

29-
10

Colegio de Ciencias y Humanidades
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y FUNCIONAL DE MUTACIONES EN LA REGIÓN *glnA-glnG* de *Escherichia coli* K-12 CLONADAS EN EL PLASMIDO *pACR1*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciado en Investigación Biomédica Básica

P R E S E N T A:

David René Romero Camarena

CIUDAD UNIVERSITARIA, D. F. 1983



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

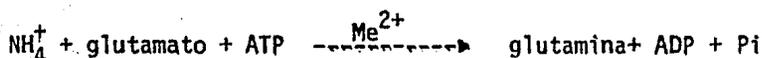
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

INTRODUCCION.

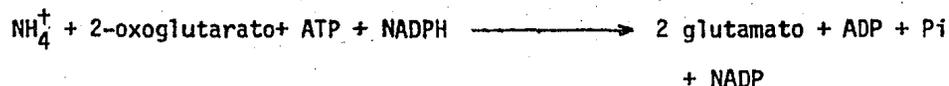
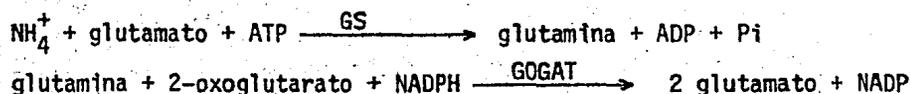
En todos los sistemas biológicos, la asimilación del nitrógeno en macromoléculas es esencial para el crecimiento. Dentro de las vías del metabolismo nitrogenado, la glutamina es el compuesto sencillo más importante. Además de ser un componente para síntesis de proteínas, es una fuente de nitrógeno para la síntesis de otros compuestos, como son triptofano, histidina, CTP, etc. (fig.1 y en Stadtman, 1973).

La glutamina es sintetizada por la adición de amonio a glutamato en una reacción catalizada por la enzima glutamina sintetasa o GS (L-glutamato:amonio ligasa, E.C.6.3.1.2):



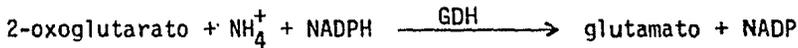
La GS en Escherichia coli es un dodecámero de subunidades idénticas, cada una con un peso molecular de aproximadamente 50 000 daltones. La actividad de esta enzima requiere la presencia de un catión divalente, tal como Mg^{2+} , Mn^{2+} o Co^{2+} (Stadtman y Ginsburg, 1974; Meister, 1980).

En algunos organismos, bajo condiciones de limitación de amonio, este puede ser utilizado para formar glutamato por medio de la GS y la glutamato sintasa (GOGAT, E.C.1.4.1.3)



Otra enzima capaz de incorporar amonio es la deshidrogenasa glutámica o GDH (E.C. 1.4.1.4), la cual lleva a cabo la síntesis de ácido glutá-

mico a partir de 2-oxoglutarato y amonio:



Esta vía es la utilizada en condiciones de exceso de nitrógeno (Tyler, 1978).

En enterobacterias, tales como Escherichia coli, Klebsiella aerogenes y Salmonella typhimurium, se ha tomado a la GS como un modelo para el estudio de la regulación de una enzima que participa en una vía fundamental para el crecimiento celular, así como para analizar el control del metabolismo nitrogenado. Se conocen dos niveles de regulación para GS, los cuales son:

- a) Nivel de actividad;
- b) Nivel de síntesis.

La regulación de GS a nivel de su actividad enzimática puede llevarse a cabo por diversos mecanismos. Uno de ellos es la retroinhibición de GS por productos finales del metabolismo de glutamina (Stadtman, 1973; Ginsburg y Stadtman, 1973); otro mecanismo utilizado es la interconversión entre una forma relajada o inactiva y una forma activa, en respuesta a la variación en la concentración de cationes divalentes (Ginsburg y Stadtman, 1973; Stadtman y Ginsburg, 1974).

El sistema más fino para la regulación de GS a nivel de su actividad enzimática consiste en un sistema de inactivación por adenilación. La adenilación y desadenilación de GS son catalizadas por la enzima adenililtransferasa (ATasa). Esta enzima cataliza la reacción de adenilación cuando es estimulada por la proteína P_{II} (P_{IIA}), pero cuando esta última se encuentra uridilada ($P_{IID-UMP}$) se estimula la reacción inversa. La uridilación de la proteína P_{II} se lleva a cabo por la uridililtransferasa (UTasa). Esta enzima es activada por 2-oxoglutarato e inhibida por glutamina, por lo que la reacción de adenilación sucede en uno u otro sentido en función de la relación intracelular de 2-oxoglutarato/glutamina (Ginsburg y Stadtman, 1973;

Stadtman et al,1980). Este sistema se encuentra esquematizado en la figura 2.

Además de la regulación de GS a nivel de su actividad enzimática, existe un mecanismo de control a nivel de su síntesis. La cantidad de GS dentro de la célula puede variar en un rango de 50 a 100 veces (Bender y Magasanik,1977), dependiendo de la accesibilidad de nitrógeno en el medio de cultivo. En condiciones de limitación de nitrógeno (baja concentración de amonio o glutamina como fuentes de nitrógeno), la síntesis de GS se encuentra inducida, mientras que en presencia de un exceso de nitrógeno (altas concentraciones de amonio), la síntesis de GS se encuentra reprimida.

El gene estructural para la GS de Escherichia coli (glnA) se encuentra localizado aproximadamente en el minuto 86 del mapa de ligamiento de este organismo (Bachmann y Low,1980), flanqueado por los genes polA y rha (Bastarrachea et al.,1980; Pahel et al.,1979a).

El primer tipo de mutaciones que afectan el nivel de expresión del gene glnA, y por tanto la síntesis de GS está representado por mutantes en un gene localizado en el minuto 69 del mapa de ligamiento de E. coli, conocido como glnF (Bachmann y Low,1980). Las mutantes glnF son incapaces de inducir su síntesis de GS y por lo tanto se comportan como auxótrofos de glutamina (Pahel et al.,1978). Se ha propuesto que el producto del gene glnF es esencial para la activación del gene glnA, de manera que en ausencia de glnF, glnA no se encuentra activado .

Las mutaciones en el gene glnF son suprimidas por mutaciones secundarias en un locus cercano a glnA, originalmente designado como glnR en S. typhimurium y glnG en E. coli (Kustu et al.,1979a; Pahel et al.,1979b). Estas mutantes son ahora prototróficas para glutamina y presentan un nivel bajo constitutivo de GS; estas mutantes son Reg⁻, es decir que son incapaces de utilizar algunas fuentes alternas de nitrógeno, tales como arginina o prolina. Kustu y colaboradores (Kustu et al.,1979a;1979b) han demostrado que el fenotipo Reg⁻ está relacionado a la incapacidad de inducir los sistemas de

transporte específicos para estas fuentes alternas de nitrógeno, lo cual ha sido comprobado por otros autores (Brenchley et al.,1980).

Recientemente se ha descrito que la región glnG, tanto en E. coli como en S. typhimurium comprende en realidad a dos genes contiguos a glnA, denominados glnL y glnG (Mc Farland et al.,1981;Mc Neil et al.,1982a;Guterman et al.,1982). Se ha logrado identificar a los productos de glnL y glnG como dos polipéptidos de 36 kdal y 54 kdal, respectivamente (Mc Farland et al., 1981). En la mayoría de los casos, mutaciones en glnL o glnG suprimen la auxotrofia por glutamina causada por mutaciones en glnF. Dobles mutantes glnF-glnG o glnF-glnL sintetizan GS a un nivel bajo constitutivo y son Reg⁻. En un contexto silvestre para glnF, las mutaciones en glnG causan una constitutividad a bajo nivel para la síntesis de GS y son Reg⁻. Las mutantes en glnL presentan un nivel alto constitutivo para la síntesis de GS y son Reg⁺. En base a estos resultados, Mc Farland et al. (1981), proponen el modelo mostrado en la fig.3. Los puntos más importantes de este modelo son los siguientes:

- a) El producto de glnG junto con el producto de glnF median la activación de la expresión de glnA.
- b) Tanto el producto de glnG como el producto de glnL parecen requerirse para regular negativamente la expresión de glnA.

Nuevos datos comunicados por los laboratorios de Magasanik y Tyler corroboran este modelo y proponen algunas adiciones. Tal vez la más importante es que glnA-glnL-glnG pueden comportarse como un operón cuya transcripción se originaría en glnA y en dirección a glnG (Pahel et al.,1982; Chen et al.,1982;Mc Neil et al.,1982a;Guterman et al.,1982;Bender y Eades, 1982). Estos grupos postulan además la existencia de un promotor adicional en el gene glnL, a partir del cual podrían transcribirse tanto glnL como glnG. Datos obtenidos en nuestro laboratorio sugieren la existencia de un promotor encargado de la transcripción de glnG, por lo menos en algunas con-

diciones(Covarrubias,Rocha y Bastarrachea,datos no publicados). En apoyo a la hipótesis que postula un papel dual (activador-represor) para el producto de glnG,se han descrito nuevas mutaciones,localizadas en este gene,las cuales provocan auxotrofia por glutamina (Wei y Kustu,1981;Mc Neil et al., 1982).Datos obtenidos recientemente en el laboratorio de Mc Neil (Mc Neil et al.,1982b) confirman el papel dual de glnG y la función como represor del producto de glnL,mediante el análisis genético de un gran número de mutaciones en esta región. Sin embargo,reportan el hallazgo de dos mutantes en glnL las cuales,a pesar de estar afectadas en la regulación de glnA,no suprimen la auxotrofia por glutamina causada por mutaciones en glnF.

