formación de glutamina ocurre exclusivamente por una vía enzimática, la enzima responsable de esta función, la GS, reviste importancia crucial en la fisiología bacteriana, en virtud de participar en el primer paso de una ruta metabólica, profusamente ramificada, que conduce en última instancia a la síntesis de casi todas las macromoléculas importantes para la célula.

La estratégica función que la GS desempeña en el metabolismo nitrogenado de numerosos protocariotes, ha llamado la atención de diversos investigadores que han enfocado sus estudios a la tarea de establecer tanto las características químicas más importantes de la enzima, como los mecanismos que modulan su actividad intracelular.

En un primer plano, investigaciones en Escherichia coli (3), han permitido caracterizar a la GS como una enzima oligomérica, constituida por doce subunidades idénticas, con actividad catalítica independiente y que se encuentran dispuestas en dos unidades hexagonales, una frente a la otra. Cada subunidad tiene la facultad de catalizar la siguiente reacción:



La holoenzima tiene un peso molecular de 600 000 daltones y es muy estable en presencia de cationes divalentes como Mg^{2+} o Mn^{2+} .

En lo que respecta a la regulación de la GS, se han descrito cuatro mecanismos diferentes de control celular. Uno de ellos se ejerce a nivel de regulación génica (2) y los otros tres a nivel de actividad catalítica (4). Estas estrategias son las siguientes: (i) un sistema complejo de control de la síntesis enzimática que responde a las condiciones de disponibilidad de nitrógeno en el medio; (ii) inhibición por retroalimentación ejercida por algunos productos terminales del metabolismo de la glutamina; (iii) influencia de la disponibilidad ambiental del tipo de cationes diva-

lentes; y (iv) un sistema de cascada bicíclico (5), integrado por algunas enzimas controladas por metabolitos y pequeñas proteínas reguladoras, que por medio de interacciones alostéricas y con substratos, modulan la adenilación y desadenilación de la GS, y determinan su potencial catalítico. Este sistema consta de dos ciclos enzimáticos estrechamente ligados. En un ciclo, las subunidades de la GS son continuamente adeniladas y desadeniladas por la enzima adenil-transferasa (ATasa). La adenilación de alguna subunidad de la GS produce la inactivación catalítica de dicha subunidad, de modo que la actividad global de la proteína es inversamente proporcional a la fracción promedio de subunidades que están adeniladas (5). En el otro ciclo, la proteína reguladora P_{II} es uridilada y desuridilada continuamente, posiblemente por la misma enzima, la uridil-transferasa (UTasa). Ambos ciclos, uridilación y adenilación, están ligados in vivo porque la forma no uridilada de la proteína reguladora (P_{IIA}) ayuda a promover la adenilación de la GS, mediante la acción de la ATasa; mientras que la conformación uridilada de la proteína P_{II} (P_{IID}), estimula la actividad desadeniladora de la ATasa. Además, se ha considerado que el 2-oxoglutarato y la glutamina, en oposición uno al otro, son los metabolitos más importantes que ejercen efectos recíprocos sobre las reacciones de modificación y desmodificación de la GS (5). Así, cuando Escherichia coli crece en un medio con exceso de amonio, los niveles intracelulares de glutamina se incrementan y se activa la adenilación de la GS; simultáneamente, aunque en forma indirecta, se inhibe la desadenilación, en virtud de bloquearse la uridilación de la proteína P_{II} . Cuando el amonio del medio está en concentración limitante, el incremento de los niveles intracelulares del 2-oxoglutarato activan la desadenilación e inhiben la reacción adeniladora (4). En conclusión, se ha observado (6) que el estado promedio de adenilación de la GS, correlaciona positivamente con las concentraciones intracelulares y la relación 2-oxoglutarato/glutamina.

La disponibilidad de nitrógeno en el medio no solo regula la actividad de la GS, sino también la concentración intracelular de

la proteína. En condiciones limitantes de nitrógeno, los niveles enzimáticos son de cinco a diez veces mayores que en condiciones de exceso de amonio en el medio. La base de esta afirmación estriba en los hallazgos de Weglenski y Tyler (7), quienes han demostrado que en Klebsiella aerogenes existe una correlación positiva entre los niveles de actividad intracelular de la GS y los niveles de RNA mensajero de glnA, el gene estructural de la GS (8). Así, resulta evidente que el control de la síntesis de la enzima ocurre, en primer término, a nivel de transcripción.

Los primeros experimentos que trataron de analizar la manera en que se regula la síntesis de la GS, revelaron la existencia de por lo menos dos sitios, en K. aerogenes, genéticamente mutables, involucrados en la expresión de la enzima. Las mutantes en el primer sitio, denominado glnB, producen GS catalíticamente activa pero en niveles muy reducidos, en cambio las mutantes en el segundo locus, denominado glnA, produjeron GS antigénicamente normal pero enzimáticamente alterada. Estos hechos permitieron asociar el locus glnA con el gene estructural de la enzima (8).

Por otra parte, se mapearon mutaciones que afectaban el control de la síntesis de la GS, pero no su actividad enzimática, es decir, mutantes con niveles enzimáticos altos constitutivos, cuyo fenotipo se denomina GlnC. Mediante pruebas de complementación y mapeo genéticos de dudosa calidad, estas mutaciones fueron asignadas dentro del gene glnA (9). Inclusive, al buscarse diferencias electroforéticas entre las enzimas de las cepas silvestre y mutantes con fenotipo GlnC, no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, este hecho se soslayó y se mantuvo la idea de que dicho fenotipo (GlnC) respondía a mutaciones en el gene glnA (10). Estos datos, aunados a la evidencia de que mutaciones que alteran el sistema de adenilación de la GS, afectan concomitantemente la expresión de glnA (11), sirvieron de plataforma a Bender y Magasanik (12) para proponer la hipótesis de que la GS modula la expresión de su propio gene, y que el estado de adenilación de la enzima modifica su función como regulador de la transcripción. Sin embargo, estudios posteriores señalaron que los mapeos genéticos efectuados por el grupo de Magasanik, fueron imprecisos.

Posterior a estos hallazgos, García y colaboradores (13) encontraron mutaciones en Salmonella que conferían auxotrofia de glutamina (fenotipo Gln^-), pero que no se localizaban en el gene glnA, además de poseer actividades normales de las proteínas involucradas en la modificación covalente de la GS (P_{II} , ATasa y UTasa), y en las enzimas biosintéticas GDH y GOGAT. Mediante un mapeo genético minucioso se encontró que dichas mutaciones afectaban a un gene recientemente identificado, glnF, que resultó indispensable para la expresión de glnA. Incluso, demostraron que tales mutaciones en glnF eran recesivas, sugiriendo así, que dicho gene probablemente codifique para un producto difusible, que también es requerido para la síntesis de la GS en E. coli. Asimismo, estos autores (13) encontraron que aparentemente el grado de adenilación de la GS no influye en la desrepresión de su síntesis.

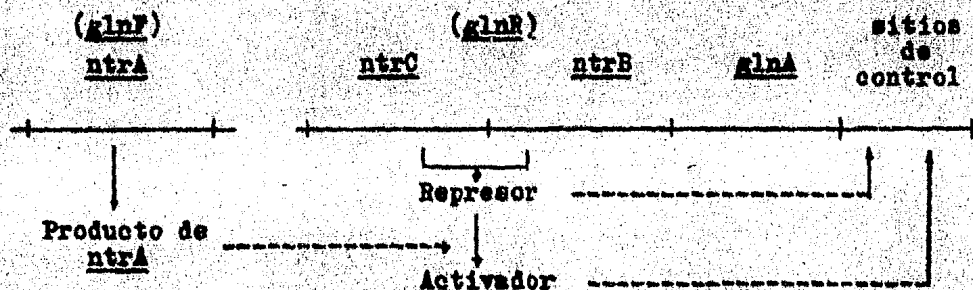
En cuanto a la manera de actuar del producto del gene glnF, continúa siendo una incógnita, aunque una hipótesis probable es que funcione como un activador de la transcripción, empero, cabe la posibilidad de que esté involucrado en la síntesis de otras moléculas reguladoras de la transcripción. Prácticamente no hay estudios sobre la expresión de glnF, excepto uno efectuado en nuestro laboratorio recientemente por Castaño (14), quien empleando inserciones del profago especializado Mu 41 en glnF, sujeta la expresión del operón lac exento de su promotor, que está integrado al genoma del bacteriófago, bajo la dirección del promotor de glnF. Empleando esta ingeniosa herramienta genética, exitosa en estudios sobre control de la transcripción (15), se obtuvieron datos que indican que, aparentemente, la expresión de glnF en E. coli es constitutiva, tanto en condiciones limitantes como de abundancia de nitrógeno en el medio.

Posterior a la identificación del gene glnF, Pahel y Tyler (16) aislaron mutaciones por inserción del profago Mu, que confieren niveles bajos constitutivos de actividad de la GS en todas las condiciones de crecimiento, fenotipo denominado GlnR . Además, estas mutaciones suprimen el fenotipo Gln^- , originado por mutaciones en el gene glnF, y confieren incapacidad de utilizar fuentes alternativas de nitrógeno, tales como la arginina, prolina, ornitina, γ -ami-

nobutirato o serina. Los análisis de estas mutaciones mapearon muy ligados al gene glnA, sin afectar su estructura, sugiriendo así, la existencia de un cistron diferente al estructural, denominado por ellos glnG. Simultáneamente, Kustu et al (17) comunican la identificación de un gene ligado a glnA que ellos designan glnR, cuya función es esencial en la regulación de la GS en Salmonella. Sus datos sugieren que este nuevo cistron se presenta en E. coli en localización cromosómica homóloga. Además, estas mutaciones en glnR son supresoras del alelo glnF⁻, tienen actividades constitutivas bajas de GS y son incapaces de crecer en medio con arginina como única fuente de nitrógeno (fenotipo Aut⁻), lo que induce a pensar que el producto proteico de glnR está implicado en la regulación genética de la GS, y dado que suprime el efecto de las mutaciones en glnF, es permisible suponer que ambos productos actúan coordinadamente. El modelo que postulan Kustu y colaboradores (16) para explicar sus resultados, propone que el producto de glnR puede existir en dos conformaciones funcionales: una como represor de la transcripción de glnA; y la otra como efector con carácter regulador positivo sobre la expresión del gene estructural de la GS. Asimismo, asignan al producto del gene glnF la función de modificar, directa o indirectamente, al producto de glnR para cambiarlo de su conformación represora a su forma activadora. El carácter dual propuesto para el producto de glnR tiene un precedente similar en el producto del gene araC (Englesberg, E. y Wilcox, G., op. cit., en 17).

Mediante estudios de transcripción-traducción in vitro, utilizando DNA de bacteriófagos transductores especializados, que llevan la región de glnA de E. coli (AglnA), McFarland et al (18) detectaron la síntesis de seis proteínas bacterianas. Sin embargo, cuando se utilizó el DNA de una cepa mutante defectuosa en el locus glnR, supresora de un alelo glnF⁻, encontraron que dos proteínas, una de 54 y la otra de 36 kilodaltones de peso molecular, dejaban de sintetizarse. Al tratar de esclarecer cual de las dos proteínas correspondía al producto de glnR, encontraron que un tipo de mutaciones, ntrB⁻, dejaba de sintetizar la proteína de 36 ki

lodaltones y otro tipo de mutaciones, como la ntrC⁻, ya no producía el polipéptido de 54 kilodaltones. De modo que estas evidencias indicaron que el locus glnR está conformado por dos genes, ntrB y ntrC, que codifican para los productos de 36 y 54 kilodaltones, respectivamente. Además, demostraron que las mutaciones en ntrB y ntrC se complementan una a otra en trans y que cada una afecta la expresión de glnA en forma diferente. Una mutante ntrC⁻ posee niveles constitutivos bajos de la GS (fenotipo GlnR), en tanto que una ntrB⁻ ostenta actividades constitutivas altas, aun en condiciones de represión (fenotipo GlnC). A partir de estos resultados, los autores (18) infieren que el producto de ntrC sin el producto de ntrB es suficiente para mediar la activación, dependiendo del producto de glnF, denominado por ellos ntrA, de la expresión de glnA. Sin embargo, parece ser requerida la presencia de ambos productos para la regulación negativa de la transcripción de glnA. El modelo que ellos postulan se esquematiza a continuación:



Casi simultáneamente, Backman et al (19) reportan la clonación y caracterización física de la región cromosómica que comprende el gene glnA de E. coli. Ellos encuentran que adyacente al gene glnA, colindante con sus sitios de control, existe un cistron que produce un polipéptido de 82 000 daltones de peso molecular, pero, a pesar de su proximidad, determinan que se transcribe en sentido opuesto a glnA y que no es controlado por la disponibilidad de nitrógeno en el medio. Por otra parte, demuestran (19) que el locus glnG se transcribe en el mismo sentido que glnA, es decir, que corre en sentido inverso de las manecillas del reloj. Aunado a esto,

determinan que entre glnA y glnG existe un espacio intercostrónico de aproximadamente un mil pares de bases, cuyo análisis sugiere que participa en la regulación normal de la GS y de la histidasa. Esto se deduce del hecho de que ciertas mutaciones en esta región, principalmente deleciones, confieren niveles enzimáticos de la GS e histidasa altos constitutivos, fenotipos designados GlnC y HutC, respectivamente. Este comportamiento se debe probablemente, especulan los autores, a que dichas mutaciones afectan sitios reguladores de glnG o bien por la pérdida de un producto génico. Por otra parte, otros investigadores (20) definen el locus glnR (o glnG) en Klebsiella pneumoniae y presentan evidencias de que está involucrado en el control de los operones nif y hut.

Pahel y colaboradores (21) han aislado mutaciones que suprimen la auxotrofia de glutamina propia de alteraciones en el gene glnF, mediante inserciones del profago especializado Mu 41 (lac bla) en la vecindad de glnA. Estas mutaciones, además, confieren incapacidad de utilizar arginina como fuente de nitrógeno (Aut⁻) y pueden dividirse en dos clases. Una consistente de inserciones en glnG, que revierten a fenotipo Aut⁺ sólo por excisión precisa del profago Mu 41, y el otro tipo de mutaciones lo constituyen inserciones no localizadas en glnG, pero que son polares sobre la expresión de éste. Estas últimas mutantes, debieran ser capaces de revertir a fenotipo Aut⁺ únicamente por mutaciones que permitan la expresión de glnG. A este respecto, Dhen et al (22) han demostrado que ciertas deleciones en glnL (ntrB) resultan en cepas con fenotipo Reg⁺, es decir, que tienen la facultad de utilizar fuentes alternativas de nitrógeno, cuando la fuente preferencial -el amonio- está escasa o ausente.

Las inserciones del profago Mu 41 en el gene glnG de E. coli, permitieron analizar la expresión de éste, ya que el genoma viral insertado en orientación correcta permite que la expresión del operón lac quede bajo la dirección del promotor que modula la transcripción de glnG. Así, los autores (21), midiendo los niveles detectables de β -galactosidasa, lograron determinar la respuesta transcripcional de glnG en diversas condiciones extra e intracelulares. Estas investigaciones revelaron que en las cepas con el

alelo glnG::Mu d1, donde los niveles de GS e histidasa son bajos y no regulados, la presencia de la región silvestre glnA-glnG en un episoma, no sólo restaura los niveles normales de dichas enzimas, sino que los niveles de β -galactosidasa son también modulados por la disponibilidad de nitrógeno en el medio. Así, la síntesis del producto de glnG es controlada paralelamente a la expresión de glnA, posiblemente debido a que la transcripción de glnG se inicia en el promotor de glnA, como lo apoya el hecho de que inserciones del transposón Tn5 en glnA tengan efecto polar sobre la expresión de glnG en condiciones limitantes de nitrógeno. Sin embargo, también se ha observado que la expresión de glnG, medida por los niveles de β -galactosidasa, puede proceder de un promotor independiente del de glnA. Otros experimentos indican que en una cepa silvestre, la expresión de glnG en condiciones pobres de nitrógeno en el medio, depende exclusivamente del promotor de glnA, en tanto que - en condiciones abundantes en fuente nitrogenada, glnG aparentemente se expresa a partir del segundo promotor, distal a glnA.

En cepas merodiploides que llevan la constitución genética glnA⁺glnG::Mu d1 en cromosoma y glnA21::Tn5 glnG⁺ en episoma, presentan una regulación normal de la síntesis de la GS, pero no activan la transcripción del operón hut; esto es, aparentemente, que la supuesta expresión de glnG a partir de un promotor distal a glnA, es suficiente para controlar adecuadamente la transcripción del gene estructural de la GS, pero insuficiente para promover la expresión del operón hut, o para restaurar el fenotipo Reg⁺ (24). Resultados similares se han observado en E. aerogenes (23).