Además de los factores integrados por Kustu y otros en su modelo,se ha descrito la existencia de otros factores involucrados en la regulación de la síntesis de GS,los cuales aún no han sido correlacionados con éste modelo. Mediante el estudio de cepas con fusiones entre el promotor de glnA y el gene lacZ,Rothstein et al.(1980) han demostrado que la concentración intracelular de GS es importante para modular la expresión de glnA,aunque no es esencial para el control negativo o positivo de dicho gene. Por otra parte, datos obtenidos por el grupo de Magasanik sugieren que la proteína P_{II} , además de su función como catalizador en las reacciones de adenilación y desadenilación de GS,juega un papel en la regulación de la síntesis de GS. Se ha descrito que mutantes carentes de la proteína P_{II} son incapaces de reprimir la síntesis de GS aún en condiciones de exceso de nitrógeno,mientras que mutantes alteradas en la proteína P_{II} haciéndola incapaz de uridilarse, presentan un nivel bajo constitutivo de GS (Rothstein et al.,1980; Foor et al.,1980;Reuveny et al.,1981).

En nuestro laboratorio estamos interesados en los mecanismos regulatorios para la síntesis de GS en E. coli. La clonación de glnA,glnL y glnG de E. coli en plásmidos híbridos (Covarrubias et al.,1980a;1980b;1980c; Backman et al.,1981) ha expandido las posibilidades experimentales del en-

foque genético. Sin embargo, la interpretación de los resultados obtenidos del estudio de estos plásmidos, se ve obstaculizada por la naturaleza multicopia de ellos. En este trabajo se presenta una alternativa para este problema, que consiste en la clonación de mutaciones previamente aisladas. Se presenta la clonación in vivo y análisis de los alelos glnA71::Tn5, glnG74::Tn5 y gln76, así como el principio de un análisis del fenómeno de hipersensibilidad a MS presentado por las cepas glnG.

MATERIAL Y METODOS.

1.- CEPAS BACTERIANAS Y BACTERIOFAGOS.

Todas las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo fueron de Escherichia coli K-12 y se encuentran descritas en la tabla 1. El bacteriófago utilizado fue P1 virA, el cual fue proporcionado por Neil Willets.

2.- CONDICIONES DE CULTIVO.

Medio rico.- El medio rico utilizado fue Caldo Luria (bacto-triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 1%). Para auxótrofos de glutamina se adicionó glutamina a una concentración de 1 mg/ml.

Medio mínimo.- El medio mínimo utilizado fue NN (Covarrubias et al., 1980b) que contiene, en g/l:

KH_2PO_4	13,6	CaCl_2	0.01
K_2SO_4	2.61	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0005
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2		

A este medio se le adicionó glucosa a una concentración final de 0.2% como fuente de carbono y NH_4Cl o L-glutamina a 15 mM o 1mg/ml, respectivamente, como fuentes de nitrógeno. Como fuente alterna de nitrógeno se usó L-arginina a una concentración de 0.2%. Para las pruebas de sensibilidad a L-metionina-DL-sulfoximina, se adicionaron NH_4Cl a 15mM y MS a 80 μM . Los requerimientos de las cepas se agregaron a sus concentraciones óptimas, que variaron de 1×10^{-4} M a 2×10^{-3} M, dependiendo del aminoácido o vitamina. Para la selección de cepas resistentes a kanamicina o ampicilina, estas se utilizaron a 30 $\mu\text{g/ml}$ o 150 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Todas estas sustancias fueron esterilizadas por filtración a través de filtros Millipore HAWP (0.45 μM) y se agregaron a las sales previamente esterilizadas en la autoclave. Para la preparación de medios sólidos se agregó Bacto-agar al 1.5%.

Para la purificación de DNA de plásmido y la purificación de minicélulas se usó el medio mínimo M9 (Miller,1972) con las adiciones pertinentes.

En todos los casos, las bacterias fueron crecidas a 37°C y con agitación para el caso de cultivos líquidos. El crecimiento fue detectado por turbidimetría, empleándose un fotocolorímetro Klett-Summerson con filtro rojo No.66.

3.-PREPARACION DE LISADOS DEL BACTERIOFAGO P1 POR LISIS CONFLUENTE.

Para los experimentos de transducción se utilizó el bacteriófago P1 yirA. Para la propagación de dicho bacteriófago se utilizó el método de lisis confluyente (Swanstrom et al.,1951) como se describe a continuación. Se creció a la cepa donadora en Caldo Luria hasta fase exponencial (50 unidades Klett); se mezclaron 0.5 ml de este cultivo con 0.1 ml de P1 diluido a un título de 10^7 UFP/ml (UFP= Unidades Formadoras de Placa) y se vació la mezcla con ayuda de agar suave LC (Caldo Luria + CaCl_2 25 mM + bacto-agar 0.75%, 3 ml, licuado y mantenido a 45°C) sobre cajas de Petri con medio LCTG (Caldo Luria suplementado con glucosa al 0.2%, timina a 25 µg/ml y CaCl_2 a 25mM). Se incubaron las cajas a 37°C hasta observar confluencia de placas (aproximadamente 12 hrs.). Se añadieron 3 ml de caldo Luria sobre la superficie de las cajas, las cuales se incubaron por 2 hrs. a 4°C. Terminada la incubación, se raspó el agar suave de la superficie de las cajas y se colocó en tubos, donde se añadió un ml de cloroformo por cada 20 ml de suspensión fágica, agitándose vigorosamente. Se centrifugó (2 500 rpm, 10 minutos, Sorvall GLC-2) para eliminar el agar y los residuos celulares. El sobrenadante se trató nuevamente con cloroformo y se almacenó a 4°C.

4.- TITULACION DE LISADOS DE P1.

Los lisados de P1 preparados como se describió anteriormente, se titu-

laron utilizando a la cepa AB1157 como cepa sensible. Se creció a la cepa mencionada en Caldo Luria a 37°C con agitación hasta alcanzar 40 unidades Klett; se centrifugó el cultivo y se resuspendió la pastilla celular en la mitad del volumen original de medio de adsorción (MgSO₄ 0.01 M + CaCl₂ 0.005 M). Se hicieron diluciones seriadas del lisado fágico por titular en NN estéril y se mezclaron 0.1 ml de cada dilución con 0.1 ml del cultivo concentrado. Se incubaron estas mezclas a 37°C por 20 minutos sin agitación; en este tiempo ocurre la adsorción del fago. Terminada la incubación, se vació sobre cajas de Petri con medio LCTG con ayuda de agar suave LC. Las cajas se incubaron de 12 a 24 hrs, a 37°C, contándose el número de placas en cada dilución. El título del lisado se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Título (en UFP/ml)} = \frac{\text{No. de placas por caja}}{\text{Alícuota en ml}} \times \text{Inversa de la dilución (como potencia base 10)}$$

5.- TRANSDUCCIONES.

Las transducciones con el fago P1 virA se realizaron de la siguiente manera. La cepa receptora se creció en Caldo Luria hasta fase exponencial (40 unidades Klett); se centrifugó el cultivo (2 500 rpm por 10 minutos, Sorvall GLC-2) y se resuspendió la pastilla celular en un décimo del volumen original con bacto-triptona al 1%. La multiplicidad de infección utilizada fue de 0.05., preparándose las mezclas de la siguiente manera: 0.5 ml del cultivo concentrado + 0.5 ml de MgSO₄ 0.03 M y CaCl₂ 0.015 M + 0.5 ml de lisado fágico diluido en Caldo Luria a 5 X 10⁷ UFP/ml. Para el control, se sustituyó con Caldo Luria a la suspensión fágica. Las mezclas se incubaron 20 minutos a 37°C sin agitación. Terminada la incubación se centrifugaron las mezclas y se lavaron dos veces con NN estéril. Las células se plaquearon sobre cajas con el medio selectivo apropiado y se incubaron a 37°C.

6.- TRANSFORMACIONES.

6.- TRANSFORMACIONES.

Las transformaciones con DNA plasmídico se llevaron a cabo de acuerdo a Cohen et al. (1972). La cepa receptora se creció en Caldo Luria hasta alcanzar 30 unidades Klett. Las células se colectaron por centrifugación (10 000 rpm, 4 minutos, rotor Sorvall SS-34) y se lavaron en la mitad del volumen original de NaCl 10 mM. Se resuspendieron las bacterias en la mitad del volumen original con CaCl₂ 30 mM, incubándose por 20 minutos a 4°C sin agitación. Terminada la incubación, se recuperaron las células por centrifugación (5 000 rpm, 5 minutos, rotor Sorvall SS-34) y se resuspendieron en un décimo del volumen original con CaCl₂ 30 mM. Se pusieron en contacto DNA y bacterias y la suspensión se incubó a 4°C por 60 minutos sin agitación; esta incubación fue seguida por un pulso de calor a 42°C por 70 segundos sin agitación. Se adicionó Caldo Luria y se dejó crecer de 2 a 3 hrs., lavándose entonces con NN estéril y plaqueando en el medio selectivo apropiado.

7.- AISLAMIENTO DE CEPAS thyA POR ENRIQUECIMIENTO CON TRIMETHOPRIM.

Este procedimiento se usó para obtener derivadas thyA de nuestras cepas y es esencialmente el descrito por Miller (1972) y por Stacey y Simson (1965).