Por otro lado, Chen, Backman y Magasanik (22) comunican la caracterización de un gene en E. coli, cuya inutilización confiere a la cepa portadora el fenotipo GlnC. Además, las mutaciones en este gene analizadas, suprimen el fenotipo Aut⁻, característico de las cepas que portan el alelo gltB31 (27), gene estructural de una de las subunidades proteicas de la enzima glutamato sintasa. Las investigaciones de estos autores (22), señalan que la capacidad de conferir el fenotipo GlnC a cepas portadoras de dichas mutaciones, reside en una región de aproximadamente 480 pares de bases, situa-

da entre glnA y glnG. Esta evidencia, similar a la mencionada anteriormente (19), indica que entre estos genes se encuentra un cistrón que los autores han denominado glnL, cuyo producto actúa en trans, porque cuando el gene silvestre se encuentra integrado en un plásmido, complementa algunas mutaciones puntuales y deleciones en dicha región del cromosoma. Además, parece ser que glnL posee promotor propio.

Chen et al (22) correlacionan la hipótesis de Pahel (21) a los datos sobre glnL y sugieren que el promotor secundario para glnG podría ser el mismo que ellos asignan a glnL, de modo que existirían dos promotores en el denominado operón glnALG, uno a nivel de glnA y el otro al principio de glnL. De ser esto acertado, deben existir mutaciones en glnL polares sobre la expresión de glnG. Tales mutaciones deberán exhibir el fenotipo epistático no regulador GlnR, característico de las mutantes afectadas en glnG. Este tipo de mutaciones se han aislado en E. coli (24), aunque únicamente se menciona que no complementan mutaciones en glnG, en trans, para el fenotipo Reg⁻.

Nuevos hallazgos consolidaron la teoría de que los genes glnA, glnL y glnG se transcriben como un operón. Así, Guterman, Roberts y Tyler (25) demostraron que ciertas mutaciones que afectan al gene glnA y que no producen niveles detectables de la enzima GS, presentan el fenotipo Reg⁻ por ser polares sobre glnL y glnG, y porque sus fenotipos reguladores asociados (Reg⁻) son suprimidos por mutaciones que alteran el factor de terminación de la transcripción rho.

Un hecho que destaca en el trabajo de Guterman et al (25), es el de haber demostrado tácitamente que la activación de la histidasa no requiere de la participación de la GS, puesto que al suprimirse la polaridad de ciertas mutaciones puntuales en glnA, se restituye la regulación normal de la histidasa, lo que implica que los operones controlados por nitrógeno, agrupados bajo el fenotipo Reg, no requieren de la GS para su regulación.

Retornando a la idea de que los genes glnA, glnL y glnG se constituyen en un operón, los experimentos utilizando fusiones de los genes glnA-lacZ en E. aerogenes (26), han arrojado algunas observaciones que permiten comprender cómo se modula el sistema génico. Como era de esperarse, los niveles detectados de β -galactosidasa estuvieron en función de la disponibilidad de nitrógeno en el medio, lo que soporta la tesis de que el gene lacZ efectivamente está bajo la dirección del promotor de glnA, y que éste funciona adecuadamente prescindiendo de su producto proteico. Por otro lado, es claro el hecho de que la respuesta del promotor de glnA a los productos peptídicos de glnB, glnF, glnG y glnL, se lleva a cabo normalmente sin la intervención de la GS funcional.

En algunos estudios (26), empleando merodiploides que llevan tanto el gene silvestre glnA así como inserciones de Mu dI en éste, se ha mostrado que si bien los niveles de β -galactosidasa y GS son correlativos entre sí, tanto en situaciones de represión como de inducción. Sin embargo, la substitución de histidina por glucosa como fuente de carbono, rompe el esquema de proporcionalidad observado y se contempla un aumento en los niveles de β -galactosidasa con respecto a los de la GS. Aparentemente, en E. aerogenes la expresión de lacZ a partir del promotor de glnA, no puede ser reprimido tan eficazmente como la expresión del gene silvestre. Aunque se carece de una explicación para este efecto, resulta atractivo pensar en la posibilidad de que exista un promotor secundario débil, localizado dentro del gene glnA y que no esté sujeto a regulación. Esta alternativa actualmente cobra más vigor merced a que el análisis de la secuencia nucleotídica de la región de control de glnA, en E. coli, revela la existencia de tres sitios probables de reconocimiento de la RNA polimerasa, contiguos y muy cercanos entre sí (28).

Hasta este punto, las investigaciones realizadas favorecen el punto de vista de que el producto de glnG, reprime la transcripción iniciada en el promotor de glnA, cuando la presencia de amonio en el medio es abundante; pero cuando la disponibilidad de amonio es exigua, la transcripción del operón se activa en respu-

ta a esta condición. La supuesta modificación de represor a activador que sufre el producto de glnG, presumiblemente catalizada por el producto de glnF, se piensa que es consecuencia de la intervención del producto de glnL, que responde a las condiciones de nitrógeno en el medio. La información tocante a la disponibilidad y abundancia de recursos nitrogenados es, aparentemente, transmitida al producto de glnL por las proteínas P_{II} y uridil-transferasa, que son componentes del sistema de adenilación de la GS, y que responden a la relación intracelular glutamina/2-oxoglutarato. Además, prevalece la hipótesis de que la proteína P_{II} participa activamente en el control de la síntesis de la GS (29), posiblemente porque funge como antiactivador, esto es, que interfiere en la conversión de la forma represora a la activadora del complejo regulador. Por otro lado, parece ser que la transcripción iniciada en el supuesto promotor de glnL está sujeta a represión por el producto de glnG. Esto afirman Ueno-Nishio, Backman y Magasanik (30), quienes encontraron que la expresión iniciada en la región intercistronica glnA-glnL, es aproximadamente cien veces mayor en cepas carentes del producto funcional de glnG, que en aquellas que sí lo poseen. Es muy sugerente la idea de que el producto de glnG ejerce un efecto negativo sobre la expresión génica a partir del promotor putativo de glnL, ya que en condiciones limitantes de nitrógeno, donde la expresión de glnG aumenta, se abate la tasa de transcripción originada en el promotor de glnL. Cabe agregar, que las mutaciones en glnF no modifican los patrones de expresión observados, lo que probablemente implica que este producto no actúa sobre este promotor.

MacNeil, Roberts y Tyler (31), efectuaron un análisis genético de las supuestas funciones de los productos de glnL y glnG. Mediante el empleo de numerosas mutaciones en ambos genes, disectan, genéticamente hablando, algunas propiedades funcionales de los productos polipeptídicos respectivos. Así, ellos atribuyen al producto de glnG dos funciones. Una como efector positivo sobre la expresión de glnA y otros sistemas regulados por nitrógeno, basándose para esta afirmación en la existencia de mutaciones que elimi-

nan las funciones proteicas y que consecuentemente resultan ser incapaces de desreprimir la expresión de glnA. La otra función imputada es la de represor de la transcripción del gene estructural de la GS, fundamentándose en la presencia de mutaciones en glnG que originan auxotrofia de glutamina (31, 32) y en la incapacidad de muchas mutantes en este locus de suprimir las alteraciones en glnF, para el fenotipo de no-utilización de amonio como fuente de nitrógeno (Gln^-).

En relación al producto de glnL, también lo consideran bifuncional, porque: 1) es capaz de ejercer control negativo sobre la síntesis de la GS, demostrado por la frecuente ocurrencia de suprasoras del efecto originado por mutaciones en glnF, por la existencia de mutaciones no polares en este locus que presentan el fenotipo GlnC , y porque se han aislado mutantes defectuosas en glnL que son revertantes Reg^+ de las mutaciones en gltB (27) o en glnD; 11) además, el producto de glnL parece ser requerido para la desrepresión de otros sistemas regulados por nitrógeno, ya que en forma similar a las mutaciones en glnG, virtualmente todas las alteraciones en glnL confieren el fenotipo Reg^- , excepto aquellas que presentan el fenotipo GlnC , que concomitantemente son Reg^+ .

Sin embargo, Backman y colaboradores (33), afirman que el producto de glnL no es esencial para regular la expresión de glnA ni la de los operones controlados por nitrógeno. Los argumentos que esgrimen para basar esta afirmación, consisten en haber encontrado que la regulación de dichos sistemas en mutantes afectadas en glnL, no difieren cualitativamente de lo observado en cepas silvestres, aunque cuantitativamente, en abundancia de amonio, las mutantes son menos eficientes que las silvestres en reprimir la síntesis de la GS. En adición a esto, sostienen que el producto de glnG proporcionado en bajas concentraciones, regula la expresión de glnA, sin el auxilio del producto de glnL. También señalan que la ausencia del producto de glnL no previene la fuerte represión de la síntesis de la GS, característica de las mutantes defectuosas en glnF, de modo que, esta represión que requiere de la proteína funcional de glnG, parece prescindir del producto de glnL. Empero, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, indican que cierta mu-

taciones en glnL, no polares, suprimen la auxotrofia de glutamina ocasionada por lesiones en el gene glnF (Castaño, I., comunicación personal), hecho previamente mencionado por diversos autores (18, 21 y 31). Inclusive, señalan Hackman y colaboradores (33) que las mutantes afectadas en glnL son capaces de utilizar arginina o prolina como fuente única de nitrógeno, infiriendo mediante este hecho que el producto de glnL no se requiere para la activación de la síntesis de las enzimas que proporcionan amonio intracelular.

Resulta curioso que entre diversos autores existan deducciones antagónicas sobre las funciones del producto de glnL, ya que por un lado unos (32) afirman que esta proteína es indispensable para la regulación génica de glnA y operones Reg, en tanto otros (33) sostienen categóricamente que el producto de glnL no es esencial para controlar la expresión de estos operones, sino que probablemente comunique información redundante sobre la disponibilidad de nitrógeno en el medio.

Aún se precisan de estudios genéticos y fisiológicos más profundos y exhaustivos, a fin de tratar de desentrañar el papel que desempeñan todos y cada uno de los productos génicos involucrados en la regulación de la síntesis de la GS. Logrados estos objetivos, entonces, podrán armarse modelos más estructurados y detallados que expliquen cabalmente la manera cómo las bacterias entéricas manejan los recursos nitrogenados que están a su disposición.

El objetivo del presente trabajo fué buscar y, en su caso, caracterizar las mutaciones en el gene glnL, a fin de tratar de comprender el papel que el producto de este gene desempeña en la regulación genética de la GS.

MATERIALES Y METODOS

CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS. Las cepas bacterianas utilizadas son derivadas de Escherichia coli K-12 y se enlistan a continuación:

CEPA	GENOTIPO RELEVANTE	FENOTIPO RELEVANTE
MX960	<u>glnL82::Tn5</u>	Gln ⁺ Aut ⁻ Km ^r
MX913	<u>glnG74::Tn5</u>	Gln ^R Aut ⁻ Km ^r
MX902	<u>glnG74::Tn5</u>	Gln ^R Aut ⁻ Km ^r
MX850	<u>gln(ΔLG)Δ</u>	Gln ⁻ Km ^r
MX919	<u>gln(ΔLG)Δ</u>	Gln ⁻ Km ^R
MX727	<u>glnA71::Tn5</u>	Gln ⁻ Km ^r
MX988	<u>gltB31</u>	Gln ⁺ Aut ⁻
MX1019	<u>glnL83</u>	Gln ^C Aut ⁺
MX615	silvestre	silvestre
MX614	silvestre	silvestre
AB1206	(<u>glnA-glnG</u>)Δ/F'14	Gln ⁺ Aut ⁺

A excepción de la cepa AB1206, todas las demás son derivadas de la MX614. Inclusive la MX615 que posee una delección cromosómica que abarca gal-pgl-attA-bio, proviene de la MX614, y originó las cepas MX850 y MX919. La cepa MX913 se derivó de la MX902, sólo que posee una mutación puntual en el gene recA, de modo que es incapaz de llevar a cabo recombinación normal.

Los plásmidos que se utilizaron, fueron gentilmente proporcionados por Covarrubias^{*} excepto el pACR82. A continuación se enlistan, y se muestran en la figura 1.

PLASMIDO	GENOTIPO	FENOTIPO RELEVANTE
pACR1	<u>glnA⁺glnL⁺glnG⁺</u>	Gln ⁺ Col ^{imm}
pACR2	<u>glnA⁺glnL⁺glnG⁺</u>	Gln ⁺ Ap ^r
pACR3	<u>glnG⁺</u>	Ap ^r
pACR8	<u>glnL⁺glnG⁺</u>	Tc ^r
pACR82	<u>glnA⁺glnL82::Tn5 glnG⁺</u>	Gln ⁺ Km ^r Col ^{imm}

* Investigadora titular del Centro de Investigación sobre fijación de nitrógeno, U.N.A.M.

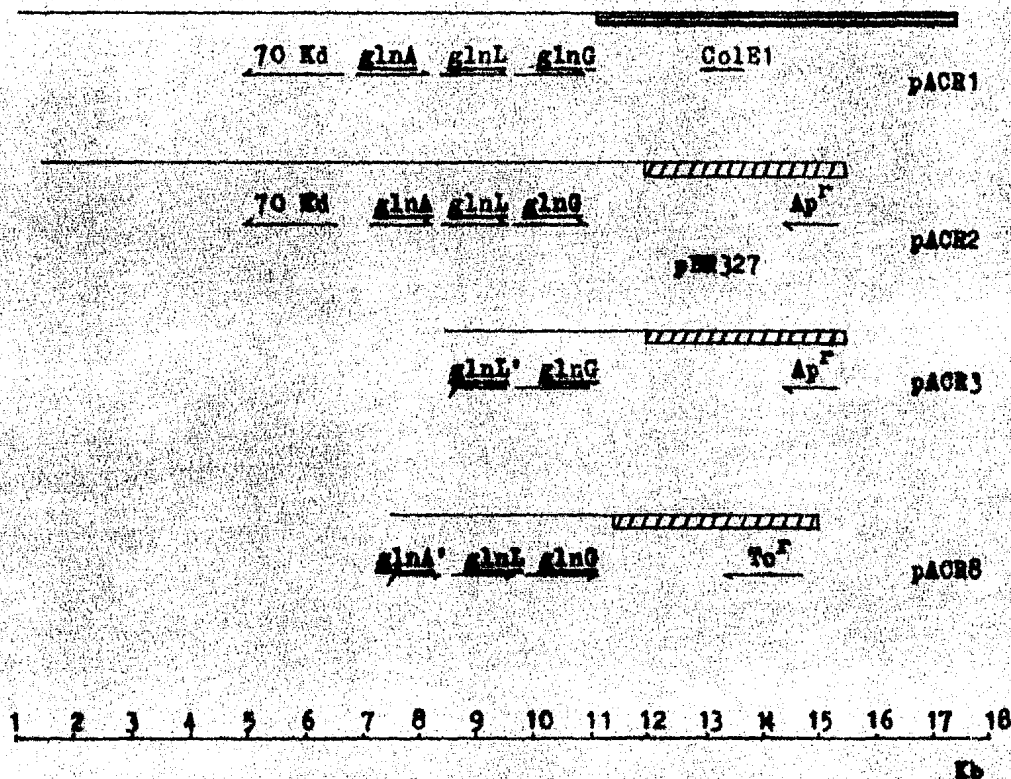


Figura 1. Mapa topográfico de los plásmidos empleados, conteniendo DNA derivado de *E. coli*. Se indica la región de *glnALG* que contiene cada uno, además de la dirección de transcripción. El apóstrofo (') indica que el gene correspondiente está incompleto.

MEDIOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO. Anteriormente, se han comunicado (34) los medios de cultivo empleados. El medio mínimo NN, contiene lo siguiente, en gramos por litro de solución a pH 7.4: KH_2PO_4 , 13.6; K_2SO_4 , 2.61; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; CaCl_2 , 0.01 y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005. Además, se agregó glucosa en solución a concentración final del 0.2%, como fuente de carbono, y como fuente de nitrógeno, se utilizó NH_4Cl 0.5 ó 15 mM, según las condiciones que se deseaban lograr, limitación o abundancia, respectivamente. También se usó L-glutamina (1 mg/ml; grado III) o bien L-arginina al 0.2%, para determinar el fenotipo Aut, como fuentes de nitrógeno. Otros suplementos nutricionales se adicionaron al medio mínimo para satisfacer ciertos requerimientos metabólicos, como son biotina, prolina, isoleucina- valina, etcétera, utilizando concentraciones finales que fluctuaron, según el caso, de 5×10^{-4} a 2×10^{-3} M. El medio nutritivo rico empleado fue complejo Luria (35), modificado por la exclusión de la glucosa. Para los medios sólidos, se añadió bacto-agar (Difco) a una concentración final del 1.5%. El empleo de agar en solución al 0.75%, agar suave, fue especialmente útil para plaques en cajas Petri.