Se creció a la cepa en el medio mínimo apropiado por 12 hrs. a 37°C con agitación. Se diluyó el cultivo hasta 10⁻² con NN estéril y se inocularon (con 0.2 ml de la dilución 10⁻²) 5 ml de medio mínimo suplementado con 75 µg/ml de timina, 10 µg/ml de trimethoprim y Caldo Luria al 2%. Se incubó a 37°C con agitación por 48 hrs.; al término de esta incubación se hicieron las diluciones apropiadas del cultivo, las cuales se platearon en medio mínimo suplementado con timina a 75 µg/ml. Las derivadas Thy⁻ se identificaron por su incapacidad para crecer en medios carentes de timina.

8.-OBTENCIÓN DE CEPAS recA56.

Este método se basa en el ligamiento entre los genes recA y thyA para obtener derivadas recA56. Para obtenerlas es necesario cruzar por conjugación a una cepa Hfr recA56 con una cepa thyA, seleccionando para prototrofia para timina como se describe a continuación. Se crecieron a la cepa donadora (JC5088) y a la cepa receptora (thyA) a 37°C con agitación hasta fase exponencial (40 unidades Klett). Se mezclaron 0.5 ml del cultivo de la cepa donadora con 4.5 ml del cultivo de la cepa receptora (multiplicidad de 0.1) y se incubó por 30 minutos a 37°C sin agitación. Terminada la incubación, se centrifugó y se lavó dos veces con NN estéril. La suspensión celular se diluyó hasta 10^{-2} (con NN estéril) y se platearon las diluciones en medio mínimo sin timina. Se aislaron las derivadas sensibles a 2 µg/ml de nitrofurantoína (como marcador no seleccionado) dado que ésta es una de las características de una cepa recA (Jenkins y Bennett, 1976).

9.-DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A KANAMICINA DE LA CEPA MX615.

Se creció a la cepa por analizar en caldo Luria hasta fase exponencial (40 unidades Klett). En este punto se fraccionó el cultivo original y se añadió sulfato de kanamicina a concentraciones variables entre 0 y 10 µg/ml. Los cultivos se incubaron por 90 minutos a 37°C con agitación. Terminada la incubación, se diluyó cada cultivo hasta 10^{-7} con NN estéril y se plaquearon las diluciones apropiadas en cajas de Petri con caldo Luria para determinar la cuenta viable en cada condición (fig.4).

10.-AISLAMIENTO DE DERIVADAS KAN^S DE LA CEPA MX850.

Para aislar derivadas sensibles a kanamicina a partir de la cepa MX850 se utilizó el siguiente método.

Se creció a la cepa en Caldo Luria suplementado con glutamina a 37°C con agitación hasta fase exponencial (40 unidades Klett). En este momento se añadió sulfato de kanamicina a 7.5 µg/ml (la cual es una concentración subletal de este antibiótico, ver fig. 4) y 2 500 U/ml de penicilina G só-

dica. Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación hasta que la lisis (registrada como un descenso en la lectura de unidades Klett) se detuvo (2 hrs.). Terminada la incubación se centrifugaron los cultivos y se lavaron dos veces con NN estéril. Las células se resuspendieron en Caldo Luria suplementado con glutamina y se incubaron 12 hrs. a 37°C con agitación. Se platearon las diluciones apropiadas de este cultivo en el mismo medio y se aislaron las colonias sensibles a kanamicina.

11.- DETERMINACION DE FRECUENCIAS DE REVERSION.

A partir de un cultivo de la cepa por analizar se obtuvieron colonias aisladas. Se tomó una colonia y se resuspendió en 1 ml de NN estéril, se hicieron las diluciones apropiadas y se inocularon 5 ml de caldo Luria con una dilución que correspondiera a aproximadamente 40 células. Se incubó a 37°C con agitación hasta que el cultivo se volviera turbio. Se platearon las diluciones apropiadas en el medio selectivo para revertantes y en un medio no selectivo. Se obtuvo la cuenta viable de células revertantes y células totales, expresándose la frecuencia de reversión como:

$$\text{Frecuencia de reversión} = \frac{\text{Número de células revertantes por ml.}}{\text{Número de células totales por ml.}}$$

12.- DETERMINACION DE PROTEINA.

La concentración de proteína se determinó según el método de Lowry et al. (1951), utilizando la fracción V de albúmina sérica bovina como referencia. La concentración está expresada como miligramos de proteína por ml.

13.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE GLUTAMINA SINTETASA (GS).

Para la determinación de actividad de GS, los cultivos se crecieron en medio mínimo NN con diversas fuentes de nitrógeno. El método utilizado para la determinación de actividad de GS fue el de Bender et al. (1977b)

con las modificaciones introducidas por Covarrubias et al. (1980b).

Este ensayo mide la actividad de γ -glutamyltransferasa de GS, reportada por Shapiro y Stadtman (1970). La actividad específica se expresa como micromolas de γ -glutamylhidroxamato formadas por minuto y por miligramo de proteína.

Para determinar cualitativamente si una cepa tenía una actividad alta o baja de GS, se utilizó una prueba en colonia. Las cepas por analizar se parchan en un medio con la condición nitrogenada apropiada. En los pozos de una placa para hemaglutinación se colocan 100 μ l de la mezcla de reacción para γ -glutamyltransferasa. Se transfieren las células de la caja de Petri a los pozos con palillos estériles. Se cubren las placas y se incuban 45 minutos a 37°C. La reacción se detiene por la adición de 100 μ l de reactivo de parar por pozo. Las colonias con una alta actividad de GS viran a rojo intenso, mientras que las colonias con baja actividad permanecen amarillas. Este método fue reportado por Pahel et al. (1978).

14.- PURIFICACION DE COLICINA E1.*

La colicina E1 utilizada en este trabajo fue obtenida de las cepas JC411/ColE1 o de RR1/ColE1 según el protocolo de Schwartz y Helinski (1971), realizado hasta la fase de precipitación con sulfato de amonio.

15.- PURIFICACION DE GS POR PRECIPITACION CON SULFATO DE ZINC.

Esta se llevó a cabo por el procedimiento de Miller, Shelton y Stadtman (1974)

16.- PURIFICACION DE DNA DE PLASMIDO.

Todos los plásmidos utilizados en este trabajo fueron purificados

* Agradezco a A. Garcíaarrubio y a F. Bolívar el haberme proporcionado las preparaciones de colicina E1 usadas en este trabajo.

según el método de Betlach et. al. (1976). En este método, las células fueron crecidas en medio M9 con las adiciones apropiadas a 37°C con agitación hasta alcanzar una concentración celular de 4 a 5 X 10⁸ células por ml. Cuando esto ocurrió, se añadieron 170 mg/ml de cloranfenicol con el propósito de amplificar el DNA de plásmido y se incubó a 37°C con agitación por 16 hrs. Terminada esta incubación, las células fueron colectadas por centrifugación y se lisaron con lisozima y Tritón X-100, además de tratarse con RNasa. Los residuos celulares se eliminaron por centrifugación. El lisado claro así obtenido se trató con fenol-cloroformo para eliminar proteínas solubles. La solución de DNA se concentró por precipitación con etanol y se pasó a través de una columna de Biogel A-50. Se determinó la absorbancia a 260nm de las fracciones obtenidas y el primer pico (DNA de plásmido) se precipitó con etanol. Este precipitado se sometió a centrifugación en un gradiente de CsCl-yoduro de propidio para eliminar contaminantes de DNA cromosomal. El DNA de plásmido así obtenido fue dializado, precipitado con etanol y por último resuspendido en Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8.0. Las preparaciones de plásmido se almacenaron a 4°C.

17.- MICROENSAYO PARA DNA DE PLASMIDO.

Este método fue similar al descrito en el apartado anterior, con la diferencia de que el DNA se purificó de un cultivo de 5 ml en Caldo Luria, omitiéndose tanto la amplificación como la columna de Biogel A-50 y el gradiente de CsCl-yoduro de propidio. El DNA de plásmido así obtenido fue apropiado tanto para análisis de restricción como para transformación. Alternativamente, se utilizó el microensayo descrito por Holmes y Quigley (1981).

18.- PURIFICACIÓN DE MINICÉLULAS.

Las minicélulas conteniendo el plásmido por analizar se purificaron usando gradientes continuos de sacarosa (de 5 a 20%) en Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, pH 7.5, como lo describen Roozen et al. (1971) y Meagher et al. (1977). Las minicélulas purificadas se resuspendieron en medio para ensayo de metionina (Difco). La absorbancia de esta suspensión se ajustó a 0.2 a 620 nm. Se incubó una alícuota de 2 ml en presencia de 50 μ Ci de 35 S-metionina durante 30 minutos a 37°C con agitación. Transcurrido este tiempo, se colectaron las minicélulas por centrifugación.

Para su análisis electroforético en una dimensión, las minicélulas fueron lisadas por calentamiento en baño de agua por 2 a 5 minutos en una solución de glicerol al 20%, β -mercaptoetanol al 10%, SDS al 4.6% y Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8. Para electroforesis bidimensional según la técnica de O'Farrell (1975), las minicélulas se resuspendieron en amortiguador A y se lisaron por 3 a 5 ciclos de congelación y descongelación. Los productos se visualizaron por fluorografía.

19.- ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA.

La electroforesis de DNA se realizó como lo describen Bolívar et al. (1977). Se utilizaron placas verticales preparadas con agarosa al 1% en amortiguador TBE (Trizma base 90 mM, H_3BO_3 90 mM, EDTA 2.5 mM, pH 8.2). Las muestras, en un volumen de 10 a 30 μ l se corrieron a 150 V (voltaje constante) a temperatura ambiente por un hora. Terminada la electroforesis, los geles se tñeron en una solución de bromuro de etidio a 4 μ g/ml y se visualizaron con una lámpara de luz ultravioleta. Los geles se fotografiaron usando una cámara Polaroid MP-5 con filtro de gelatina amarilla No.9 Kodak Wratten y película Polaroid NP tipo 55.

20.-ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DISCONTINUOS DE POLIACRILAMIDA-SDS.

La electroforesis de proteínas se realizó según la técnica de Laemmli (1970). El gel inferior contiene poliacrilamida al 11% y SDS al 0.1% en amortiguador Tris-HCl 0.4 M, pH 8.8; el gel superior contiene poliacrilamida al 6.6% y SDS al 0.0625% en amortiguador Tris-HCl 0.08125 M, pH 6.8. La electroforesis se llevó a cabo a 10 mA por gel hasta que entraron las muestras al gel inferior, aumentándose entonces la corriente a 20 mA. Terminada la electroforesis, se tiñeron los geles con Azul brillante de Coomassie R-250 al 0.06% en metanol:ácido acético:agua (3:1:6) durante 15 minutos a 65°C, eliminándose el exceso de colorante con ácido acético al 10%.

21.- ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE PROTEINAS.

La electroforesis bidimensional de proteínas se llevó a cabo según la técnica de O'Farrell (1975). En esta técnica la separación de proteínas se lleva a cabo por electroenfoque en la primera dimensión y por un sistema de poliacrilamida-SDS en la segunda dimensión. El electroenfoque se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 6.8% con anfólinas pH 3 a 10. Las condiciones de electroforesis fueron las descritas por O'Farrell, pero omitiendo el pulso de alto voltaje. La electroforesis en segunda dimensión se realizó en el sistema descrito en el apartado anterior, pero a 9 mA por 16 hrs. Los geles se tiñeron con azul Brillante de Coomassie y se trataron para fluorografía.

22.- FLUOROGRAFIA.

Esta se llevó a cabo según la técnica de Bonner y Laskey (1974). Los geles se secaron y se sometieron a autorradiografía utilizándose película Kodak-X-Omat XRP5.

23.- PREPARACION DE ANTICUERPOS*

Se inyectaron conejos con 250 µg de GS purificada de la cepa RR1 (glnA⁺) en adyuvante completo de Freund. Los animales se inyectaron dos veces en un intervalo de 15 días con las mismas dosis de GS. Los conejos se sangraron por la oreja una vez a la semana durante tres meses, comenzando una semana después de la última inyección de GS. El suero obtenido de los diferentes sangrados se utilizó para preparar la fracción total de γ -globulinas por tres precipitaciones con sulfato de amonio al 40% de saturación. El precipitado final se disolvió en amortiguador fosfatos 10 mM, pH 7,2, se dializó contra el mismo amortiguador y se congeló a -70°C.

24.- INMUNOELECTROFORESIS CUANTITATIVA.

Se realizó según la técnica descrita por Weeke (1973) utilizando un gel de agarosa al 1% conteniendo 0.5% de anti-GS. El amortiguador usado para la inmunolectroforesis fue barbiturato de sodio 25 mM, pH 8.6 con azida de sodio al 0.025%. El gel se corrió por 15 hrs. a 5 V/cm. Terminada la electroforesis, el gel se lavó exhaustivamente y se secó, tificándose con azul brillante de Coomassie R-250.

25.- ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN **

Todas las endonucleasa de restricción usadas en este trabajo se prepararon conforme al método de Greene et al. (1978). Las condiciones usadas para las enzimas fueron reportadas por Bolívar et al., (1977)

* Agradezco a Susana López y Rafael Palacios el haberme proporcionado el suero anti-GS usado en este trabajo.

** Agradezco a A. Covarrubias y a F. Bolívar el haberme proporcionado las endonucleasas de restricción utilizadas en este trabajo.

RESULTADOS Y DISCUSION.

1.- Obtención de las cepas necesarias para la clonación in vivo de mutaciones en la región glnA.

Para la clonación in vivo de mutaciones en la región glnA, se utilizó una adaptación del método para clonación in vivo descrito por Stauffer et al. (1979). La estrategia utilizada consistió en propagar el bacteriófago P1 en la cepa que poseía la mutación que deseábamos clonar, utilizándose este fago para una transducción generalizada en que la cepa receptora portaba el plásmido pACR1 (silvestre para la región glnA, ver fig.8) y una delección cromosomal que abarcaba la región glnA. Se esperaba, pues, la recombinación entre el fragmento transductante y la región glnA localizada en el plásmido. Seleccionando los marcadores adecuados es posible obtener el plásmido recombinante deseado.

Para la aplicación de esta metodología se necesitaba construir previamente una cepa que poseyera las siguientes características:

- a) Una delección cromosomal de la región glnA y cuya extensión fuera de un minuto del cromosoma bacteriano o más. Dado que la capacidad de transducción por una cápside de P1 es de 2 minutos, esta condición reducía la posibilidad de recombinación entre el fragmento transductante y el cromosoma bacteriano.
- b) Proficiente en recombinación, para permitir un experimento de transducción generalizada.
- c) Un fenotipo Kan^S, para poder utilizar a Tn5 (Kan^R) como marcador seleccionable.

En nuestro laboratorio se aisló una cepa que cumplía dos de las tres características requeridas. Esta cepa, llamada MX850, fue obtenida a partir

de MX752 (la cual posee un fago λ integrado cerca del operón rha) como una derivada Gln^- por curación del fago λ por termoinducción (Servín,1981). Por hibridización tipo Southern se demostró que esta cepa carece de los genes glnA,glnL y glnG,corroborando datos previamente descritos (Brom,1982). Esta delección debió de haber eliminado todo o parte del operón rha,dado que la cepa MX850 es Rha^- (L. Servín,datos no publicados). Esta cepa es además recA⁺. Sin embargo,debido a las características del sistema usado para el aislamiento de esta cepa,esta posee un transposón Tn5 en uno de los bordes de la delección,siendo por tanto Kan^R .

Dados los requerimientos de nuestro método para clonación de mutaciones,era necesario obtener derivadas Kan^S de MX850 por escisión precisa de Tn5. Como la frecuencia de escisión precisa de Tn5 en mutantes lac::Tn5 (episomas F'lac) es del orden de 1×10^{-6} (Egner y Berg,1981),era deseable disponer de un método que permitiera el enriquecimiento de cepas Kan^S . Esto se logró sometiendo a la cepa MX850 a un enriquecimiento con penicilina(Miller,1972) en presencia de concentraciones subletales de kanamicina (7.5 $\mu g/ml$,fig.4),como se describió en Material y Métodos. Dentro de las sobrevivientes a este tratamiento el 81.8% presentaron un fenotipo Kan^S . Se aisló una de estas derivadas y se le denominó MX914.

La cepa MX914 cumple con los requerimientos necesarios. Para descartar la posibilidad de que al escindirse Tn5 hubiese afectado alguna región no detectada de importancia para la regulación de glnA (y como otro prerequisito de nuestro método) se aisló la cepa MX924 por transformación de MX914 con pACR1. Como puede verse en la tabla 2 y en la figura 9,tanto la actividad de GS como su crecimiento en diversas fuentes de nitrógeno es similar a lo observado en MX850/pACR1.Posteriormente se aisló la derivada recA56 de MX914,obteniéndose primero una derivada thyA (MX918) y conjugando esta derivada con la cepa JC5088,como se describió en Material y Métodos. Se obtuvo la cepa MX919 (Thy^+ recA56 Kan^S Δ (rha-glnA-glnL-glnG)) .

2.- Clonación in vivo de los alelos glnA71::Tn5 y glnG74::Tn5 en pACR1

Previamente se han descrito en nuestro laboratorio dos mutaciones por inserción de Tn5, las cuales afectan la región glnA. Una de ellas, el alelo glnA71::Tn5, se encuentra localizada en el gene glnA, lo que provoca un fenotipo Gln⁻Kan^R. La cepa que lleva este alelo, llamada MX727, carece de antígeno similar a GS, demostrable por inmunoelectroforesis cuantitativa (Bastarrachea et al., 1980; Brom, 1980). Por experimentos de hibridización tipo Southern, se demostró que el Tn5 en esta cepa está integrado cerca de un sitio de EcoRI, en el extremo amino terminal del gene glnA (Brom, 1982).

El segundo alelo descrito fue glnG74::Tn5. La cepa que porta este alelo (MX902) presenta una actividad de GS baja y constitutiva con respecto a la cepa silvestre, como puede verse en la tabla 2. Otro de los fenotipos característicos de una cepa glnG es la incapacidad de utilizar fuentes alternativas de nitrógeno como arginina (fenotipo Aut⁻), prolina (Put⁻), etc., conocidos en conjunto como fenotipo Reg⁻. La cepa MX902 es Aut⁻, como puede observarse en la fig. 9. En nuestro laboratorio se ha demostrado que, además de la constitutividad a bajo nivel para GS y el fenotipo Reg⁻, las cepas glnG son hipersensibles al análogo de glutamina L-metionina-DL-sulfoximina (MS). A una concentración de MS de 80 µM y en presencia de NH₄Cl a 15 mM, las cepas glnG son incapaces de crecer, mientras que las cepas glnG⁺ crecen (fig. 9 y Osorio et al., en preparación). Por experimentos de hibridización tipo Southern, se localizó la inserción de glnG74::Tn5 a 1.18 mdal de un sitio de BamHI (fig. 8) en el amino terminal del gene glnG (Osorio et al., en preparación).