Las cepas se mantuvieron en tubos con agar nutritivo inclinado y suplementados cuando fue requerido: con glutamina (1 mg/ml) en el caso de auxótrofas de este aminoácido (MX727, MX850 y MX919), y con antibióticos para preservar la presencia de los agentes que confieren resistencia a estos compuestos, transposón Tn5 y plásmidos. Así, se utilizó kanamicina (30 µg/ml) para las mutantes portadoras de inserciones del mencionado transposón (MX960, MX902, MX913 y MX727), ampicilina (100 µg/ml) para las cepas transformadas con el plásmido pACR3 y con el pACR2, y para las cepas que llevan el pACR8 se empleó tetraciclina (25 µg/ml). El mismo patrón de dosificación se siguió para los medios de cultivo y selección, según el caso de que se tratara.

Los cultivos se incubaron a 37°C de temperatura, empleándose agitación mecánica cuando se usaron medios líquidos. Estos cultivos se efectuaron en matraces nefelométricos, es decir, matraces erlenmeyer provistos de un brazo lateral de vidrio, y el crecimiento

to celular se determinó por turbidimetría (36), empleándose un colorímetro Klett-Summerson con un filtro rojo número 66, que determina el grado de turbidez ocasionado por la concentración de células en el medio. Esta se expresa en unidades Klett, tomando en cuenta que 40 unidades equivalen a cerca de 1×10^8 células/ml y 100 unidades corresponden aproximadamente a 5×10^8 células/ml (37). Para purificar el DNA, se emplearon matraces Fernbach con capacidad para un litro de medio de cultivo.

PROCEDIMIENTOS GENETICOS

TRANSDUCCIONES. Se utilizó como vector de transducción generalizado para Escherichia coli el bacteriófago P1 virA. La preparación de los lisados y los lineamientos generales para las transducciones se basaron en el método de Miller (35). Para obtener los lisados, se cultivaron las cepas donadoras en medio nutritivo hasta alcanzar una densidad de aproximadamente 1×10^8 células/ml, entonces, se tomaron 0.5 ml de cada cultivo y se mezclaron con 0.1 ml de lisado P1 diluido a una concentración de 10^7 unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml). La mezcla se hizo directamente en tubos de agar suave Luria, suplementado con CaCl_2 2.5 mM (LC), y se plaquearon en cajas de Petri conteniendo medio LCTG (agar Luria con CaCl_2 2.5 mM, timina 0.002% y glucosa 0.2%), para posteriormente incubarlo a 37°C, aproximadamente doce horas. Transcurrido este lapso, se removió el agar suave y se colocó en tubos para centrifuga, se agregó cloroformo (0.05 ml/ml de lisado), para lizar las células, en seguida se agitó vigorosamente y se sometió a centrifugación, para sedimentar los restos celulares y sólidos del agar. Posteriormente, se decantó el sobrenadante a otro tubo y se repitió la operación. Cada sobrenadante es un lisado del bacteriófago, que requirió ser titulado. Para esto, se cultivó la cepa AB1157 de E. coli hasta alcanzar 40 unidades Klett de turbidez, se centrifugó el cultivo y se resuspendió la pastilla en la mitad del volumen original, en una solución de MgSO_4 (0.01 M) y CaCl_2 (0.005 M). Se tomaron 0.1 ml de esta suspensión celular y se mezclaron con 0.1 ml del lisado a titular, previamente diluido logarítmicamente, utilizando las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} . Se in-

cubó la mezcla a 37°C durante veinte minutos y, acto seguido, se plaquearon en cajas Petri con LCTC. Transcurridas 12 horas aproximadamente, se contabilizó el número de placas líticas por caja y, en función de la dilución empleada, se calculó la concentración de cada lisado.

Contando con los lisados, previamente cuantificados, se cultivaron las células receptoras hasta una concentración cercana a 1×10^8 células/ml (~ 40 u. Klett), se colectaron mediante centrifugación y los sedimentos se resuspendieron en una solución de bacto-triptona al 1%, empleándose una décima parte del volumen inicial. Se agregó una cantidad similar de solución de CaCl_2 (0.015 M) y MgSO_4 (0.03 M) y una dilución 1:20 del lisado con respecto al cultivo bacteriano. Se incubaron las mezclas durante 20 minutos a 37°C y, posteriormente, se centrifugaron. Cada sobrenadante se descartó y las pastillas celulares fueron lavados dos veces con medio mínimo y finalmente resuspendidos en una décima parte del volumen de la mezcla de transducción. Entonces, se plaquearon estas suspensiones celulares en los medios selectivos.

TRANSFORMACIONES. Las transformaciones de E. coli se siguieron apegadas al protocolo señalado por Betlach et al (38). Inicialmente, se cultivaron las cepas a transformar en medio nutritivo, hasta alcanzar una densidad óptica de 30 u. Klett. Entonces, cada cultivo se sujetó a centrifugación y las pastillas celulares se lavaron con una solución de NaCl 10 mM, reuspendiendo finalmente en la mitad del volumen inicial de una solución de CaCl_2 30 mM, reposando las suspensiones en hielo, entre 20 y 30 minutos. Las células de E. coli tratadas con cloruro de calcio son más efectivas receptoras de DNA de plásmidos, probablemente porque dicha sal ocasiona cambios en la estructura de la pared celular, quizá necesarios para la captura del ácido nucleico (39).

Transcurrido el tratamiento con calcio, se concentró cada cultivo en una décima parte del volumen original (empleando la misma solución) y se puso en contacto con el DNA del plásmido en cuestión, durante 60 minutos por lo menos, a 0°C de temperatura. Aunque la eficiencia de transformación no es muy elevada, se ha calculado una eficiencia de 10^7 transformantes por microgramo de DNA,

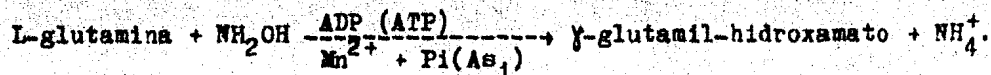
lo que representa la captura de sólo una molécula de DNA por cada un mil disponibles (39). Así, deben añadirse cantidades no menores de 1 µg de plásmido por cada transformación.

Después de incubadas las células en presencia del DNA transformante, se dió un pulso térmico de 42°C, durante setenta segundos, seguido de un reposo de algunos minutos en hielo. Posteriormente, se adicionó medio Luria a cada tubo de transformación y se incubaron a 37°C entre dos y tres horas. Después, se tomaron alícuotas de cada ensayo y se plaquearon en los medio selectivos deseados.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA GS. La GS es una enzima que además de catalizar la síntesis de glutamina, tiene la facultad de favorecer otras reacciones enzimáticas in vitro (3). Una de las reacciones que ha merecido especial atención es la denominada ensayo de la γ-glutamyl transferasa, dada su alta eficiencia y resolución. Así, esta reacción tiene la característica de convertir más del 99% del glutamato presente a γ-glutamyl-hidroxamato (3), empleando hidroxilamina en vez de amonio. Esta, es más precisa que la reacción biosintética, cuya eficiencia de producción de glutamina a partir de glutamato alcanza un máximo del 90%.

Dada esta ventaja resolutive, empleamos el ensayo de transferasa para detectar los niveles enzimáticos de la GS, y gracias a que en ausencia de iones magnesio se registra la actividad total, el ensayo reveló los máximos niveles enzimáticos detectables.

En la reacción de γ-glutamyl transferasa, empleando glutamina en vez de glutamato, cuyos efectos son idénticos, el grupo glutamilo de la L-glutamina es transferido a la hidroxilamina para formar γ-glutamyl-hidroxamato, según la siguiente reacción:



Para el ensayo enzimático, se utilizaron cultivos crecidos en medio mínimo con glucosa y la fuente nitrogenada deseada, glutamina (1 mg/ml) ó NH₄Cl (0.5 mM) para condiciones de inducción, o bien NH₄Cl 15 mM para reprimir la síntesis de la GS. La descripción de tallada de este ensayo está comunicada por Bender y colaboradores.

(37). Simplemente cabe destacar que la reacción química forma un complejo colorido con el cloruro férrico incluido en la mezcla para detener la reacción, cuya absorbancia a 540 nm de longitud de onda, colorimétricamente medible, refleja la cantidad de producto que se ha formado.

En términos generales, el ensayo se desarrollo de la siguiente manera. Se cultivaron las células en medio líquido bajo las condiciones deseadas, inoculando con cultivos crecidos en el mismo medio pero con anterioridad. Una vez alcanzada la fase logarítmica de crecimiento poblacional, aproximadamente 5×10^8 células/ml, se agregó una décima parte del volumen total de una solución de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) (1 mg/ml), para permeabilizar las células, en virtud de ser un detergente. Se incubaron los cultivos con el detergente tres minutos a 37°C y se lavaron las células con una solución al 1% de cloruro de potasio, resuspendiendo finalmente las pastillas celulares en una décima parte del volumen inicial. Con las suspensiones celulares se efectuó el ensayo a 37°C, a tiempos 0, 5 y 10 minutos, parando la reacción con la mezcla de detención, para luego centrifugar para sedimentar los elementos celulares y cuantificar la absorbancia de cada reacción en el espectrofotómetro. Simultáneamente, se determinó la concentración proteica siguiendo el método de Lowry (40), empleando albúmina sérica de bovino como estándar, y una vez obtenidos los datos se procesaron de la siguiente manera. Se efectuaron las sustracciones correspondientes a fin de establecer las unidades de absorbancia por minuto. Considerando que 1 μ mol de γ -glutamyl-hidroxamato absorbe 0.532 unidades, este valor se aplicó como divisor, el valor promedio de absorbancia de cada ensayo por minuto fungió como dividendo y el cociente de esta operación se dividió entre la concentración proteica determinada para cada caso. Así, el valor final se expresa en μ moles de γ -glutamyl-hidroxamato producido por minuto por miligramo de proteína celular.

PURIFICACION DE DNA CROMOSOMICO. La purificación de DNA cromosómico es un procedimiento relativamente rápido y sencillo. En términos globales, el método usado consistió en lo siguiente. Se cultivó la cepa o cepas en cuestión en medio Luria (1 lt) durante

16-18 horas. Posteriormente, se centrifugaron los cultivos y las células colectadas se resuspendieron en una centésima parte del volumen inicial, en una solución que contiene sacarosa (25%), Tris-HCl (50 mM) y EDTA (1 mM). En seguida se agregó lisozima (5 mg/lt de cultivo) y RNasa (1 mg/lt de cultivo) y se dejó reposar 15 minutos en hielo. Cubierto este lapso de tiempo, se agregó mezcla lítica de tritón (3 ml/lt de cultivo), se dejó 15 minutos en hielo y se centrifugaron los cultivos. Cada sedimento celular se resuspendió en una solución amortiguadora (Tris 0.5 M, EDTA 20 mM y SDS 5% a pH 7.5) e inmediatamente se agregó proteinasa K (5 mg/lt de cultivo) y se incubó la mezcla a 37°C durante 60 minutos. Concluido este paso, se procedió a efectuar la extracción con fenol-cloroformo, a fin de remover las proteínas de la solución de ácidos nucleicos (41). Para esto, se emplearon dos volúmenes de una mezcla conteniendo fenol, cloroformo y alcohol isoamílico, en proporción 25:25:1, respectivamente. Una vez adicionada la mezcla de extracción, se agitó cuidadosamente cada lisado celular hasta que se formó una emulsión. Luego se centrifugaron durante algunos minutos para separar nítidamente las fases acuosa e hidrofóbica, se removió la primera, que es la superior, y se repitió con ella la operación extractiva. Finalmente, se agregaron dos volúmenes de etanol frío y una vigésima quinta parte de solución de cloruro de sodio 5 M. Se dejó precipitando el DNA a -20°C durante 12 horas, más o menos. Después, se centrifugaron las muestras y el sedimento se resuspendió en solución amortiguadora TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH 8).

Una vez purificado el DNA cromosómico, se cuantificó siguiendo el método espectrofotométrico de determinación, que se basa en la propiedad intrínseca de las soluciones de ácidos nucleicos de absorber luz ultravioleta de 260 nm de longitud de onda, de tal precisión que 50 µg/ml de DNA de doble cadena corresponden a una unidad de densidad óptica. Además, el cociente entre las lecturas a 260 y 280 nm de longitud de onda (OD_{260}/OD_{280}) proporcionan un estimado de la pureza del ácido nucleico en cuestión. Las preparaciones puras de DNA tienen un valor de 1.8 o más, en tanto que los valores menores son indicativos del grado de contaminación proteica o fenólica (41).

HIBRIDIZACIONES EN FILTROS DE NITROCELULOSA (SOUTHERN). La técnica descrita por Southern (42), para transferir fragmentos de DNA de geles de agarosa o poliacrilamida a filtros de nitrocelulosa, para posteriormente ser hibridizado con DNA marcado radiativamente y detectar los fragmentos que hibridizan por autorradiografía, constituye una metodología adecuada para mapear inserciones transposónicas en regiones genéticamente conocidas.

A "grosso modo", el método seguido consistió en lo siguiente. Una vez purificado el DNA cromosómico y digerido con endonucleasas de restricción, se corrió una electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, según el caso de que se haya tratado. Cuando los fragmentos generados por la digestión enzimática son muy pequeños, es recomendable utilizar poliacrilamida, generalmente utilizado para separar fragmentos menores de un mil pares de bases de longitud. Sin embargo, los geles de agarosa tienen un amplio espectro de resolución, ya que su eficiencia de separación de moléculas lineales de DNA abarca desde 0.1 hasta 60 kilobases de longitud (41), dependiendo del porcentaje de agarosa en el gel.

Inicialmente, se digirió el DNA cromosómico con la endonucleasa de restricción Hinf I y el gel utilizado fue de poliacrilamida al 7.5% de concentración. Las digestiones enzimáticas posteriores se efectuaron con Pst I, empleándose a su vez geles de agarosa al 1%, con una capacidad resolutive entre 7 y 0.4 Kb de longitud de DNA lineal, según una estimación aproximada.

Inmediatamente después de efectuada la electroforesis correspondiente, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se trató durante 30 minutos con una solución de NaCl 1 M y NaOH 0.5 M, para desnaturar el DNA contenido en el gel. A continuación, se neutralizó el gel tratándolo durante 20 minutos y repitiéndolo una vez más, en una solución de Tris-HCl 0.5 M (pH 7.0) y NaCl 3 M. Posteriormente, se depositó el gel sobre una pieza de papel Whatman 3MM dispuesto sobre la superficie de un vidrio plano soportado por una base. El papel Whatman, inferior al gel, formó un puente que comunicaba con una solución SSC 20X (SSC es 0.15 M de NaCl y Citrato de sodio 0.015 M), contenida en el recipiente en el cual se mantuvo la base, parcialmente inmersa. Sobre el gel se aplicó una pieza,

cortada precisamente, de papel filtro de nitrocelulosa Scheicher & Schuell BA85, previamente bañada con solución SSC 6X. Sobre éste, se depositó otra pieza de papel Whatman, cubriendo completamente el filtro de nitrocelulosa, y encima se apilaron toallas de papel suficientes para alcanzar una altura de entre 5 y 8 cm. Se coronó este apilamiento con un vidrio plano sobre el cual se depositó un objeto pesado, de aproximadamente 500 gramos. Se permitió que la transferencia procediera por más o menos 48 horas y, transcurrido este tiempo, se secó el filtro en un horno a 80°C de temperatura, con vacío y por lo menos durante 4 horas, para fijar el DNA al filtro.

El siguiente paso fue efectuar la hibridización, para lo cual se introdujo el filtro de nitrocelulosa en una bolsa de polietileno, en presencia de una solución expofeso para facilitar la hibridización (41), que entre sus componentes cuenta con el 50% del volumen total de formamida. Se sabe que a esta concentración, permite el apareamiento de bases en secuencias que tengan únicamente entre el 10 y el 12% de desigualdad. Previa a la hibridización con el DNA marcado radiactivamente, se hizo una prehibridización con DNA inespecífico, en cuyo caso se empleó DNA de timo de ternera, que se incubó a 37°C durante 12 horas, más o menos. Posteriormente, se removió la solución utilizada en la prehibridización y se substituyó por nueva, además, de haberse agregado el DNA radiactivo ($\sim 2 \times 10^6$ opm) denaturalizado. Se incubó durante dos días a 37°C con agitación lenta y, una vez concluido este paso, se lavó el filtro para quitar los excedentes de radiactividad, como lo indica Maniatis en su manual de laboratorio (41). Después se secó el filtro de nitrocelulosa y se aplicó a una película de rayos X para obtener una imagen autorradiográfica. Finalmente, se reveló la película y se analizaron los patrones de hibridización.

PURIFICACION DE DNA DE PLASMIDO Y ANALISIS CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCION. La purificación del plásmido pACR82, subclonación in vivo de la mutación glnL82::Tn5 en el plásmido pACR1, se llevó a cabo siguiendo el método de Bettsch et al (38), y consistió en cultivar la cepa MX960 en medio mínimo M9 (35) hasta una concentra

ción aproximada de 5×10^8 células/ml. Entonces, se añadió cloranfenicol (200 mg/lt de cultivo) a fin de promover la amplificación del número de copias del plásmido por célula (34), y se incubó el cultivo a 37°C con agitación durante 16 horas. Después, una vez colectadas las células por centrifugación y lisadas por efecto de la lizosima (5 mg/lt) y el Tritón X-100, nuevamente se sujetó la suspensión celular a centrifugación, y se conservó el sobrenadante. Este, se sometió a la mencionada extracción con fenol y cloroformo, pero prescindiéndose del alcohol isoamílico, en forma similar al tratamiento descrito para purificar DNA cromosómico. La extracción se efectuó seguida de la precipitación con etanol frío durante 12 horas aproximadamente, empero, se excluyó la presencia de la sal sódica. Una vez concentrada la solución con DNA de plásmido, se pasó a través de una columna de agarosa A-50, para separar el plásmido del DNA cromosómico contaminante. Se colectaron fracciones y se determinó la presencia del plásmido espectrofotométricamente, como ya se indicó.

Para análisis rápidos de plásmido, se empleó una técnica muy sencilla que permite detectar y purificar pequeñas cantidades de plásmido a partir de cultivos pequeños. Este microensayo se siguió según el protocolo de Holmes y Quigley (43) con alguna sugerencias de Garcíarrubio (comunicación personal).

Las endonucleasas de restricción empleadas fueron amablemente proporcionadas por Alejandra Covarrubias. Todas fueron preparadas siguiendo los lineamientos de Greene et al (44) con excepción de Sma I, que fué adquirida en los Bethesda Research Labs. Las condiciones de reacción que se siguieron han sido previamente comunicadas (45). Simplemente cabe añadir que fueron incubadas a 37°C, excepto las digestiones con Pst I que se efectuaron a 30°C durante el tiempo requerido en función de la actividad enzimática. Las reacciones se detuvieron agregando una solución que contenía urea 10 mM, cianol de xileno 0.05% y azul de bromofenol 0.05%.

ELECTROFORESIS DEL DNA. La electroforesis en geles de agarosa es un método convencional para separar e identificar fragmentos de

DNA. Una característica muy importante de este método es que la tasa de migración de las moléculas es inversamente proporcional a los logaritmos de sus pesos moleculares, de modo que es factible calcular el peso molecular aproximado de los fragmentos de DNA sujetos a este proceso. Además, utilizando bromuro de etidio, un colorante fluorescente que se intercala con el DNA, pueden detectarse cantidades tan pequeñas como 0.05 μ g de DNA examinando los geles a la luz ultravioleta (39).

Los geles utilizados fueron al 1% de agarosa en solución amortiguadora TBE (Tris base 90 mM, EDTA 2.5 mM y H_3BO_3 90 mM, pH 8.2). La electroforesis se llevó a cabo en un dispositivo para geles tabulares verticales, corriéndose a 150 voltios y se sujetó el tiempo a la distancia que debía recorrer cada muestra. Una vez concluida la electroforesis, después de haber teñido los geles, cuando ameritó el caso se fotografiaron utilizando un filtro amarillo número 9 Kodak Wratten y película Polaroid Np 55, con una cámara MP-5 Polaroid.

REACTIVOS. Todos los aminoácidos y vitaminas empleados, incluyendo la L-metionina-DL-sulfoximina (MS), fueron de Sigma Chem., Co. El marcaje radiactivo del DNA del plásmido pACR2, se efectuó mediante el procedimiento de incorporación de $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{dCTP}$ in vitro (nick translation), diseñado por Amersham International. Todos los reactivos se utilizaron en grado analítico.

ANTECEDENTES

Previo al presente trabajo, en nuestro laboratorio se aislaron cepas mutantes de E. coli que portaban inserciones del transposón Tn5 en la vecindad del locus glnA. En términos globales, éstas se obtuvieron de la siguiente manera: empleando un bacteriófago lambda modificado, λkan2, que lleva un Tn5 en su genoma, se infectó la cepa MX615, que lleva una delección del sitio cromosómico de unión de lambda, de modo que la integración del genoma viral en el cromosoma bacteriano, probablemente, ocurre en numerosos sitios que presenten cierta similitud con el sitio natural de unión. Posteriormente, por efecto de la temperatura, se indujo la escisión del genoma de lambda, abriéndose la posibilidad de que escisiones imprecisas o transposiciones del Tn5, dejaran transposones insertados, dispersos en el genoma bacteriano. Así, seleccionando aquellas mutantes que fueron resistentes al antibiótico kanamicina, propiedad conferida por la expresión de un gene transposónico (46), se obtuvieron cepas que llevan en su cromosoma al transposón funcional. Ulteriormente, se propagó el bacteriófago P1 virA en estas mutantes y se utilizó como vector de transducción para infectar a una cepa portadora del alelo glnA71::Tn5, seleccionando aquellas recombinantes que fueron protótrofas de glutamina (Gln⁺) y resistentes a la kanamicina (Km^r), garantizándose así que las inserciones estuvieran ligadas al gene estructural de la GS, por lo menos dentro del espacio génico que es capaz de transportar el fago P1, esto es, que la partícula viral puede portar DNA de 100 kilobases (kb) de longitud, y considerando que el cromosoma de E. coli comprende más o menos 4000 kb, el bacteriófago puede acarrear una fracción cromosómica correspondiente al 2.5% (47).

De estos experimentos, se aislaron 33 colonias transducentes independientes (Osorio, A., comunicación personal), gracias a las cuales se inició la búsqueda de las mutantes defectuosas en el gene glnL, como se describe en la siguiente sección.

RESULTADOS

SELECCION Y CARACTERIZACION DE LA CEPA MX960

Una vez aisladas las cepas transducentes $\text{Gln}^+ \text{Km}^r$, el paso inmediato fué caracterizarlas fenotípicamente y, con base en esto, seleccionar aquellas posibles candidatas a poseer la inserción del transposón en el gene glnL. Los caracteres fenotípicos que se utilizaron como criterio para dicha elección fueron los siguientes:

- i) Capacidad para utilizar arginina como única fuente de nitrógeno disponible en el medio (fenotipo Aut). Se sabe que algunas alteraciones en los genes glnL o glnG conducen a la incapacidad para utilizar este compuesto como fuente de nitrógeno (16, 17, 18, 21, 23, 24, 31 y 33).
- ii) Sensibilidad o resistencia a la L-metionina-DL-sulfoximina (MS). Según datos obtenidos en el laboratorio (48), mutantes defectuosas en glnG son hipersensibles a este compuesto, análogo de la glutamina, en contraste con cepas silvestres que son resistentes a una concentración 80 μM de MS. Considerando que dicho análogo de la glutamina inhibe irreversiblemente a la GS, conjeturamos que si existían mutaciones en glnL que disminuyeran la expresión de glnA, estas resultarían, posiblemente, hipersensibles a la MS. Así, dado que mutaciones en glnG confieren hipersensibilidad a este compuesto, por simple analogía supusimos que las mutaciones en glnL quizás tuvieran el mismo efecto. Para esas fechas no teníamos conocimiento de que el fenotipo Gln^c fuera causado por alteraciones en la estructura del cistron glnL.
- iii) Niveles de actividad enzimática de la GS. Era de esperarse que la actividad de transferasa de la GS, como espejo de los niveles de expresión de glnA, estuviera alterado en las mutantes defectuosas en glnL, salvo que éste no participara en la regulación de la síntesis de la GS. De modo que, pensamos, si las mutaciones en glnL perturban el control normal de la GS, es posible detectar cambios en los patrones de actividad catalítica, quizá diferentes aun de las mutantes afectadas en glnG. Esperábamos detectar alteraciones en las actividades, distinguibles de las mutantes lesionadas

en el locus glnG. Sin embargo, esto no lo sabíamos, como ya se indicó previamente, se ignoraban las propiedades de las mutaciones en glnL.

Inicialmente se determinó en cada una de las cepas mutantes su capacidad para utilizar arginina como fuente de nitrógeno, y su respuesta ante la presencia de L-metionina-DL-sulfoximina en el medio. Para esto, simplemente se observó cualitativamente si cada una de las cepas en cuestión fue capaz de crecer en medio mínimo con glucosa y arginina (0.2%) y en medio mínimo con glucosa y amonio 15 mM, en presencia de 80 μ M de MS. El primer medio fue para determinar el fenotipo Aut y el segundo para detectar sensibilidad o resistencia a la MS.

De las 33 cepas inicialmente analizadas mediante esta sencilla prueba, se eligieron diez que notoriamente fueron incapaces de utilizar arginina como fuente de nitrógeno y, concomitantemente, fueron hipersensibles a la MS (ver tabla 1). Cabe aclarar, que estas mutantes se seleccionaron portando a la región de glnA-glnG incluyendo la inserción del transposón en el episoma F'14. Sabiendo esto, se intentó efectuar una conjugación utilizando como receptora una cepa que lleva una delección que comprende desde glnA hasta glnG inclusive, la MX850, aislada y caracterizada en el laboratorio (Servín, L., datos no publicados). Sin embargo, no se logró este fin, suponemos que probablemente porque las cepas donadoras tuvieran dañada alguna función que participa en el mecanismo de conjugación, por lo que se optó por transducir la región portadora del transposón a una cepa silvestre, seleccionando resistencia a la kanamicina. De este modo, ya contábamos con las inserciones en el cromosoma.

A las cepas transducentes, ahora portadoras de las mutaciones en cromosoma, se les corroboró los fenotipos Aut⁻ MS^S y se les determinó actividad transferasa total de la GS, con la finalidad de obtener datos que nos ayudaran a discriminar, por lo menos hipotéticamente, sobre las posibles localizaciones de los transposones en el genoma bacteriano. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 2.

TABLA 1. Caracteres fenotípicos de las cepas que portan inserciones del transposón Tn5 en la vecindad del gene glnA.

No. total de cepas	No. de cepas con fenotipo Aut ⁺	No. de cepas con fenotipo Aut ⁻	No. de cepas con fenotipo MS ^s	No. de cepas con fenotipo MS ^r	No. de cepas con fenotipo Aut ⁻ MS ^s
33	23	10	33	0	10

TABLA 2. Actividad específica de la GS (ensayo de transferasa) en condiciones de abundancia y limitación de amonio en el medio.

CEPA	NH ₄ Cl, 15 mM	NH ₄ Cl, 0.5 mM
MX614 silvestre	0.250	1.514
MX614::Tn5 núm. 4	0.102	0.085
MX614::Tn5 núm. 6	0.095	0.104
MX614::Tn5 núm. 10	0.061	0.034
MX614::Tn5 núm. 12	0.114	0.652
MX614::Tn5 núm. 22	0.079	0.071
MX614::Tn5 núm. 30	0.083	0.077
MX614::Tn5 núm. 31	0.099	0.072
MX614::Tn5 núm. 33	0.090	0.072
MX614::Tn5 núm. 36	0.050	0.070

Las actividades enzimáticas están expresadas en μ moles de γ -glutamyl-hidroxamato formado por minuto por miligramo de proteína (μ mol/min/mg de proteína).

Como puede observarse en la tabla 2, las actividades de la mayoría de mutantes son bajas, tanto en condiciones de represión (NH_4Cl , 15 mM) como de inducción (NH_4Cl , 0.5 mM) de la GS, como cabría esperarse de mutantes afectadas en glnG. Empero, salta a la vista un caso, la cepa con el número 12, en que las actividades en condiciones de inducción son 5.7 veces mayor que en condiciones de represión. Aunque este comportamiento resulte extraño, también se antoja interesante y prometedor, y de hecho se consideró un buen candidato para analizar, contando con la esperanza de que la inserción del transposón Tn5 afectara a glnL.

Por sus características fenotípicas, la cepa MX614::Tn5 núm 12, denominada formalmente MX960, constituye una prueba obvia de que la inserción del Tn5 afecta alguno de los genes involucrados en el control de la síntesis de la GS, además de que la mutación está ligada al gene estructural de la enzima, por lo menos en la dimensión génica del cromosoma de E. coli que el bacteriófago P1 vira es capaz de transportar (~2.5% del genoma bacteriano, 47). Así, podemos pensar que la mutación no interfiere con glnG porque las actividades de la GS encontradas no reflejan una constitutividad baja, como la mencionada para este tipo de mutantes (16, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 31 y 32). Además, tampoco se asemeja a las actividades determinadas para una mutante por inserción de un transposón Tn5 en glnG, caracterizada en el laboratorio por Osorio et al (48), que presenta el típico carácter GlnR. Aunado a esto, comparando esta cepa (MX960) con las otras mutantes no caracterizadas, se observa que éstas últimas pudiesen corresponder en términos generales a mutaciones en glnG por sus fenotipos característicos, en cambio, la MX960 se sale del contexto fenotípico entonces conocido, al menos en lo que respecta a niveles enzimáticos. Sin embargo, una característica particular de esta cepa nos extrañaba: los niveles de actividad enzimática no se parecían en cuanto a su comportamiento a los datos que, en aquel entonces, aparecían por primera vez asignando niveles constitutivos altos (GlnC) a las mutantes lesionadas en glnL (ntrB). En contraste con estos resultados, nuestra cepa MX960, denotaba un patrón de actividades más bien bajo,

ero con cierta regulación parcial, especialmente patente en condiciones de inducción de la GS.

En virtud de que el fenotipo de la cepa MX960 resultaba extraño, no comparable con ninguna mutante conocida en esas fechas (18-19), se consideró interesante determinar la localización de la mutación y tratar de explicar de alguna manera su singular comportamiento fisiológico. Existía el riesgo de que la inserción del transposón no afectara a glnL y que se localizara en otro sitio que modificara la regulación normal de la GS, aun cuando de cualquier manera la mutación resultara interesante de analizar.

Uno de los primeros pasos para mapear una mutación, es determinar que tan ligada está a un locus conocido. En este caso nos interesaba conocer la cercanía del sitio de inserción del Tn5 con el gene glnA. Para esto, se determina la frecuencia con la que el bacteriófago P1 cotransduce la resistencia a la kanamicina conferida por el transposón, con la restitución de la prototrofia de glutamina lograda en una cepa receptora auxótrofa, lesionada en el gene glnA. Con esta finalidad, se propagó el fago P1 en la cepa MX960 y una vez obtenido el lisado se infectó una cepa receptora auxótrofa de glutamina (MX727), seleccionando aquellas recombinantes capaces de utilizar amonio como fuente de nitrógeno. En seguida, se picaron las colonias obtenidas y se parcharon en cajas de petri conteniendo medio mínimo con amonio y glucosa, en presencia o ausencia de kanamicina (30 µM). Se determinó el porcentaje de colonias que además de ser protótrofas de glutamina, fueron resistentes al antibiótico (ver tabla 3), encontrándose un 95% de cotransducción de los caracteres mencionados. Esto implica que la inserción transposónica se localiza estrechamente ligada al gene estructural, situándola probablemente en la región que comprende glnL y glnG o bien al otro lado de glnA. Sin embargo, esta última alternativa no se consideró muy viable ya que no existe ningún indicio que apunte en favor de la participación, en el metabolismo nitrogenado, de los genes situados en esta dirección (19). Asimismo, la mayoría de colonias transductantes de fenotipo Em^r fueron simultáneamente Aut^- , lo que apoya la tesis de que este fenotipo está íntimamente ligado a la naturaleza de la mutación.

Recapitulando hasta este punto, contábamos con una cepa mutante con fenotipo $\text{Aut}^- \text{MS}^S$ (ver fig. 2), actividad enzimática de la 3S baja pero parcialmente regulada, y con una frecuencia de cotransducción del transposón con glnA del 95% (ver tabla 4). Esta era nuestra candidata más prometedora de portar la mutación denominada, para ese entonces, gln-82::Tn5 en el gene glnL.