La clonación de estas mutaciones, además de corroborar los datos previamente descritos, nos permitiría su análisis por métodos de ingeniería genética molecular, capacitándonos para ampliar nuestros conocimientos de estructura y regulación en este sistema.

Los métodos convencionales de clonación molecular de DNA llevando una mutación conocida involucran el repetir el procedimiento usado para clonar el gene silvestre, usando DNA aislado de la cepa mutante. Un buen ejemplo de esta metodología, así como de la información regulatoria que puede obtenerse, lo constituye el estudio de mutaciones en el operador del operón bio de E. coli, las cuales han sido clonadas en plásmidos híbridos (Barker et al., 1981). Teóricamente, la clonación de nuestras mutaciones podría facilitarse por el hecho de que la región glnA tanto en E. coli (A. Covarrubias, datos no publicados) como en S. typhimurium (Koduri et al., 1980) se encuentra flanqueada por sitios para la enzima HindIII. Desafortunadamente, como nuestras mutaciones son inserciones presentan nuevos sitios para HindIII, lo que nos obligaba a utilizar otros métodos de fraccionamiento, como el mecánico. Esto conducía a que los fragmentos aislados podrían ser de diverso tamaño, obligándonos a etapas posteriores de subclonación con el fin de poder comparar nuestros plásmidos mutantes con el plásmido silvestre.

Sin embargo, recientemente se han descrito una serie de metodologías para la clonación in vivo de mutaciones. Estas técnicas están basadas en los fenómenos de homogenización y transducción generalizada y conducen a los mismos resultados que los métodos de clonación in vitro. Estos métodos presentan dos ventajas importantes sobre los métodos para clonación in vitro de mutaciones. La primera de ellas es que las etapas son simples, permitiendo la clonación de la mutación deseada en un tiempo relativamente corto. La segunda ventaja es que las mutaciones son clonadas en un plásmido idéntico al silvestre, eliminándose la necesidad de subclonación. Estas metodologías de clonación in vivo han sido aplicadas para la clonación de mutaciones regulatorias en el operón trp de E. coli (Stauffer et al., 1979) y para mutaciones en el operador del operón araBAD (Horwitz et al., 1980).

Nosotros adaptamos para nuestro caso, uno de los métodos descritos por Stauffer et al. (1979). Esta metodología pretendía clonar las mutaciones mencionadas en el plásmido pACR1 (Covarrubias et al., 1980a). Este plásmido, mostrado en la figura 8, porta los genes glnA, glnL y glnG, así como un gene que codifica para una proteína de 72 kDa, cuya función es desconocida y probablemente no relacionada a la regulación de glnA (Backman et al., 1981). La estrategia de clonación para los alelos glnA71::Tn5 y glnG74::Tn5 se encuentra en la figura 5. Para la clonación de ambos alelos se partió de la cepa MX924, descrita anteriormente. Esta cepa se utilizó como receptora en una transducción con fago P1 propagado en la cepa MX727 (glnA71::Tn5) seleccionándose las transductantes Kan^R, dado que éste es uno de los marcadores conferidos por la inserción de Tn5. Esta transducción podría generar tres tipos de recombinantes, mostrados en la fig. 6.

El primer tipo de recombinante era aquel en que el fragmento transductante recombina con la región cromosomal portada por el plásmido. La cepa resultante tendría un fenotipo Gln⁻Kan^RColE1^{IMM}. El segundo tipo de recombinante estaba constituido por aquel en que el fragmento transductante recombina con los bordes de la deleción cromosomal, introduciéndose la región mutada. Pensamos que la frecuencia de este tipo de recombinante en relación al primer tipo debería de ser menor, debido a que la deleción reduce las posibilidades de recombinación. Dado que en este tipo de recombinante se mantendría el plásmido pACR1, la cepa tendría un fenotipo Gln⁺Kan^RColE1^{IMM}. El tercer tipo de recombinante era aquella en que el fragmento transductante recombina con los bordes de la deleción cromosomal y por otro lado el plásmido segregaba de la célula. El fenotipo de este tipo de recombinante sería Gln⁻Kan^RColE1^S.

Al realizarse este experimento se encontraron los tres tipos de recombinantes esperadas. A partir de una recombinante del primer tipo se aisló plásmido y se transformó con él a la cepa MX919, seleccionándose trans-

formantes Kan^R. El 100% de estas transformantes presentaban un fenotipo Gln⁻Kan^RColE1^{IMM}, lo que sugería que estas cepas llevaban el plásmido pACR1 con el alelo glnA71::Tn5. Una de estas cepas se denominó MX920.

Para la clonación del alelo glnG74::Tn5 se procedió de manera similar. Se utilizó a la cepa MX924 como receptora en una transducción con fago P1 propagado en la cepa MX902(glnG74::Tn5), seleccionándose las transductantes Kan^R. Esta transducción generó tres tipos de recombinantes, mostradas en la fig.7. Estos tres tipos son análogos en su generación a los obtenidos durante la clonación de glnA71::Tn5. El primer tipo de recombinante daría un fenotipo Gln⁺Kan^RMS^SColE1^{IMM}. El segundo tipo de recombinante produciría un fenotipo Gln⁺Kan^RMS^RColE1^{IMM}. El tercer tipo de recombinante provocaría un fenotipo Gln⁺Kan^RMS^SColE1^S.

A partir de una de las recombinantes del primer tipo se aisló plásmido, transformándose con él la cepa MX919, seleccionándose los caracteres Gln⁺Kan^R. El 100% de las transformantes presentaba un fenotipo Gln⁺Kan^RMS^SColE1^{IMM}, lo que sugería que estas cepas portaban un plásmido pACR1 con el alelo glnG74::Tn5. Se aisló una de estas transformantes y se le denominó MX921.

3.- Análisis de restricción de los plásmidos en las cepas MX920 y MX921.

Para demostrar que los plásmidos en las cepas MX920 y MX921 portaban efectivamente el alelo deseado, se realizó un análisis de ellos por restricción con la enzima Pst1. Los pesos moleculares de los fragmentos de restricción con Pst1 de Tn5 se determinaron en base a mapas de restricción previamente publicados (Jorgensen et al., 1979; Yamamoto et al., 1980) así como por comparación con las bandas de pACR10 en los casos donde había alguna discrepancia.

Los resultados de este experimento se muestran en la fig.8. Para su interpretación, es necesario recordar que Tn5 posee cuatro sitios reconocidos por la enzima Pst1. Por otra parte, la región glnA en pACR1 se en-

cuentra contenida en un fragmento de restricción con PstI de 4.15 mdal. Cualquier inserción en esta región debe alterar el peso de este fragmento. Como se vé en la fig.8, los plásmidos, tanto de MX920 como de MX921, presentan ocho sitios de restricción para PstI y han perdido ambos el fragmento de 4.15 mdal, ganándose dos nuevos fragmentos de tamaño variable según el plásmido. En base a estos datos, se determinó la localización de la inserción en cada plásmido.

El plásmido de la cepa MX920 (pACR71) presenta una inserción de Tn5 localizada cerca del sitio de EcoRI, en la región amino terminal de glnA. El plásmido de la cepa MX921 (pACR74) presenta una inserción de Tn5 localizada a 1.18 mdal del sitio de BamHI, en la región amino terminal de glnG. La localización de ambas inserciones es congruente con los datos previamente reportados.

4.- Caracterización fenotípica de MX920 y MX921.

Se llevaron a cabo experimentos de crecimiento con las cepas MX920 y MX921 en diversas condiciones nitrogenadas. Los resultados obtenidos se muestran en la fig.9. La cepa MX920 es incapaz de crecer en NH_4Cl como fuente de nitrógeno, creciendo solamente en presencia de glutamina. El comportamiento de esta cepa es similar tanto en características como en velocidad al de la cepa MX727, la cual porta el mismo alelo (glnA71::Tn5) que MX920, pero en MX727 este alelo es de localización cromosómica. Con respecto a frecuencia de reversión a Gln^+ , se ha encontrado que la cepa MX727 es incapaz de generar revertantes Gln^+ (Brom, 1982), encontrándose el mismo resultado en la cepa MX920.

La cepa MX921 es capaz de utilizar tanto amonio como glutamina como fuentes de nitrógeno, de manera similar a como lo hace MX902 (glnG74::Tn5), como se vé en la fig. 9. En estricta concordancia, ambas cepas son hipersensibles a MS a concentraciones de 80 μM y en presencia de NH_4Cl 15mM como fuente de nitrógeno y son Aut^- (fig.9).

Con respecto a la frecuencia de reversión a MS^{R*} , se ha encontrado que la cepa MX902 genera este tipo de revertantes a una frecuencia de 1×10^{-7} (A. Osorio, datos no publicados), mientras que la cepa MX921 las genera a una frecuencia de 3.6×10^{-5} . Esta elevación en frecuencia podría deberse a la naturaleza multicopia de pACR74.

5.- Actividad específica de GS en MX920 y MX921.

Posteriormente se determinó la actividad específica de GS en MX920 y MX921. La cepa MX920 carece de actividad detectable de GS al igual que la cepa MX727, como se esperaba de la caracterización de glnA71::Tn5 (tabla 2). Por otro lado, la cepa MX902 presenta una constitutividad a bajo nivel para la actividad de GS; sin embargo, la cepa MX921 (pACR74) es constitutiva para la actividad de GS, pero los niveles de actividad alcanzados son aún mayores que los de MX922 (pACR1) en condiciones de represión (tabla 2). Estos resultados pueden explicarse por la naturaleza multicopia de pACR74, así como al hecho de que este plásmido carece del producto del gene glnG, eliminándose así cualquier posibilidad de represión.