EVIDENCIAS GENÉTICAS

Para ese entonces, el grupo de Alejandra Covarrubias logró obtener un plásmido derivado del vehículo pBR322, que lleva la región que comprende glnG intacto, pero carente de glnA y glnL (28). Empleando este plásmido, podría transformarse la cepa MX960 y seleccionarse la presencia del plásmido en la bacteria a fin de efectuar un análisis que nos orientara sobre la posible localización del Tn5. Así, se efectuó la mencionada transformación seleccionando el crecimiento en medio mínimo con glucosa, cloruro de amonio 15 mM, kanamicina y ampicilina, ya que el plásmido lleva una región del vehículo de clonación que codifica para la β -lactamasa, una enzima que confiere resistencia a la ampicilina y antibióticos afines en las células que la producen (49). Se hizo la misma transformación sólo que empleando como receptora a la cepa MX913 (glnG 74::Tn5), con el fin de comparar ambos fenotipos de las transformantes. A las colonias obtenidas por transformación de ambas cepas, se les determinó el fenotipo Aut^- y se encontró que ambas, transformantes de la MX913 y de la MX960, fueron capaces de crecer en medio mínimo con arginina como única fuente de nitrógeno, lo que implica que la presencia del locus silvestre glnG en el plásmido es suficiente para restituir una facultad originalmente perdida en estas cepas a causa de las mutaciones en el operón glnALG. En un primer plano, parecerían indicar estos hechos que la mutación de la MX960 mapea en glnG, empero, tomando en cuenta las diferencias en lo que se refiere a niveles de actividad enzimática entre ambas cepas, se consideró prudente y conveniente examinar este fenotipo en las cepas transformadas. Para esto, una vez purificada una colonia transformada de la MX960 y una de la MX913, se sujeta-

TABLA 3. Mapeo de la mutación gln182::fn5 por transducción.

Donador de fago P1	Receptor	No. total de colonias seleccionadas	Marcadores analizados (no seleccionados)			
		Gln ⁺	Km ^r	Km ^s	MS ^s	
MX960 (<u>gln182::Tn5</u>)	MX727 (<u>glnA71::fn5</u>)	84	80	4	84	
			Aut	Aut		
			+	-	+	-
			4	76	2	2

TABLA 4. Caracterización fenotípica de la cepa MX960.

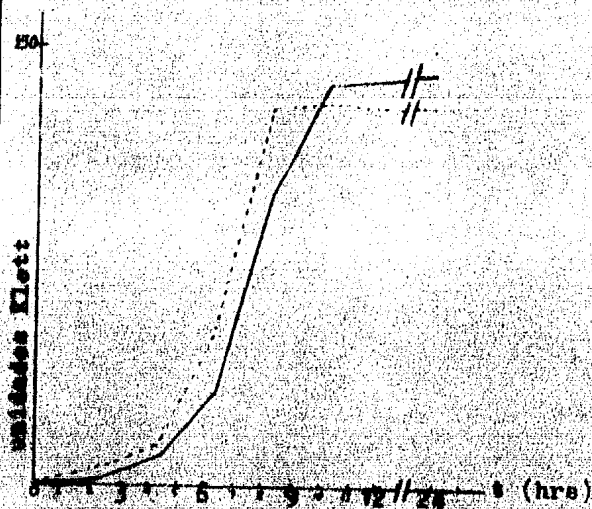
CEPA	Aut	MS	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA		NH ₄ Cl (0.5 mM)	FRECUENCIA DE REVERSION A MS ^S	FRECUENCIA DE REVERSION A Aut ⁺
			NH ₄ Cl (15 mM)	gln (1 mg/ml)			
MX960 (gln182::Tn5)	Aut ⁻	MS ^S	0.088	0.357	0.461	5.8 x 10 ⁻⁶	1 x 10 ⁻⁵
MX-14 (silvestre)	Aut ⁺	MS ^r	0.157	1.49	1.13	---	---

TABLA 3. Mapeo de la mutación glnL82::Tn5 por transducción.

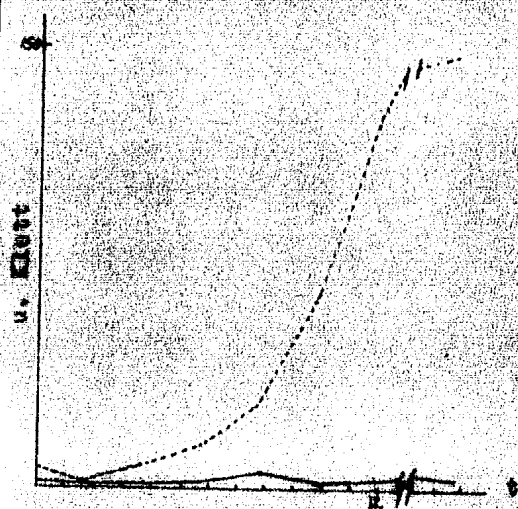
Donador de fago P1	Receptor	No. total de colonias seleccionadas	Marcadores analizados (no seleccionados)			
		<u>Gln</u> ⁺	<u>Km</u> ^r	<u>Km</u> ^s	<u>MS</u> ^s	
MX960	MX727	84	80	4	84	
(<u>glnL82::Tn5</u>)	(<u>glnA71::Tn5</u>)		Aut	Aut		
			+	-	+	-
			4	76	2	2

TABLA 4. Caracterización fenotípica de la cepa MX960.

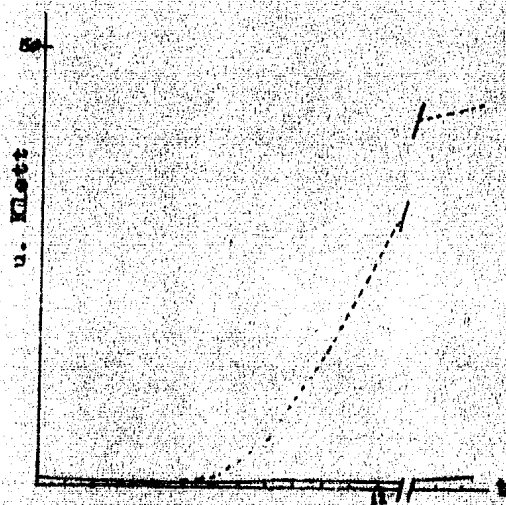
CEPA	Aut	MS	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA		FRECUENCIA DE REVERSION		FRECUENCIA DE REVERSION		
			NH ₄ Cl (15 mM)	gln (1 mg/ml)	NH ₄ Cl (0.5 mM)	A	MS ^s	A	Aut ⁺
MX960 (glnL82::Tn5)	Aut ⁻	MS ^s	0.088	0.357	0.461	5.8 x 10 ⁻⁶	1 x 10 ⁻⁵		
MXn14 (silvestre)	Aut ⁺	MS ^r	0.157	1.49	1.13	---	---		



(a) Medio mínimo suplementado con glucosa y NH_4Cl 15 mM.



(b) Medio mínimo suplementado con glucosa, NH_4Cl 15 mM y MS 80 μM .



(c) Medio mínimo suplementado con glucosa y con arginina al 0.2%, como fuente de nitrógeno

Figura 2. Curva de crecimiento de la cepa MX960, con

----- MX614

———— MX960

parandola con la cepa silvestre, MX614.

ron al ensayo enzimático de actividad de transferasa de la GS, y se encontró que la presencia del gene glnG⁺ en el plásmido, confirió expresión de niveles altos de actividad catalítica, a la cepa MX960 transformada, tanto en condiciones de abundancia como de limitación de nitrógeno en el medio. Este resultado contrasta con los obtenidos con la cepa MX913 transformada, que presenta un patrón de regulación de la GS casi silvestre, como era de esperarse (ver tabla 5).

Este hallazgo per se, encajó adecuadamente con la idea de que la inserción del Tn5 se localizara en glnL y tuviera efecto polar sobre la expresión de glnG, ya que la presencia de éste último en un plásmido multicopia, confiere el fenotipo GlnC a las células portadoras. Además, dicho fenotipo GlnC fue observado en mutantes defectuosas en glnL, pero no polares sobre glnG (2, 18, 19, 21, 22, 24 y 31), como se pudo constatar en el laboratorio cuando se aisló una mutación en glnL, aparentemente no polar sobre glnG (Segovia, L., datos no publicados). Sin embargo, ciertos datos de la cepa MX960 nos intrigaban, ya que según datos publicados (2, 21, 25, y 31) señalaron que las mutaciones en glnL polares, confieren un fenotipo muy similar al que es característico de las mutantes afectadas en glnG, es decir, tienen niveles de actividad bajos constitutivos, lo cual nuestra mutante (MX960) no exhibe. Así, asumimos la posición de que muy probablemente la inserción del transposón Tn5 efectivamente se localizaba en glnL, ejerciendo cierto efecto polar sobre la expresión de glnG, y que las actividades observadas tenían una explicación lógica, no contemplada tal vez en un modelo rígido y poco versátil, en el que se asume que la expresión del gene glnG, depende única y exclusivamente del promotor localizado en los inicios del cistron glnL. Empero, si la expresión de glnG no depende únicamente del promotor de glnL o glnA, entonces, una inserción con efecto polar, posiblemente, no tendría un efecto todo o nada, sino que sería parcial. Esto, permite especular que si existe cierta expresión de glnG, no a expensas de los promotores de glnA y glnL, probablemente sería responsable del efecto observado a nivel de actividad enzimática de la GS en la cepa MX960.

TABLA 5. Caracterización fenotípica de la mutación gln182::Tn5 en cepas con diferente constitución genética.

CEPA	FENOTIPO		ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GS ¹	
	Gln	MS	NH ₄ Cl, 15 mM	gln, 1 mg/ml
MX614	+	+	resistente	0.15
MX960	+	-	sensible	0.10
MX960/pACR3	+	+	resistente	1.97
MX960/pACR8	+	+	ND ²	0.13
MX913	+	-	sensible	0.04
MX913/pACR3	+	+	resistente	0.16
MX919/pACR1	+	+	resistente	0.43
MX919/pACR8?	+	+	ND	0.40
MX1019	+	+	resistente	1.50

¹ Las actividades de la GS se efectuaron mediante el ensayo de transferencia y están expresadas en pmoles de γ -glutamil-hidroxamato formado/min/mg de proteína.

² No determinado.

Por otra parte, deseabamos acumular más datos que apoyaran la suposición de que el transposón se incrustaba directamente en glnL, para lo cual tratamos de determinar las características reguladoras conferidas por la mutación gln-82::Tn5 en cepas con diferente constitución genética, y compararlas con los datos obtenidos en la cepa MX1019 (glnL83), poseedora de una mutación no polar (Segovia, L. y Osorio, A., comunicación personal).

Así, mediante la utilización de diversos plásmidos contruidos por el grupo de A. Covarrubias (28 y 34), y la propia subclonación in vivo de la mutación gln-82::Tn5, en el plásmido pACR1 (34 y 50), se transformaron cepas apropiadas y se les determinó actividad enzimática, tanto en condiciones de exceso como de limitación de nitrógeno en el medio. Los datos obtenidos aparecen en la tabla 5.

La información que puede inferirse de los datos que aparecen en la tabla 5, resulta interesante. Como ya se mencionó, la cepa transformada MX960/pACR3 ostenta actividades altas en ambas condiciones, de hecho puede observarse que de medio abundante en fuente nitrogenada a medio limitante, la actividad enzimática se incrementa únicamente 1.6 veces, en cambio, la cepa transformada MX913/pACR3 denota un aumento de aproximadamente 13 veces, bajo las mismas circunstancias. También destaca el hecho de que la cepa MX960/pACR8, que lleva en el plásmido los genes glnL y glnG intactos, presenta niveles de actividad de la GS que obedecen a un patrón regulador más o menos normal, lo que indica indirectamente que la restitución de la condición silvestre del gene glnL conduce a una respuesta reguladora apropiada a las condiciones de disponibilidad de nitrógeno en el medio. Sin embargo, el caso de la cepa MX919, que carece de la región glnA-glnG merced a una delección, en presencia del plásmido pACR1 que si lleva tal región, exhibe un patrón de actividades que se asemeja mucho al de la misma cepa, MX919, pero transformada con el plásmido pACR82, el portador de la mutación en cuestión. Esta similitud no es sencilla de confrontar, ya que se esperaría que existieran diferencias marcadas, en virtud de que en el plásmido pACR82, glnL está mutado. Pero, aunque pudiera parecer contradictorio con los argumentos que aquí se han esgrimido, es menester destacar un hecho observado en el laboratorio, y es

que en ocasiones la presencia del gene glnA en un plásmido multicopia tiene un comportamiento extraño, es decir, en muchas circunstancias no refleja fielmente el estado de regulación al que está sujeto en condiciones normales. Esto quizás se deba a que exista cierta síntesis de escape a nivel de glnA, o porque algún efector o efectores no estuviese en cantidades adecuadas para ejercer sus efectos a nivel de control de la transcripción de glnA. Otro hecho que llama la atención, es la existencia de represión en la cepa MX919/pACR82 (ver tabla 5), y es extraño porque si el supuesto represor, correpresor o antiactivador del sistema está ausente del producto de glnL entonces, queda la incógnita sobre qué factor ejerce tal represión. Porque si bien pudiera pensarse que el producto de glnG no activara por estar bajo el efecto polar de la mutación en glnL, no sería congruente que en condiciones limitantes de nitrógeno se obtuvieran tales actividades, 8.4 veces mayores que en condiciones de abundancia de amonio en el medio. Sin embargo, sería factible pensar que si glnG posee promotor propio, aunque fuera débil, podría ser funcional, particularmente si el gene se encuentra en muchas copias por célula, como sucede cuando es llevado por un plásmido. Además, quizás implicaría que dicho promotor, aún hipotético, sería efectivo sólo en condiciones limitantes de nitrógeno, o bien, también es permisible pensar que cierto efector no contemplado, v.g. la proteína reguladora P_{II} (consultar página 4) u otro, tuviera efecto negativo o de antiactivación sobre la expresión de glnA, en condiciones ricas en amonio en el medio. Sin duda, existen diversas alternativas que pudieran explicar este fenómeno, empero, aún se carecen de suficientes elementos de juicio. Lo que si es claro, es que globalmente todos los datos aquí expuestos apuntan hacia la hipótesis original de que la mutación gln-82::Tn5 tiene su asiento en el locus glnL.

Un resultado más que coincide en señalar que dicha mutación afecta a glnL, ejerciendo asimismo efecto polar sobre glnG, es el hecho de que la susodicha mutación suprime el fenotipo Aut⁺ que presentan las cepas mutadas en el gene gltB, el cistron estructural de la enzima glutamato sintasa (27), siempre y cuando esté

presente el plásmido pACR3 en esta cepa, de lo contrario la mutación gln-82::Tn5 no suprime dicho fenotipo. Incluso, esta propiedad de suprimir el fenotipo Aut^- de una cepa con el alelo gltB31 (27), mediante mutaciones en glnL, se utilizó para aislar la mutante MX1019, que lleva la mutación glnL83 en cromosoma, y aparentemente es no polar sobre la expresión de glnG, ya que no requiere de la presencia del plásmido para suprimir el fenotipo de utilización de arginina como fuente de nitrógeno.

EVIDENCIAS FISICAS

Pensemos que una forma más directa de mapear una mutación es mediante su caracterización física, aunque cabe señalar que para este caso, ésta sólo aporta la prueba fehaciente de lo que genéticamente ya se conoce o por lo menos se sospecha.

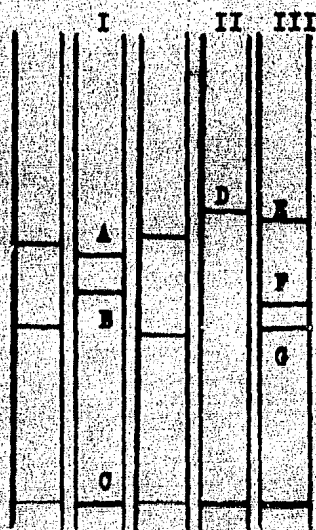
El primer enfoque que empleamos fué la técnica de hibridización en filtros de nitrato de celulosa, siguiendo el protocolo de Southern (42), descrito en la sección de Materiales y Métodos.

Así, una vez purificado el DNA cromosómico de la cepa MX960 y digerido completamente con la endonucleasa de restricción Hinf I, se siguió la técnica, empleándose para hibridizar el plásmido pACR2 (51). Uno de los motivos por los cuales se utilizó este plásmido, fué porque contiene la región silvestre glnA, glnL y glnG, además de contener una mayor extensión del cromosoma de E. coli en dirección hacia glnG. Empero, este plásmido no se empleó para transformaciones ni para subclonar la mutación gln-82::Tn5, porque por alguna razón hasta ahora desconocida, éste es incapaz de complementar una mutación en glnA (Rocha, M., comunicación personal), quizás porque se presenta en muy alto número de copias por célula.

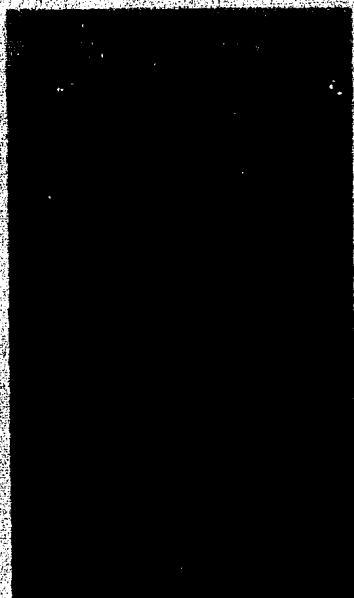
Al efectuar el análisis de bandas de hibridización, después de la autorradiografía respectiva, nos encontramos con resultados ambiguos, por lo cual repetimos una vez más el ensayo, pero ahora haciendo algunos cambios, uno de los cuales fué emplear la endonuclea

sa de restricción Pst I en vez de Hinf I. En esta ocasión, los resultados fueron congruentes con lo esperado, ya que el ensayo de hibridización observado, denotó cambios en el patrón y número de bandas de hibridización de la cepa mutante, en relación con los parámetros contemplados para el control. Los cambios detectados en la mutante, fueron coherentes con las predicciones efectuadas. Así, encontramos que la muestra correspondiente a la cepa silvestre (MX615), presenta dos bandas que hibridizan con fragmentos complementarios del DNA del plásmido marcado radiactivamente: una banda pesada de aproximadamente 4.8 megadaltones (md) de peso molecular, y otra ligera de más o menos 0.6 md. En la muestra correspondiente a la cepa mutante, sobresalen tres bandas claras: una correspondiente a la banda ligera encontrada en la muestra de la cepa silvestre, y dos bandas más pesadas de aproximadamente 2.61 y 2.05 md de peso molecular, respectivamente. La banda de 4.8 md encontrada en la muestra de la cepa silvestre, no se observa claramente en la mutante, lo que permite pensar que el segmento de DNA comprendido en ese fragmento se insertó el transposón, originando las dos bandas más ligeras que se pueden ver cuando el DNA fue cortado con la endonucleasa empleada. Sin embargo, dicho fragmento grande de 4.8 md, llega a observarse como una banda tenue en el carril electroforético correspondiente a la muestra de la mutante MX960, aunque posiblemente se deba a una contaminación accidental. Los patrones de hibridización y sus respectivos pesos moleculares asignados aparecen en la figura 3.

El cálculo de los pesos moleculares aproximados de las bandas de hibridización de interés, se efectuaron mediante una función que correlaciona el logaritmo del peso molecular versus la distancia recorrida por los fragmentos de DNA durante la electroforesis. Esta ecuación corresponde a una recta al graficar (ver figura 4). Asignando a las longitudes de migración de los fragmentos del plásmido pACR2, los valores de peso molecular ya conocidos, y utilizando estos datos como parámetros, se ajustó una recta mediante un programa estadístico ejecutado en una calculadora Texas TI55, de tal forma que el programa proporciona los valores de peso molecular de cada banda, en función de la distancia recorrida.



(a)



(b)

Figura 3. Patrón de hibridización en filtro de nitrocelulosa del DNA cromosómico de las cepas MX960 y MX615, y el plásmido pACR2 versus DNA del plásmido pACR2, marcado radiactivamente. (a) Sequena ilustrando las bandas de hibridización, cuyos pesos moleculares, expresados en megadaltones, son los siguientes: A, 3.06; B, 2.50; C, 0.60; D, 4.42; E, 4.80; F, 2.15; y G, 1.85. (b) Imagen autorradiográfica obtenida.

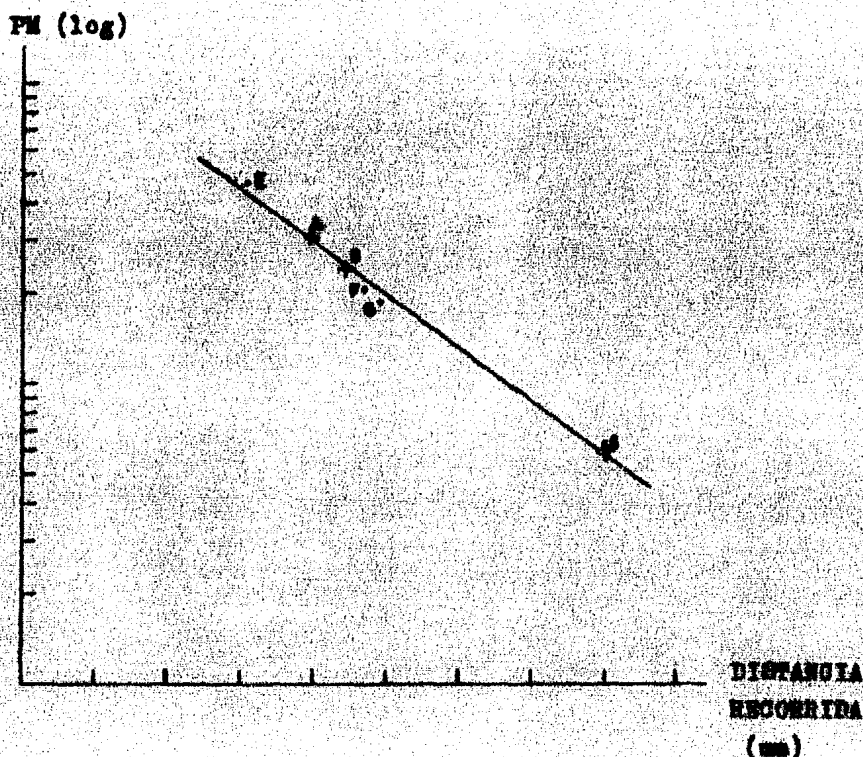


Figura 4. Gráfica que relaciona la distancia recorrida vs el logaritmo de los pesos moleculares de fragmentos de DNA cromosómico de la cepa MK960 y del plásmido pACR2, digeridos con la endonucleasa de restricción Pst I, sometidos a electroforesis e híbridosados contra DNA del pACR2, marcado radiactivamente. Símbolos: +, bandas de DNA de la cepa MK960; •, bandas de DNA del pACR2.

Por otra parte, si consideramos que el transposón Tn5 contiene cuatro sitios de restricción para la endonucleasa Pst I, es lógico pensar que al efectuar la digestión enzimática correspondiente, ciertos segmentos del DNA del Tn5 quedan incluidos en los fragmentos cromosómicos bacterianos contiguos, por lo que se hace necesario sustraer el valor del peso molecular aproximado de cada segmento, a los calculados en las bandas de hibridización. Para esto, utilizando el mapa genético de restricción del transposón Tn5 (52), se observa que existen dos sitios diametralmente opuestos de restricción para la enzima Pst I (ver figura 5), de tal forma que se encontrarían que los segmentos del Tn5 comprendidos desde donde se inicia la secuencia de cada IS, hasta el sitio inmediato próximo de restricción para la enzima empleada; quedarían adyacentes a los fragmentos cromosómicos que se formarían. Estos pequeños fragmentos son de aproximadamente 688 pb de longitud, cada uno, lo que arroja un peso molecular de cerca de 0.45 md, tomando como referencia el patrón establecido de equivalencia entre longitud del DNA bicatenario, dado en pares de bases, y peso molecular. Tal correspondencia asigna a 1,500 pb un peso molecular de 1 md en promedio (39).

En la figura 3, se observa que las bandas A y B de la cepa MX960, tienen adjudicados los pesos moleculares aproximados de 3.06 y 2.50 md, respectivamente. Estos valores, incluyen los segmentos transposónicos ya mencionados, por lo que fué menester sustraer el peso molecular de dichos segmentos para así obtener los valores reales de cada fragmento puramente cromosómico. El resultado final asigna los valores de 2.61 y 2.05 md a las bandas A y B, respectivamente. La suma de los pesos moleculares de estas bandas arroja un total de 4.66 md, muy aproximado al valor detectado experimentalmente (4.8 md), empero, resalta una pequeña diferencia (0.14 md) entre ambos valores, que se origina del hecho de que tales estimaciones son aproximadas, pero, consideramos, que los valores obtenidos son representativos dada la capacidad resolutive del sistema de análisis empleado.

Gracias a que el mapa de restricción del plásmido pAOR2 está dado en unidades longitudinales con su equivalencia en megadalto-

nes, es posible localizar el sitio donde la banda silvestre de 4.8 md es interrumpida por la presencia del transposón. Los sitios de Pst I que originan dicha banda, flanquean la región de glnA-glnG, de modo que encontramos dos formas de compaginar los fragmentos observados. Una forma situaría al fragmento de 2.05 md contiguo al sitio de Pst I que está cercano al locus glnG y, consecuentemente, el fragmento de 2.61 md se acomodaría entre el segmento anterior y el sitio de restricción aledaño a glnA. Este arreglo es el más probable, ya que sitúa al Tn5 insertado en glnL (ver figura 5), como lo apuntan las evidencias genéticas ya manifestadas. En cambio, una disposición inversa a la anterior, implicaría que el transposón se localizaría en el gene glnA, lo cual sabemos que no es posible, ya que dicho gene está intacto, por lo menos es estructuralmente hablando.

En virtud de que los genes glnL y glnG son colindantes, pensamos que pudiera existir cierta ambigüedad en el mapeo del sitio de inserción del transposón. Tal ambigüedad podría conducirnos a interpretaciones erróneas, por ejemplo, a determinar que la mutación mapea en glnL, cuando pudiese existir la posibilidad de que se localizara en la región intercistronica de glnL y glnG. Con base en esto, consideramos la alternativa de efectuar otro mapeo físico y con los datos obtenidos, aunados a los resultados del ensayo de hibridización tipo Southern, poder emitir una conclusión más certera sobre la localización de la mutación gln-82::Tn5. Así, pues, contando con la cooperación de Mario Rocha y Alejandra Covarrubias, emprendimos la labor de abordar una estrategia de mapeo físico más cómoda y manipulable. Esta consistió en disectar mediante enzimas de restricción, la región donde el transposón está insertado, subclonando previamente la mutación en un plásmido bien caracterizado como es el pACR1, que porta la región silvestre glnA-glnG.

Cabe mencionar que las evidencias genéticas y los resultados obtenidos mediante el análisis por hibridización, señalan favorablemente que el Tn5 se localiza en el gene glnL, sin embargo, quisimos aportar más evidencias que apoyaran estos resultados. Por eso empleamos una nueva estrategia de mapeo físico.

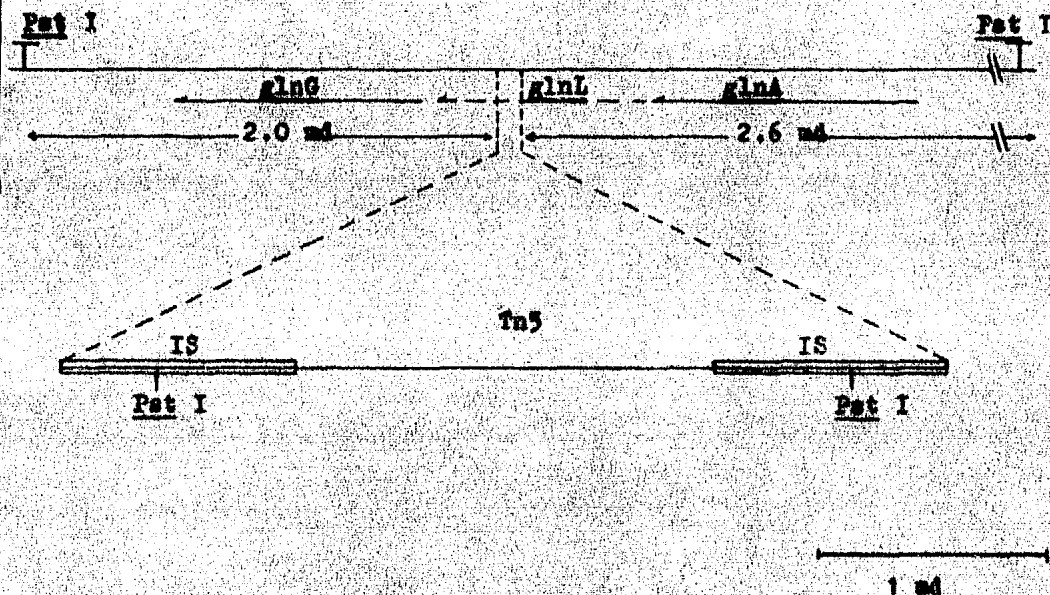


Figura 5. Mapa topográfico del sitio de inserción del Tn5 en el cromosoma de la cepa MX960, según los datos obtenidos mediante el análisis por hibridación de DNA en filtros de nitrocelulosa (Southern).

Una manera de clonar una mutación seleccionable, como lo es la inserción de un Tn5, es permitir que se lleve a cabo un proceso de recombinación génica natural y, simplemente, seleccionar la presencia del transposón en el plásmido. Para esto, empleamos la cepa MX919, que carece del operón glnALG, pero transformada con el plásmido pACR1, como receptora de la información genética proveniente de la cepa MX960, que por conducto del fago P1 vira, se transduce. Así, se seleccionaron aquellas recombinantes naturales, protótrofas de glutamina, que fueron resistentes a la kanamicina. Posteriormente, presuponiendo que en la mayoría de los casos hubo recombinaciones legítimas, se purificó plásmido de una poza de colonias transformadas, siguiendo el método rápido de Holmes y Quigley (43), y se utilizó para transformar a la cepa MX919, seleccionando aquellas transformantes con fenotipo $Gln^+ Km^r$. Así, se garantizó en buena medida que todas las colonias obtenidas se originaron por la captura del plásmido pACR1, portando la inserción del Tn5 funcional en su secuencia nucleotídica.

Una de estas transformantes se purificó y se sometió al microensayo para detectar la presencia del plásmido, el cual fue digerido con la endonucleasa Pst I y analizado mediante electroforesis. El resultado obtenido fue acorde con lo esperado, ya que se observaron ocho bandas de diferente peso molecular, en contraste con el plásmido silvestre que sólo presenta cuatro bandas. Se infiere que las cuatro bandas extras observadas en el plásmido pACR82, se deben a que el transposón presenta en su secuencia de nucleótidos cuatro sitios de restricción para la enzima utilizada. Con base en esto, se procedió a purificar el plásmido pACR82 en mayor escala, a fin de sujetarlo a las pruebas concertadas de digestión enzimática específica y patrón electroforético de los fragmentos generados. Así, se emplearon las siguientes digestiones enzimáticas: Bam HI, Bgl II, Sma I, Bam HI/Sma I y Bam HI/Bgl II. Se utilizaron estas enzimas porque tanto el plásmido como el transposón presentan pocos sitios de restricción para estas. Encontramos así, que el transposón Tn5 tiene un sitio de restricción para Bam HI, uno para Bgl II y tres de Sma I, y el plásmido pACR1 presenta dos sitios para Bam HI, uno para Bgl II y tres para Sma I. Esto, fa-

cilita el análisis por restricción. Una vez que se concluyeron las digestiones enzimáticas y efectuada la electroforesis correspondiente, se procedió a fotografiar los gels de agarosa y, obtenidas las fotografías, se amplificaron las imágenes aproximadamente 4.5 veces, para determinar la magnitud de las distancias recorridas por cada fragmento. Esto, con la finalidad de restar incertidumbre a las mediciones. Posteriormente, se procesaron los datos para calcular el peso molecular aproximado de cada banda electroforética, empleando un método algebraico establecido relativamente rápido y sencillo (53). Además, para calcular la distancia del transposón a los sitios de restricción del plásmido silvestre, se sustrajeron los valores de los segmentos transposónicos incluidos en los fragmentos observados mediante la electroforesis, de los valores calculados para cada banda, según fué el caso.

Lamentablemente, las digestiones efectuadas con el plásmido pACR1 como control, resultaron inadecuadas para el análisis por restricción y únicamente el ensayo con Sma I fué satisfactorio. Sin embargo, teóricamente puede inferirse el patrón y la magnitud de las bandas generadas por este plásmido, lo cual nos permitió analizar el patrón obtenido por el plásmido pACR82.