6.- Análisis en el sistema de minicélulas de los polipéptidos sintetizados por pACR1 y pACR74.

Como se mencionó anteriormente, el alelo glnA71::Tn5 se encuentra extensamente caracterizado tanto genética como bioquímicamente. Sin embargo, el alelo glnG74::Tn5 no ha sido caracterizado aún con respecto a los productos sintetizados por él.

Se ha identificado al producto del gene glnG como un polipéptido de

* Esta se realizó en presencia de kanamicina para evitar la aparición de revertantes en las que se hubiera escindido Tn5.

aproximadamente 54 kdal. El análisis de los productos polipeptídicos sintetizados por mutantes glnG mostró en la mayoría de los casos la pérdida del polipéptido de 54 kdal y la aparición de polipéptidos de menor peso molecular (Mc Farland et al., 1981; Backman et al., 1981). Dada la localización del alelo glnG74::Tn5 y la dirección de transcripción, debería de haberse eliminado la síntesis del polipéptido de 54 kdal. Con el fin de identificar el producto del gene glnG en pACR1, se decidió hacer el análisis de los polipéptidos sintetizados en un sistema de minicélulas dirigido por pACR74 o pACR1.

Para la identificación del producto del gene glnG se utilizó un extracto de minicélulas de pACR3, donde previamente se había identificado este producto (Rocha, 1981). El análisis de los productos se llevó a cabo por electroforesis bidimensional según la técnica de O'Farrell, debido a que la gran variedad de proteínas en estos extractos hacía imposible su análisis por electroforesis unidimensional.

En la fig. 10 se muestra el resultado de este experimento. El producto del gene glnG en pACR1 presenta un peso molecular aproximado de 53 kdal. Como se observa en la figura, este polipéptido desaparece de los productos de pACR74.

Estos datos confirman las evidencias previas, obtenidas por análisis de complementación (Osorio et al., en preparación; Rocha y Covarrubias, datos no publicados) y por hibridización tipo Southern (Osorio et al., en preparación), las cuales concluyen que la inserción de Tn5 en glnG74::Tn5 evita la síntesis del producto de glnG.

Una posibilidad adicional de investigación radica en el aislamiento de mutantes MS^R de MX921. Al aislarse mutantes MS^R de MX902, se han obtenido alelos (i.e. gln-76) los cuales pensamos que afectan la región reguladora de glnA. El aislamiento de mutantes similares a las anteriores en plásmidos tales como pACR74, nos permitirá el análisis mutacional de la región

regulatoria de glnA con la ayuda de los métodos de ingeniería genética molecular.

Otra posibilidad futura de investigación se encuentra en el análisis de los productos polipeptídicos sintetizados en un sistema de minicélulas dirigido por pACR71. Como se describió en la introducción, la región glnA-glnG parece comportarse, por lo menos en algunas circunstancias, como un operón cuya transcripción se originaría en el promotor de glnA (fig.3). De acuerdo a esta hipótesis, al analizarse los productos sintetizados por pACR71, debería observarse una disminución en la cantidad del producto de glnG, debido al efecto polar impuesto por Tn5. Una ventaja adicional de este sistema es que puede eliminarse la polaridad de Tn5 por un método in vitro, el cual deja una mutación sitio-específica no polar (Pannekoek et al., 1980).

En este caso, los niveles del producto de glnG deberían aumentar a los encontrados en un plásmido silvestre. Este tipo de experimentos aportarían una evidencia molecular para la hipótesis del operón en la región glnA-glnG. Recientemente ha sido clonada en pACR1 una mutación que pensamos afecta glnL, por métodos análogos a los descritos en este trabajo (J.C. Urbina, comunicación personal).

7.- Clonación in vivo del alelo gln-76.

Se ha observado que la cepa MX902 (glnG74::Tn5 cromosomal) es capaz de revertir a un fenotipo MS^R a una frecuencia de 1×10^{-7} , aún bajo presión selectiva en presencia de kanamicina para evitar el enriquecimiento de segregantes que hayan perdido Tn5. Una de estas mutantes, llamada gln-76, presenta las siguientes características:

- a) gln-76, en un contexto glnG74::Tn5, confiere un fenotipo MS^R y una constitutividad a alto nivel para la síntesis de GS. Esta cepa es sin embargo Aut⁻. Por tanto, gln-76 suprime solo aquellas funcio-

nes de glnG relacionadas a la expresión de glnA, pero no aquellas relacionadas a la expresión del fenotipo Aut.

- b) gln-76, en un contexto silvestre, presenta una síntesis normal de GS en condiciones de inducción, pero una síntesis de GS menos susceptible a represión que la cepa silvestre. Esta cepa es además Aut⁺ y MS^R.
- c) gln-76, en un contexto glnF73::Tn5, presenta una actividad intermedia constitutiva de GS y es MS^S y Aut⁻. Por tanto, gln-76 permite que la expresión de glnA sea independiente de los productos de glnG y glnF.
- d) El mapeo por transducción de gln-76 muestra que esta mutación está 100% ligada a glnA.
- e) gln-76 es cis-dominante frente a el alelo silvestre.
- f) La GS purificada de una cepa gln-76 es igualmente sensible a inhibición por MS que la GS de una cepa silvestre.

Pensamos que estas evidencias sugieren que gln-76 afecta la región regulatoria de glnA, eliminando la necesidad de activadores para que exista promoción y disminuyendo la eficiencia de interacción con el represor (Osorio et al., en preparación). Es interesante hacer notar que el único reporte en que se pretende haber aislado mutantes en la región regulatoria de glnA fue hecho con Klebsiella aerogenes (Rothstein et al., 1980). Dada la falta de información sobre este tipo de mutantes en E. coli, la caracterización de gln-76 es de suma importancia.

Nosotros pensamos que es deseable el localizar el alelo gln-76 a nivel de secuencia nucleotídica. Al analizarse la secuencia de la región regulatoria de glnA, se identificaron tres regiones con homología variable a un promotor "consenso" (Covarrubias y Bastarrachea, 1983). Se desconoce cuál o cuáles de estas regiones podrían ser activas in vivo. De estar localizado gln-76 en esta zona, su análisis nos permitiría relacionar funciones

específicas con la estructura de la r-gión regulatoria de glnA.

Para la clonación del alelo gln-76 en el plásmido pACR1, se utilizó la metodología de clonación anteriormente descrita, como se muestra en la fig. 11. Esta estrategia se basó en la alta cotransducción observada (100%) entre glnA y gln-76 (A. Osorio, datos no publicados). lo cual facilita la obtención del plásmido deseado. Para la clonación in vivo de gln-76 se utilizó la cepa MX966 (pACR71) como la cepa receptora en una transducción con fago P1 propagado en la cepa MX929 (gln-76 cromosomal), seleccionándose las transductantes Gln^+ . Esta transducción podría generar tres tipos de recombinantes, mostradas en la figura 12. El primer tipo de recombinante tendría un fenotipo $Gln^+ MS^R Kan^S$ y $ColEI^{IMM}$. El segundo tipo de recombinante daría un fenotipo $Gln^+ MS^R Kan^R$ y $ColEI^{IMM}$; el tercer tipo de recombinante presentaría un fenotipo $Gln^+ MS^R Kan^S$ y $ColEI^S$.

A partir de una de las recombinantes del primer tipo, se aisló plásmido y se transformó con él a la cepa MX919, seleccionándose las transformantes Gln^+ . El 100% de las transformantes presentaron un fenotipo $Gln^+ MS^R Kan^S$. El análisis por restricción con la enzima PstI de los plásmidos en estas transformantes mostró la existencia en todos los casos analizados de un plásmido con un patrón de restricción idéntico a pACR1. Esto es compatible con la hipótesis de que gln-76 es una mutación puntual o bien una pequeña inserción o deleción que no es detectable por este método.

Por otro lado, se eligieron dos transformantes al azar (MX990-1 y MX990-2) y se les midió actividad de GS (tabla 3). Ambas transformantes presentaron una actividad de GS en condiciones de desrepresión similar a la obtenida con el plásmido silvestre (MX922). Sin embargo, las transformantes presentaron una actividad de GS mayor, en condiciones de represión, a la obtenida con la cepa MX922. Este comportamiento es característico de cepas con la mutación gln-76, como puede verse en la tabla 3.

Para comprobar que la mutación que confiere el fenotipo antes men-

cionado radica en un plásmido, se aisló plásmido de la cepa MX990-1 y se transformó con él a la cepa MX914, seleccionándose las transformantes Gln⁺. De 20 transformantes analizadas, todas ellas presentaban un plásmido con un patrón de restricción con PstI idéntico al de pACR1 y con una actividad de GS cualitativamente similar a la observada en MX990-1. Estos resultados confirman que hemos clonado el alelo gln-76 en pACR1, llamándose a este plásmido pACR76.

8.- Caracterización fenotípica de MX990.

Se analizó el comportamiento de crecimiento de MX990 en distintas condiciones nitrogenadas. Estos resultados se muestran en la figura 9. Como se vé, MX990 es capaz de crecer en todas las condiciones nitrogenadas probadas con una velocidad similar a la de MX922. Este resultado era de esperarse, dado que las cepas con los alelos cromosomales correspondientes (MX929 y MX615) presentan un comportamiento similar.