El mapa de restricción del plásmido pACR1, presenta únicamente un sitio de corte reconocible por la enzima Bgl II, de modo que solamente se genera una banda electroforética. En el pACR82, se observa un patrón de tres bandas (ver figura 6), una pesada de aproximadamente 14.8 md y dos ligeras de 1.78 y 1.75 md, cada una. La primera corresponde a un fragmento largo que abarca desde el sitio de Bgl II en la región de glnA, recorre casi todo el plásmido y termina en uno de los sitios de restricción del Tn5. La segunda banda equivale a un fragmento interno del transposón, y el fragmento más ligero, de 1.76 md, comprende desde uno de los sitios de restricción del Tn5 hasta el sitio localizado en glnA, en sentido inverso al fragmento mayor. A este último valor, se le resta el peso molecular calculado del segmento que comprende desde el sitio de Bgl II en el Tn5 hasta donde termina, cuyo valor es aproximadamente de 1.01 md de longitud. Así, se deduce que la secuencia del

transposón se inicia a 0.75 md de distancia del sitio de Bgl II en glnA, y tal punto se asienta sobre el locus glnL (fig. 7).

Por otra parte, la digestión del pACR82 con la enzima Sma I, muestra cuatro bandas de diferente peso molecular, dos de ellas correlativas a bandas esperadas para el plásmido silvestre, éstas son de 7.92 y 1.05 md, cada una; y las otras dos bandas son de 4.38 y 2.22 md, respectivamente. Dada la posición probable del transposón, es razonable pensar que la banda de 4.38 corresponda a un fragmento que abarque desde el sitio de restricción único en el transposón, hasta el sitio localizado en el vehículo Col E1 del plásmido, en tanto que la segunda banda comprendería del sitio del transposón hasta el sitio localizado en glnA. Como únicamente existe un sitio de Sma I en el Tn5, localizado asimétricamente, éste está situado proximal a glnA, como está ilustrado en la figura 7, ya que de la otra manera, no concuerda con los datos obtenidos. Además, se calculó que la distancia del sitio de restricción en glnA hasta donde se inserta el transposón, es de aproximadamente 0.54 md. Este valor, localizaría la inserción del Tn5 en glnL, en forma muy similar a lo obtenido con el análisis empleando Bgl II, donde se observa tan sólo una diferencia topográfica de 0.08 md. Asimismo, este resultado permitió determinar el sentido en el que está insertado el transposón en glnL, como se observa en la figura 7.

Los datos obtenidos con las digestiones del pACR82, empleando Bam HI, apuntan en favor de las interpretaciones efectuadas hasta ahora. Así, la digestión del plásmido pACR82 genera un patrón electroforético de tres bandas, de 9.78, 2.99 y 2.39 md, cada una. Examinando este patrón, es lógico pensar que la banda observada de 2.99 md corresponda a la banda calculada para el pACR1 de 3.10 md, y que la banda silvestre de 8.25 md fué dividida, por efecto de la inserción, en dos bandas nuevas. Al cotejar estos valores con los resultados anteriormente mencionados, que sitúan al sitio de Sma I del transposón proximal al punto de inicio de glnL, se encontró que el sitio único del transposón de Bam HI está situado distal a la zona donde el gene glnL inicia su expresión. La distancia calcu

lada del sitio de inserción transposónica, hasta el sitio de restricción para Bam HI en glnA es de 0.35 md (fig. 7).

Los resultados logrados mediante las dobles digestiones, localizan la mutación muy cercana a los sitios previamente señalados. Así, empleando la doble digestión Bam HI/Sma I se observan seis bandas electroforéticas, siendo la mayor, consecuencia probable de una digestión incompleta ya que no se esperaba; además de coincidir en peso molecular con la banda mayor generada por digestión exclusivamente con Bam HI. Sin embargo, aparecen bandas que resultan de cortar fragmentos de DNA contenidos dentro del transposón, como son el caso de las bandas de 4.11 md, que se origina porque Bam HI corta el fragmento de 4.38 md generado por digerir este plásmido únicamente con Sma I; y la banda de 2.03 md, que se deriva de que el fragmento producido por digestión con Bam HI exclusivamente, es cortado por Sma I. Sin embargo, este fragmento coincide con el peso esperado para ambos plásmidos, el pACR1 y el pACR82, por lo que no es discernible mediante este ensayo. La otra digestión doble, Bam HI/Bgl II, denota un patrón migratorio de cinco bandas, de las cuales las dos más pesadas coinciden con fragmentos calculados para el plásmido pACR1, y que no incluyen la región donde se inserta el transposón. Las restantes tres bandas se refieren a esta región y tienen un peso molecular de 1.53, 1.03 y 0.84 md, cada una. Las dos últimas bandas cotejan perfectamente con segmentos intratransposónicos de aproximadamente 1.03 y 0.79 md, según se calculó. En adición a esto, la banda de 1.53 md comprendería desde el sitio de Bam HI en glnA, hasta el sitio más próximo de Bgl II en el transposón. Sustrayéndole a este valor el correspondiente al segmento meramente transposónico, se obtiene un resultado que indica que la inserción está localizada a 0.52 md de distancia del sitio restrictivo Bam HI en glnA.

En conclusión, los mapeos por restricción con las enzimas empleadas, deslindan la inserción del Tn5 en glnL dentro de una zona de aproximadamente 0.17 md de extensión, comprendida en la mitad del gene que está proximal a glnA. Además, dada la orientación establecida en que el transposón está insertado, y confrontándolo

con el mapa de restricción del propio Tn5 (53), ha podido deducirse que el gene que codifica para la enzima aminoglucósido 3'-O-fosfotransferasa II, kan, responsable de la resistencia a antibióticos aminoglucosilados, tales como la kanamicina y neomicina (49); se expresa en el mismo sentido al que se transcribe glnA y al que debería tener glnL si estuviese intacto.

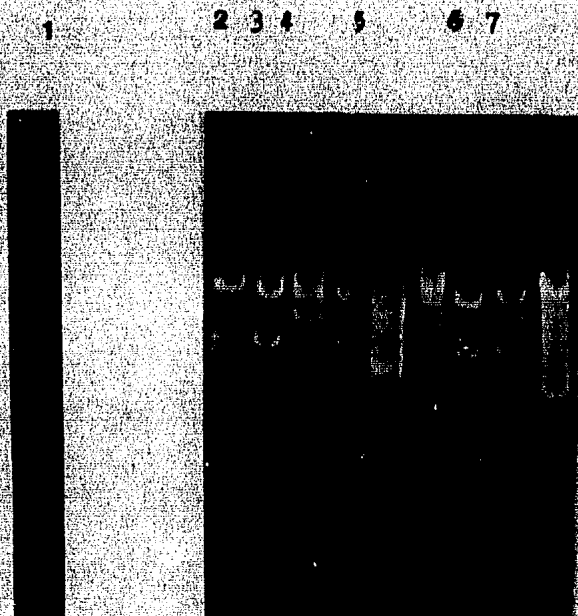
Recapitulando, la estrategia empleada para mapear la mutación gln-82:Tn5 mediante enzimas de restricción, arrojó resultados concordantes con los previamente obtenidos. Además, el grado de incertidumbre observado, alrededor de 0.17 md, se consideró que era realmente pequeño y prácticamente no infiltra ambigüedad en el mapeo, por lo que puede afirmarse tajantemente que el transposón Tn5 se inserta el gene glnL, imposibilitando su función reguladora.

I II III IV



(a). Electroforesis del pACR82 digerido con enzimas de restricción. I) marcador de peso molecular en megadaltones (de arriba abajo: 3.82, 2.15, 1.27 y 0.78); II) pACR82, Bam HI; III) pACR82, Bam HI/ Sma I; y IV) pACR82, Sma I.

Figura 6. Patrón de restricción del plásmido pACR82, subclonación in vivo de la mutación glnL82::Tn5 en el plásmido pACR1, logrado mediante digestión con endonucleasas de restricción (a y b).



(b). Electroforesis de los plásmidos pACR82 y pACR1 digeridos enzimáticamente. 1) marcadores de peso molecular en megadaltones (de arriba abajo: 13.7, 4.68, 3.56, 1.16, 0.77 y 0.72); 2) pACR82, Bam HI; 3) pACR1, Bam I; 4) pACR82, Sma I; 5) pACR82, Bam HI/Sma I; 6) pACR82, Bgl II/Bam HI; y 7) pACR 82, Bgl II.

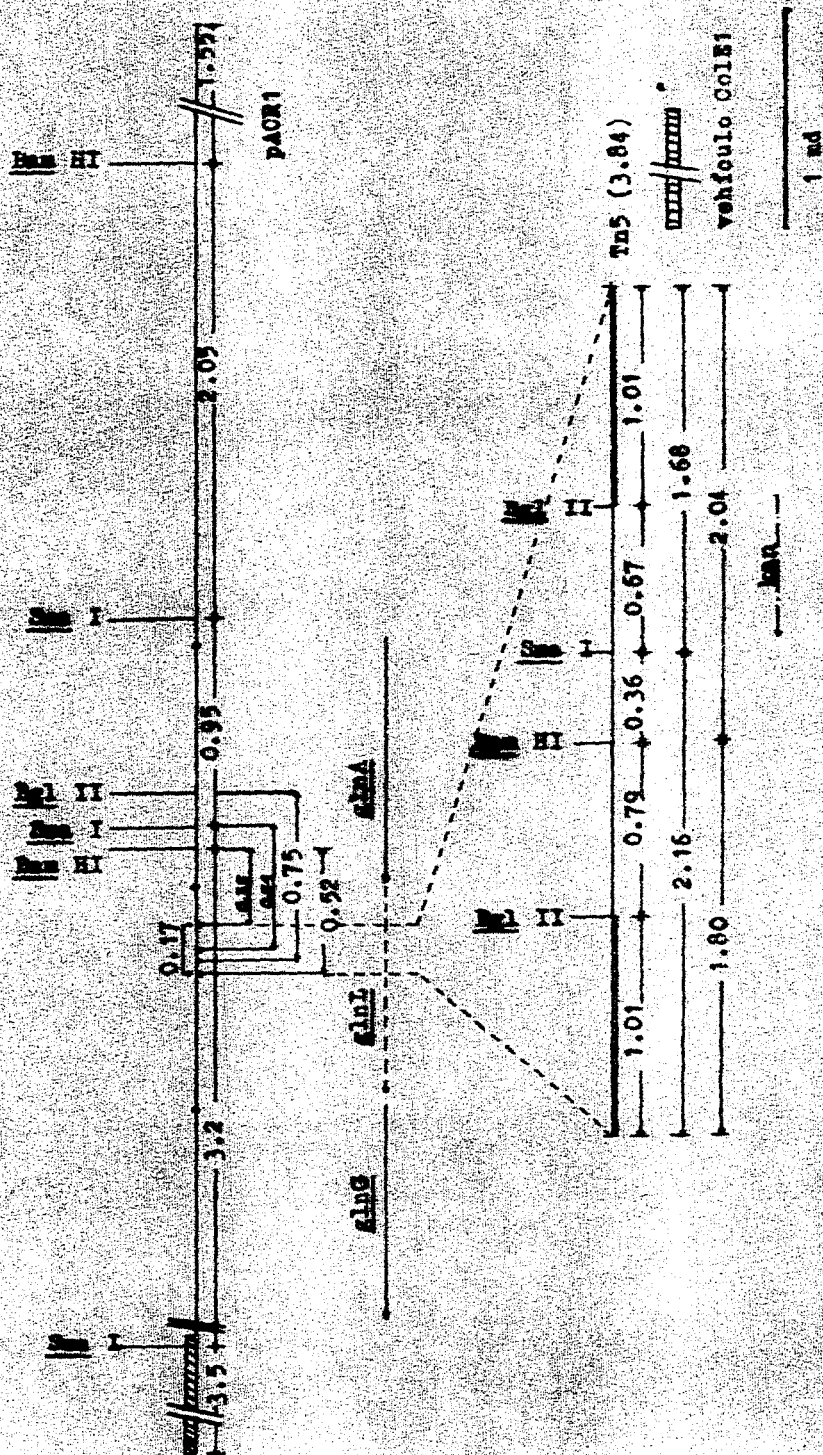


Figura 7. Mapa topográfico del sitio de intersección del Tn5 en el planisido PAOR1, deducido mediante el análisis por restricción. Las unidades están expresadas en megadaltonos (md).

DISCUSION

Los resultados presentados en términos globales se circunscriben a la caracterización genética y física de la ahora denominada mutación glnL82::Tn5. Sin embargo, es menester destacar algunos puntos y contrapuntos que, a nuestro juicio, ameritan señalarse. Uno de estos puntos se refiere al uso, en los primeros estadios del trabajo, del compuesto análogo de la glutamina, L-metionina-DL-sulfoximina (MS), como criterio de selección fenotípica de mutantes candidatas a estar afectadas en su gene glnL. El razonamiento esgrimido, fué que las mutaciones que alteran la regulación normal de la GS pudieran conferir hipersensibilidad a dicho compuesto químico, como es el caso de las mutantes defectuosas en glnG, aisladas y caracterizadas en el laboratorio (48). Con esta base, se infirió que posiblemente las mutaciones en glnL involucrarán sensibilidad a la MS, en contraste con cepas silvestres que son resistentes. Aunque esta suposición parece lógica, aún se carece de una plataforma teórica que fundamente o por lo menos trate de explicar la forma de actuar de dicha sustancia en relación al metabolismo nitrogenado. Además, sumado a este contrapunto, pensar llanamente que una alteración en glnL tendría consecuencias similares a una mutación en glnG, para este fenómeno, implicó asumir un enfoque estrecho sobre el modo de acción de ambos productos génicos, puesto que debía suponerse, como ahora se sabe, que la función de ambos es muy compleja, difieren notoriamente entre sí, y el alcance funcional y mutacional de ambos adquiere dimensiones muy diversas, dadas las características pleiotrópicas conferidas, por lo menos, por el producto de glnG. Posteriormente, nos dimos cuenta de esta laguna conceptual, cuando en el laboratorio se aisló una mutante defectuosa en glnL pero de carácter no polar, que exhibió un fenotipo MS^R (Segovia, L., datos no publicados). Sin embargo, afortunadamente la mutación glnL82::Tn5 es polar sobre la expresión de glnG, lo que trajo como consecuencia que la mutante MX960 fuera hipersensible a la MS. Este hecho nos permitió seguir la pista en el camino correcto. Empero, las dificultades que surgen al tratar de explicar la inferencia de la MS en las mutantes

defectuosas en glnG, se agudizan al tratar de encajonar en una hipótesis más o menos funcional, algunos datos recientemente logrados en el laboratorio (Osorio, A., et al, 48), donde se han aislado cepas portadoras de mutaciones que suprimen la hipersensibilidad a la MS, originada por mutaciones en glnG, y que mapean en la región de control de glnA, además de que confieren expresión de éste, independientemente de los productos de glnG y glnF. Aunque el mecanismo de acción de la MS se antoja muy complejo, numerosos esfuerzos se están poniendo en marcha para tratar de despejar esta incógnita, como son los estudios genéticos que tratan de deslindar los sitios genéticos que intervienen en la respuesta celular a la MS.

Otro punto que nos interesa tocar, es el relacionado al fenotipo Aut. Similar a lo anteriormente mencionado, la mayoría de mutantes afectadas en glnG son incapaces de utilizar arginina como fuente de nitrógeno, además de que las primeras mutantes defectuosas en glnL encontradas (18), también fueron Aut⁻. Sin embargo, la mutación en glnL no polar lograda en el laboratorio, faculta a la cepa portadora de ésta (MX1019) a utilizar eficazmente la arginina como única fuente de nitrógeno del medio. Acorde con esto, es razonable pensar que la incapacidad de la cepa MX960 de utilizar arginina, obedece únicamente al efecto polar ejercido sobre la expresión de glnG, como lo apunta el hecho de restituir el fenotipo Aut⁺ cuando esta mutante es transformada con un plásmido que lleva la región de glnG silvestre. Estos datos concuerdan con la sugerencia de algunos investigadores (25) en el sentido de que los incrementos en los niveles de expresión de glnG, suprimen el fenotipo Aut⁻ de las mutantes carente de la función de glnL. Así también, hay que tomar en cuenta los hechos que señalan (31) que ciertas mutaciones en glnL confieren incapacidad para utilizar arginina, mientras que otras no, argumento que sustenta la hipótesis de que cierta porción del producto de glnL interviene en la regulación de los sistemas de utilización de fuentes alternativas de nitrógeno. Esto explicaría el resultado obtenido con la mutante MX1019, aunque, no deben soslayarse las evidencias presentadas por Backman et al (33), quienes descartan la participación del producto de glnL en el control de los operones modulados por nitrógeno.

Cuando iniciamos el proyecto de buscar y caracterizar mutantes afectadas en glnL, únicamente teníamos información verbal de la existencia de este cistron, por lo que cualquier fenotipo asignado a mutaciones en este gene, era meramente especulativo. Así, se partió rastreando la pista de una mutación en glnL cuyas huellas no sabíamos qué forma tendrían, pero que sospechábamos que compartirían algunas semejanzas con las mutantes defectuosas en glnG. Conjeturamos que, en forma similar a estas últimas, las lesiones en glnL denotarían alteraciones en la regulación de la GS y quizás, incapacidad de utilizar arginina como única fuente nitrogenada. Además, supusimos que el patrón regulador de la GS, determinado a través de sus niveles enzimáticos, albergaría diferencias discernibles entre una mutante afectada en el locus glnL y otra defectuosa en glnG. Puesto que en esos días se ignoraba que ciertas mutantes en glnL tenían efecto polar sobre la expresión de glnG, originando el fenotipo epistático GlnR, seleccionamos a la cepa MX960 como posible candidata a poseer la inserción del transposón Tn5 en glnL. Con este punto de vista, iniciamos el estudio genético de la mutante, lo que culminó en la caracterización física y genética de la mutación glnL82::Tn5.

Desglosando someramente lo realizado, resulta claro que las evidencias genéticas acumuladas inducen a pensar que la mutación gln-82::Tn5 se localiza en glnL. En términos globales, los experimentos genéticos han arrojado resultados que concuerdan con esta hipótesis, y algunos de naturaleza confusa no refutan esta suposición, aunque exigen alguna explicación o por lo menos justificación. De la misma manera, las evidencias físicas confirman el hecho de que la mutante MX960 está afectada por la inserción del Tn5 a nivel del locus glnL. Incluso, existen razones muy fuertes para suponer que dicha mutación ejerce cierto efecto polar sobre la transcripción de glnG, que se supone (25, 26 y 30) se transcribe a partir de los promotores de glnA y glnL. Las razones que sustentan nuestra afirmación, estriban en los siguientes hechos: 1) a diferencia de una mutación en glnL no polar (glnL83) que confiere el fenotipo GlnC, es decir, actividades altas constitutivas de la

GS, nuestra mutante MX960 presenta actividades enzimáticas más bien bajas, aunque puede observarse un cierto patrón regulador en función de la disponibilidad de nitrógeno en el medio; 2) la presencia del gene glnG silvestre en un plásmido multicopia (pACR3) en la cepa MX960, permite una expresión alta constitutiva de glnA, además de restituir el fenotipo Aut^+ ; 3) la presencia del alelo glnL82::Tn5 en el cromosoma, conjugada con una cepa que donó la región episómica glnA⁺glnL⁺glnG74::Tn5, no confirmó a dicha merodiploide la facultad de utilizar arginina como fuente de nitrógeno (datos no mostrados); y 4) en general, las inserciones de transposones, particularmente el Tn5, exhiben efecto polar sobre la expresión de los genes contiguos, transcripcionalmente ligados (46).

Sin embargo, el fenotipo peculiar, en términos de actividad enzimática, observado en la cepa MX960 resulta novedoso y ciertamente no puede confrontarse adecuadamente con las mutantes defectuosas en glnL con efecto polar, conocidas (25 y 26). Resulta así, que nuestra mutante ostenta un comportamiento regulador que es menester explicar de alguna manera. Existen diversas formas de interpretar este fenómeno; una de ellas es asumir que existe un sitio regulador secundario -presumiblemente un promotor- localizado al principio del gene glnG, cuya expresión quizá débil, no esté sujeta a la que proviene de los promotores de glnA y glnL. Se nos ocurre, que tal promotor sea activo especialmente en condiciones limitantes de nitrógeno, ya que bajo estas circunstancias, la actividad catalítica de la GS se incrementa ostensiblemente, con respecto a las condiciones de represión, como pudimos observar en esta mutante. Quizás esta respuesta parcial aunque evidente a las condiciones restrictivas en nitrógeno, revelen cierta expresión baja del cistron glnG.

Esta hipótesis, demanda en primer lugar verificar si dicho promotor existe como tal. Aunque aún no se puede afirmar si existe esta secuencia al principio de glnG, en el laboratorio hemos logrado obtener algunos resultados que sugieren que glnG posee promotor propio, tales como el hecho de que el plásmido pACR3, que porta únicamente el gene glnG intacto, sea capaz de complementar una mutación cromosómica en el locus homólogo. En adición a esto, se han

aislado mutantes derivadas de la cepa MX960, que restituyen la facultad de utilizar arginina, amén de ostentar actividades altas constitutivas de la GS. Estas mutaciones (gln-85 y gln-86), independientemente, cotransducen en un 100% con la inserción del Tn5, para ambos fenotipos, Aut⁺ y GlnC (Urbina, J. C. y Bastarrachea, P., datos no publicados). Así, es factible pensar que dichas cepas (MX1029 y MX1030), además de la mutación en glnL, tienen afectada la región de glnG. Aunque intuitivamente pudiera sospecharse que tales mutaciones afectaran la zona de control del gene glnA y por ese motivo tener expresión constitutiva de éste, es, sin embargo, lógico pensar que dicha posibilidad es poco probable, ya que no explicaría el fenotipo Aut⁺ restituido. Obviamente, esto, bajo la consigna de que la participación de la GS en la célula es exclusivamente biosintética. Considerando esto, sólo resta suponer que esas mutaciones afectan la expresión de glnG, bien sea porque modifican la "fuerza" de su hipotético promotor, o porque pudieran haber originado promotores espontáneos en los inicios de glnG o bien a nivel de la secuencia transposónica. Actualmente, el proyecto para dilucidar si existe o no promotor en los inicios de glnG, está en curso y, aunque se encuentra en su fase inicial, esperamos contar lo más pronto posible con evidencias más sólidas que apoyen o debiliten esta hipótesis. Particularmente, confiamos en la existencia de un promotor en glnG, lo cual si resulta cierto quizás implicaría que el sistema glnA-glnL-glnG, obedece a una dinámica reguladora y fisiológica más sutil y compleja de lo que pensamos, ya que nos enfrentaríamos ante un operón constituido por dos genes reguladores y uno estructural, cada uno con promotor propio y modulado, posiblemente, en forma diversa.

Consideramos que, dada la importancia del metabolismo nitrogenado, la eficiencia y precisión con la que las células manejen tales recursos, son pilares fundamentales que permiten sostener el metabolismo bacteriano. Sin embargo, aun es largo el camino que tenemos que recorrer para aprender como Escherichia coli realiza esa tarea, lo cual a su vez, constituye un problema excitante para la investigación científica.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Tyler, B. 1978. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 1127-1162.
- (2) Magasanik, B. 1982. Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Ann. Rev. Genet.* 16: 135-168.
- (3) Meister, A. 1980. Catalytic mechanism of glutamine synthetase: overview of glutamine metabolism. En Mora, J. y Palacios, R. (ed.), *Glutamine: Metabolism, enzymology and regulation*. p. 1-40. Academic Press, N. Y., 334 p.
- (4) Ginsburg, A. y Stadtman, E. R. 1973. Regulation of glutamine synthetase in Escherichia coli. En Prusiner, S. y Stadtman, E. R. (ed.), *The enzymes of glutamine metabolism*. p. 9-42. Academic Press, N. Y., 615 p.
- (5) Stadtman, E. R., Mura, U., Boon Chock, P. y Goo Rhee, S. 1980. The interconvertible enzyme cascade that regulates glutamine synthetase activity. En Mora, J. y Palacios, R. (ed.), *Glutamine: Metabolism, enzymology and regulation*. p. 41-59. Academic Press, N. Y., 334 p.
- (6) Senior, P. J. 1975. Regulation of nitrogen metabolism in Escherichia coli and Klebsiella aerogenes: studies with continuous culture technique. *J. Bacteriol.* 123: 407-418.
- (7) Waglenski, P. y Tyler, B. 1977. Regulation of glnA messenger ribonucleic acid synthesis in Klebsiella aerogenes. *J. Bacteriol.* 129: 880-887.
- (8) Deleo, A. B. y Magasanik, B. 1975. Identification of the structural gene for glutamine synthetase in Klebsiella aerogenes. *J. Bacteriol.* 121: 313-319.
- (9) Streicher, S. L., Bender, R. A. y Magasanik, B. 1975. Genetic control of glutamine synthetase in Klebsiella aerogenes. *J. Bacteriol.* 121: 320-331.
- (10) Bender, R. A. y Magasanik, B. 1977. Regulatory mutations in the Klebsiella aerogenes structural gene for glutamine synthetase. *J. Bacteriol.* 132: 100-105.

- (11) Janssen, K. A. y Magasanik, B. 1977. Autogenous regulation of the synthesis of glutamine synthetase of Klebsiella aerogenes. J. Bacteriol. 132: 106-112.
- (12) Bender, R. A. y Magasanik, B. 1977. Glutamine synthetase of Klebsiella aerogenes; genetic and physiological properties of mutants in adenilation system. J. Bacteriol. 129: 990-1000.
- (13) Garcia, E., Bancroft, S., Goo Ree, S. y Kustu, S. 1977. The product of a newly identified gene, glnF, is required for synthesis of glutamine synthetase in Salmonella. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 1662-1666.
- (14) Castaño, I. B. 1983. Estudio de la regulación de la expresión del gene glnF de Escherichia coli utilizando fusiones de su promotor con los genes estructurales del operón lac. Tesis profesional, U.A.C.P. y P. del C.C.H., U.N.A.M. 56 p.
- (15) Casadaban, M. J. y Cohen, S. N. 1979. Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: in vivo probe for transcriptional control sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 4530-4533.
- (16) Pahel, G. y Tyler, B. 1979. A new glnA-linked regulatory gene for glutamine synthetase in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 4544-4548.
- (17) Kustu, S., Burton, D., Garcia, E., McCarter, L. y McFarland, N. 1979. Nitrogen control in Salmonella: regulation by the glnR and glnF gene products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 4576-4580.
- (18) McFarland, N., McCarter, L., Artz, S. y Kustu, S. 1981. Nitrogen regulatory locus glnR of enteric bacteria is composed of cistrons ntxB and ntxC: identification of their protein products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 2135-2139.
- (19) Backman, K., Chen, Y. M., y Magasanik, B. 1981. Physical and genetic characterization of the glnA-glnG region of the Escherichia coli chromosome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 3743-3747.

- (20) Bruijn, F. J. y Ausubel, F. M. 1981. The cloning and transposon Tn5 mutagenesis of the glnA region of Klebsiella pneumoniae: identification of glnK, a gene involved in the regulation of nif and hut operons. Mol. Gen. Genet. 183: 289-297.
- (21) Pahel, G., Rothstein, D. M. y Magasanik, B. 1982. Complex glnA-glnL-glnG operon of Escherichia coli. J. Bacteriol. 150: 202-213.
- (22) Chen, Y. M., Backman, K. y Magasanik, B. 1982. Characterization of a gene, glnL, the product of which is involved in the regulation of nitrogen utilization in Escherichia coli. J. Bacteriol. 150: 214-220.
- (23) Rothman, N., Rothstein, D., Foor, F. y Magasanik, B. 1982. The role of glnA-linked genes in regulation of glutamine synthetase and histidase formation in Klebsiella aerogenes. J. Bacteriol. 150: 214-220.
- (24) MacNeil, T., MacNeil, D. y Tyler, B. 1982. Fine-structure deletion map and complementation analysis of the glnA-glnL-glnG region in Escherichia coli. J. Bacteriol. 150: 1302-1313.
- (25) Guterman, S. K., Roberts, G. y Tyler, B. 1982. Polarity in the glnA operon: suppression of the Reg⁻ phenotype by rho mutations. J. Bacteriol. 150: 1314-1321.
- (26) Goldie, H. y Magasanik, B. 1982. Effects of glnL and other regulatory loci on regulation of transcription of glnA-lacZ fusions in Klebsiella aerogenes. J. Bacteriol. 150: 231-238.
- (27) Pahel, G., Zelenetz, A. D. y Tyler, B. 1978. gltB gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in Escherichia coli. J. Bacteriol. 133: 138-148.
- (28) Covarrubias, A. A. y Bastarrachea, F. 1983. Nucleotide sequence of the glnA control region of Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 190: 171-175.
- (29) Foor, F., Reuveny, Z. y Magasanik, B. 1980. Regulation of the synthesis of the glutamine synthetase by the P_{II} protein in Klebsiella aerogenes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 2636-2640.

- (30) Ueno-Nishio, S., Backman, K. C. y Magasanik, B. 1983. Regulation at the glnL-operator-promoter of the complex glnALG operon of Escherichia coli. J. Bacteriol. 153: 1247-1251.
- (31) MacNeil, T., Roberts, G. P. y Tyler, B. 1982. The products of the glnL and glnG are bifunctional regulatory proteins. Mol. Gen. Genet. 183: 392-399.
- (32) Wei, G. R. y Kustu, S. 1981. Glutamine auxotrophs with mutations in a nitrogen regulatory gene, ntrC, that is near glnA. Mol. Gen. Genet. 183: 392-399.
- (33) Backman, K. C., Chen, Y. M., Ueno-Nishio, S. y Magasanik, B. 1983. The product of glnL is not essential for regulation of bacterial nitrogen assimilation. J. Bacteriol. 154: 516-519.
- (34) Covarrubias, A. A., Sánchez-Pescador, R., Osorio, A., Bolívar, F. y Bastarrachea, F. 1980. ColE1 hybrid plasmids containing Escherichia coli genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine. Plasmid, 3: 150-164.
- (35) Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. CSH Lab. Press, N. Y., 446 p.
- (36) Genhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R. y Phillips, G. B. 1981. Manual of methods for general bacteriology. ASM Press, Washington, D. C., 524 p.
- (37) Bender, R. A., Janssen, K. A., Resnick, A. D., Blumenberg, M., Poor, F. y Magasanik, B. 1977. Biochemical parameters of glutamine synthetase from Klebsiella aerogenes. J. Bacteriol. 129: 1001-1009.
- (38) Betlach, M., Hershfield, V., Chow, L., Brown, W., Goodman, H. M., y Boyer, H. W. 1976. A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the EcoRI restriction and modification of DNA. Fed. Proc. 35: 2037-2043.
- (39) Old, R. W. y Primrose, S. B. 1980. Principles of gene manipulation. An introduction to genetic engineering. Univ. of Calif. Press, Los Angeles, Cal., 138 p.

- (40) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- (41) Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. CSH Lab. Press, N. Y., 545 p.
- (42) Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- (43) Holmes, D. S. y Quigley, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmide. *Anal. Biochem.* 114: 193-197.
- (44) Greene, P. J., Heyneker, H. L., Bolivar, F., Rodríguez, R. L., Betlach, M. C., Covarrubias, A. A., Backman, K., Russel, L. J., Tait, R. y Boyer, H. W. 1978. A general method for the purification of restriction enzymes. *Nucl. Acids Res.* 5: 2373-2380.
- (45) Bolivar, F., Rodríguez, R. L., Betlach, M. C., y Boyer, H. W. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles: I. Ampicilin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene*, 2: 75-93.
- (46) Kleckner, N. 1977. Translocatable elements in procaryotes. *Cell*, 11: 11-23.
- (47) Stent, G. S. y Calendar, R. 1978. *Molecular Genetics*. 2a. ed., W. H. Freeman & Cia., San Francisco, Cal., 773 p.
- (48) Osorio, A., Servín, L., Rocha, M., Covarrubias, A. A. y Bastarrachea, F. 1984. Cis-dominant, glutamine synthetase constitutive mutations of Escherichia coli independent of activation by glnG and glnF products. *Mol. Gen. Genet.* (en prensa).
- (49) Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N. y Ginsberg, H. S. 1980. *Microbiology*. 3a. ed., Harper International Edition, Maryland. 1355 p.
- (50) Covarrubias, A. A., Rocha, M., Bolivar, F. y Bastarrachea, F. 1980. Cloning and physical mapping of the glnA gene of Escherichia coli K-12. *Gene*, 11: 239-251.

- (51) Rocha, M. 1981. Caracterización de plásmidos híbridos que codifican para la glutamina sintetasa de Escherichia coli K-12. Tesis profesional, Fac. de Química, U.N.A.M. 62 p.
- (52) Jorgensen, R. A., Rothstein, S. J. y Reznikoff, W. S. 1979. A restriction enzyme cleavage map of Tn5 and location of a region encoding neomycin resistance. Mol. Gen. Genet. 177: 65-72.
- (53) Southern, E. M. 1979. Measurement of DNA length by gel electrophoresis. Anal. Biochem. 160: 319-323.