La caracterización física y funcional de pACR76 es aún incompleta. En este trabajo se planteó la necesidad de localizar el alelo gln-76 por secuencia nucleotídica. Sin embargo, recientemente se ha encontrado que el patrón de restricción de pACR76 con la enzima HaeIII difiere del obtenido para pACR1 (P. León y A. Covarrubias, comunicación personal). Pensamos que esto facilitará grandemente la localización de esta mutación.

Se ha propuesto que glnA-glnG puede comportarse como un operón cuya transcripción se originaría en el promotor de glnA. De acuerdo a esta hipótesis, al analizarse los productos polipeptídicos sintetizados en un sistema de minicélulas dirigido por pACR76, debería observarse un aumento en los niveles del producto de glnG en comparación a los observados con pACR1. Esto aportaría nueva evidencia para la hipótesis del operón en la región glnA-glnG.

9.- Análisis de la hipersensibilidad a MS en las cepas glnG por inmunoelectroforesis cuantitativa.

En el transcurso de este estudio hemos estado involucrados en el fenómeno de hipersensibilidad a MS presentado por las cepas glnG. Esta característica ha sido de importancia para la clonación de glnG74::Tn5, además de que constituye un antecedente importante en el aislamiento del alelo gln-76. Dado que el objetivo de este trabajo es correlacionar la información física y funcional de los alelos clonados con su comportamiento in vivo, es importante para nosotros el determinar la causa de la hipersensibilidad a MS.

En nuestro laboratorio se ha encontrado que todas las mutantes glnG probadas son hipersensibles a MS. A una concentración de 80 μM y en presencia de NH_4Cl 15 mM, las células glnG son incapaces de crecer, mientras que las células glnG^+ sí lo hacen. A esta misma concentración, MS inhibe el crecimiento tanto de las células glnG como de las células glnG^+ , si se disminuye la concentración de NH_4Cl a 0.5 mM (Osorio et al., manuscrito en preparación). Es un hecho bien conocido que MS inhibe irreversiblemente a GS en presencia de ATP, debido a la formación de metionina sulfoximina fosfato, el cual se une a GS provocando su inhibición (Weisbrod y Meister, 1973; Meister, 1980). Por tanto, podría afirmarse que el fenómeno de hipersensibilidad a MS se debe a que las células glnG sintetizan cantidades pequeñas de GS, por lo que la célula sería más vulnerable a inhibición por MS. Las células glnG^+ serían resistentes a inhibición debido a que sintetizarían una cantidad relativamente mayor de enzima. Sin embargo, el hecho de que las células glnG sean hipersensibles a MS cuando se crecen en NH_4Cl 0.5 mM, a pesar de que la actividad de GS es muy alta, nos lleva a concluir que este no es el único factor involucrado.

Una posibilidad sería el involucrar a varios factores como los responsables de la hipersensibilidad a MS, los cuales son:

- a) Inhibición irreversible de GS por MS.- además de la evidencia referente a inhibición de GS por MS, se han reportado un grupo de mutantes de Salmonella typhimurium las cuales son resistentes a una concentración de 1mM de MS. La GS de éstas mutantes posee una Km para NH_4^+ y para glutamato más alta que la GS de la cepa silvestre y poseen una actividad de sintetasa resistente a inhibición por MS (Miller y Brenchley, 1981).
- b) Actividad de la permeasa de glutamina.- MS inhibe el crecimiento de Chlorella vulgaris. Esta inhibición se previene por la adición de metionina y glutamina exógenas, por lo que se postula que MS entra a la célula a través de las permeasas para estos aminoácidos (Meins y Abrams, 1972). De manera similar, las mutantes MS^R de S. typhimurium son dobles mutantes que afectan metP y glnP, que son los genes que codifican para las permeasas de metionina y glutamina, respectivamente (Betteridge y Ayling, 1975). En E. coli se ha reportado que pueden obtenerse mutantes resistentes a MS por alteraciones en el gene glnP, el cual codifica para la permeasa de glutamina (Masters y Hong, 1981). Todas estas evidencias sugieren que los niveles de la permeasa de glutamina son importantes para que una célula sea resistente o sensible a MS.

En E. coli se ha reportado que la regulación de la permeasa de glutamina obedece a un control nitrogenado. En condiciones de limitación de nitrógeno se desreprimen tanto GS como el sistema de transporte de glutamina, mientras que en condiciones de exceso de nitrógeno se reprimen ambos sistemas (Willis et al., 1975). Este hecho podría explicar el por qué las células glnG⁺ son hipersensibles a MS en presencia de NH_4Cl 0.5 mM (limitación de nitrógeno).

Se ha reportado que mutaciones en los genes glnL, glnG o glnF pueden alterar los niveles de permeasa de glutamina. En S. typhimurium, las mutantes en glnL presentan una actividad de permeasa de glutamina mayor que la observada en la cepa silvestre (Kustu et al., 1979b), mientras que las mutantes en glnF o glnG presentan una actividad disminuida de esta permeasa. En base a estos datos se postula que glnF y glnG serían elementos regulatorios positivos en la síntesis de la permeasa de glutamina (Kustu et al., 1979b; 1980)

- c) Nivel de GS y pozas intracelulares de glutamina.-En este respecto MS podría inhibir el crecimiento de la célula si esta poseyera una baja actividad de GS, conjuntamente con una poza intracelular baja de glutamina.

Aún y cuando la consideración de estos datos podría explicar algunos de nuestros resultados, no explica otros. Específicamente, en S. typhimurium se han aislado mutantes resistentes a MS, las cuales son braditróficas para glutamina y presentan una actividad baja de GS y GOGAT, aunque ninguna de las proteínas respectivas se encuentra alterada (Steimer-Veale y Brenchley, 1974). Otro dato difícil de explicar es el por qué la cepa que porta el plásmido pACR74 es MS^S, a pesar de que posee una actividad de GS mayor que la cepa con el alelo silvestre en el cromosoma y que debería poseer una actividad disminuida de permeasa de glutamina. Por último, una cepa que posee una delección cromosomal de la región glnA-glnG y un plásmido que lleva solamente glnA posee una actividad alta constitutiva de GS. A pesar de esto y de que debería poseer una actividad baja de la permeasa de glutamina, la cepa es MS^S. (L. Servín, datos no publicados).

Una hipótesis alterna podría ser que MS actuase como un elemento regulatorio negativo en la síntesis de GS. Esta hipótesis tiene como premisa básica el que MS podría unirse a una de las moléculas encargadas de regu-

lar negativamente glnA (probablemente el producto de glnL) actuando como un falso correpresor. De esta manera, uno de los factores que determinaría el que una célula fuera sensible o resistente a MS sería la existencia de un regulador positivo que "titulase" el represor. Una célula glnG carecería del regulador positivo, por lo que los efectos del represor se expresarían al máximo.

La evidencia más importante para esta hipótesis ha sido hallada en el microorganismo Streptomyces cattleya. En este organismo, al analizarse los extractos de células crecidas con MS, se encontró que la cantidad de GS era menor que la observada en células no tratadas con MS. Se propone, por tanto, que MS además de inhibir la actividad de GS puede reprimir la síntesis de esta enzima (Streicher et al., 1981). Sin embargo este efecto parece no ser general, ya que en la cianobacteria Anabaena spp. cepa 7120 no se observan diferencias en la cantidad de GS en células crecidas con o sin MS. (Orr y Haselkorn, 1982).

La primera hipótesis descrita para explicar la hipersensibilidad a MS (inhibición de la actividad de GS, actividad de la permeasa de glutamina, etc.) presupone que la concentración de GS en células crecidas con MS debe ser igual o mayor a la observada en células crecidas sin el análogo. Por el contrario, la hipótesis que postula a MS como un correpresor de la síntesis de GS, predice que la concentración de la enzima en células crecidas con MS debe ser menor que la que se encuentre en células crecidas sin MS. Para discernir entre estas dos hipótesis, se decidió cuantificar la concentración de GS en células crecidas con y sin MS por inmunoelectroforesis cuantitativa.

En la inmunoelectroforesis cuantitativa, el anticuerpo monoespecífico contra GS se encuentra distribuido uniformemente en una placa de agarosa. La mezcla antigénica se coloca en pozos localizados en un extremo de la placa y se somete a electroforesis. Al migrar, el antígeno es reconocido

inmunológicamente por el anticuerpo, formándose un inmunoprecipitado en forma de cono (rocket) cuya área es proporcional a la cantidad de antígeno existente en la muestra.

En la fig.13 se muestra una inmunolectroforesis cuantitativa en la que se ajustó el antígeno a diversas concentraciones de proteína extraída. Se utilizaron como antígenos extractos de las cepas MX614 (silvestre), MX927 (glnG74::Tn5,gln-76) y MX929 (gln-76) crecidas en NH_4Cl 15 mM con y sin MS. Como se observa en esta figura, cuando las cepas MX614, MX927 y MX929 son crecidas en presencia de MS (pozos 2,4 y 9, respectivamente), la concentración de GS es mayor que cuando estas cepas son crecidas en ausencia de MS (pozos 1,3 y 8, respectivamente). Estos resultados están en contra de la hipótesis que postula a MS como un correpresor de la síntesis de GS, siendo estos resultados más compatibles con una hipótesis que contemple a la hipersensibilidad a MS como la resultante de inhibición de GS por MS, variaciones en la actividad de la permeasa de glutamina y pozos intracelulares de glutamina.

La concentración de una enzima depende tanto de su velocidad de síntesis, que no presenta retroinhibición, como de su velocidad de degradación, que depende de su concentración (Berlin y Schimke, 1965). Por tanto, se ha propuesto que la expresión que indica el cambio en la concentración de una enzima (E) en el tiempo es:

$$\frac{dE}{dt} = S - K(E)$$

donde S y K se refieren a las constantes de velocidad de síntesis y degradación, respectivamente. Por tanto, la concentración de la enzima en estado estacionario puede expresarse como:

$$E = \frac{S}{K} \quad (\text{Berlin y Schimke, 1965}).$$

Los resultados observados en la figura 13 y en la tabla 4 muestran

que las células crecidas en presencia de MS presentan una concentración de GS mayor que la encontrada en células crecidas en ausencia del inhibidor. Estos resultados pueden explicarse asumiendo que MS aumenta la velocidad de síntesis de GS o que MS disminuye la velocidad de degradación de GS. Aunque la mejor interpretación de estos datos solo podrá alcanzarse por la medición de las velocidades relativas de síntesis y degradación de GS y por un análisis de la concentración de mensajero específico, pensamos que nuestros resultados son compatibles con un aumento en la velocidad de síntesis de GS provocada por MS, en base a evidencias resumidas a continuación.

Previamente se ha descrito que cuando Klebsiella aerogenes es crecida en condiciones de limitación de nitrógeno se observa una degradación de GS, por medio de un sistema de inactivación oxidativa y proteólisis (Levine et al., 1981). En contraste a lo descrito para K. aerogenes, en E. coli K-12 no se observa esta degradación; probablemente esto sea debido a la alta actividad de catalasa presente en E. coli (Levine et al., 1981). Nuestros resultados están en contra de que MS disminuya la velocidad de degradación de GS. De ser éste el caso, todas las cepas tratadas con MS deberían acumular más GS que las no tratadas con MS y la relación GS tratada con MS/GS no tratada con MS debería ser similar en todos los casos. Los resultados mostrados en la fig. 13 y en la tabla 4 muestran que éste no es el caso. La relación observada entre la concentración de GS en células tratadas vs. no tratadas con MS varía en rangos amplios, lo cual arguye en contra de ésta idea.

Pensamos que el aumento en la concentración intracelular de GS en células crecidas con MS puede explicarse mejor por una elevación en la velocidad de síntesis de GS. Las evidencias cruciales para esta interpretación son las siguientes:

- a) Debido a la inactivación de GS por MS (Meister, 1980), la poza intracelular de glutamina debe bajar y aumentar la de 2-oxoglu-

tarato, comparada a las pozas en células no tratadas con MS.

- b) Los niveles relativos de 2-oxoglutarato/glutamina intracelulares son importantes, dado que el sistema de adenilación y desadenilación de GS responde a los niveles relativos de estos metabolitos (fig. 2). Cuando la relación 2-oxoglutarato /glutamina es alta, se estimula la desadenilación de GS; de esta manera la proteína P_{II} se encuentra en su forma uridilada ($P_{IID-UMP}$), la cual estimula a la adeniltransferasa para que desadenile GS (Tyler, 1978; Stadtman et al., 1980).
- c) Magasanik y colaboradores proponen que la proteína P_{IIA} impide que GS se sintetice a niveles altos, mientras que la proteína $P_{IID-UMP}$ tendría el efecto contrario (Rothstein y Magasanik, 1980; Foor et al., 1980; Reuveny et al., 1981).

Por tanto, cuando E. coli se crece en condiciones de exceso de nitrógeno (NH_4Cl 15 mM), la relación 2-oxoglutarato/glutamina debe de ser baja y los niveles de P_{IIA} altos, lo cual provoca la adenilación de GS. La elevación de los niveles de P_{IIA} disminuye por tanto la síntesis de GS. Cuando se crece E. coli en NH_4Cl 15 mM con 80 μM de MS, la relación 2-oxoglutarato/glutamina debe ser alta y los niveles de $P_{IID-UMP}$ altos, lo cual provoca la desadenilación de GS. En apoyo a esta noción, se ha encontrado que la adición del análogo de glutamina 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON) a células de E. coli provoca la desadenilación de GS (Wohlhueter et al., 1973). Dado que la proteína $P_{IID-UMP}$ se encuentra en niveles altos, esto provocaría un aumento en la síntesis de GS.

En apoyo a esta interpretación, nuestros datos muestran que las cepas capaces de aumentar la síntesis de GS (MX614 y MX929) presentan una acumulación de GS cuando son crecidas con MS, mientras que una cepa constitutiva (MX927) presenta una concentración inalterable de GS, independientemente de la presencia o ausencia de MS en el medio de cultivo. Este efecto no es

único para el sistema glnA; se ha descrito que la adición de DON o MS al medio de cultivo de Salmonella typhimurium provoca una elevación de la síntesis de guanosina monofosfato reductasa (Garber et al.,1980). Sin embargo esta es la primera vez que se sugiere que la adición de MS provoca un aumento en la concentración intracelular de GS.

La regulación de la expresión de glnA por metabolitos tales como glutamina y amonio y el papel que en ella juegan diversos factores como los productos de los genes glnG,glnL y glnF es un punto de capital importancia, hasta el momento pobremente analizado. Pensamos que el estudio de la hipersensibilidad a MS, en conjunción a las posibilidades de análisis molecular planteadas en este trabajo, podrá aportar respuestas importantes a este complejo problema.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Bachmann,B.J.;K.B. Low(1980).- Linkage Map of Escherichia coli K-12. Edition 6. Microbiol. Revs.,44(1):1-56.
- 2.- Backman,K.Y.;Y.-M. Chen;B. Magasanik(1981).- Physical and genetic characterization of the glnA-glnG region of the Escherichia coli chromosome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,78(6):3743-3747.
- 3.- Barker,D.F.;J. Kuhn;A.M. Campbell (1981).- Sequence and properties of operator mutations in the bio operon of Escherichia coli. Gene,13:89-102.
- 4.- Bastarrachea,F.;S. Brom;A.A. Covarrubias;A. Osorio;F. Bolívar(1980).- Genetic Characterization of Mutations Affecting Glutamine Biosynthesis and its Regulation in Escherichia coli K-12. En Glutamine:Metabolism, Enzymology and Regulation.J. Mora y R. Palacios,eds. Pp.107-121. Academic Press.
- 5.- Bender,R.A.;L.J. Eades(1982).- A Nonsense Mutation in the Structural Gene for Glutamine Synthetase Leading to Loss of Nitrogen Regulation in Klebsiella aerogenes. Mol.Gen. Genet.,187:414-418.
- 6.- Bender,R.A.;B. Magasanik(1977).- Regulatory Mutants in the Klebsiella aerogenes Structural Gene for Glutamine Synthetase. J. Bacteriol.,132: 100-105.
- 7.- Bender,R.A.;K.A. Janssen;A.D. Resnick;M. Blumenberg;F. Foor;B. Magasanik(1977).- Biochemical Parameters of Glutamine Synthetase from Klebsiella aerogenes. J. Bacteriol.,129:1001-1009.
- 8.- Berlin,Ch.M.;R.T. Schimke(1965).- Influence of Turnover Rates on the Responses of Enzymes to Cortisone. Mol. Pharmacol.,1:149-156.
- 9.- Betlach,M.;V. Hershfield;L. Chow W. Brown;H.M. Goodman;H.W. Boyer(1976).- A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling

- the EcoRI restriction and modification of DNA. Fed. Proc.,35:2037-2043.
- 10.-Betteridge,P.R.;P.D. Ayling(1975),- The Role of Methionine Transport-defective Mutations in Resistance to Methionine Sulphoximine in Salmonella typhimurium. Mol. Gen. Genet.,138:41-52.
 - 11.-Bolívar,F.;R.L. Rodríguez;M.C. Betlach;H.W. Boyer(1977).- Construction and Characterization of New Cloning Vehicles.I. Ampicillin-Resistant Derivatives of the Plasmid pMB9. Gene,2:75-93.
 - 12.- Bonner,W.M.;R.A. Laskey(1974).- A film detection method for tritium-labeled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. Eur. J. Biochem.,46:83-88.
 - 13.-Brenchley,J.E.;D.M. Bedwell;S.M. Dendinger;J.M. Kuchta(1980).- Analysis of mutations affecting the regulation of nitrogen utilization in Salmonella typhimurium. En J. Mora y R. Palacios,ob. cit.,Pp.79-93.
 - 14.-Brom,S.,(1980).- Obtención y caracterización de mutaciones en la región glnA del cromosoma de Escherichia coli K-12. Tesis. Licenciatura en Investigación Biomédica Básica.
 - 15.-Brom,S.(1982).- Caracterización de mutaciones en la región glnA del cromosoma de Escherichia coli K-12.Tesis. Maestría en Investigación Biomédica Básica.
 - 16.-Cohen,S.N.;A.C.Y. Chang;L. Hsu(1972).- Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria:genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,69:2110-2114.
 - 17.-Covarrubias,A.A.;F. Bastarrachea(1983).- Nucleotide sequence of the glnA control region in Escherichia coli K-12. Mol. Gen. Genet.,en prensa.
 - 18.-Covarrubias,A.A.;R. Sánchez-Pescador;E. Lozoya;F. Bastarrachea;F. Bolívar(1980a).- Isolation of E. coli Chromosomal DNA Regions Carrying glnA,gdh and gltB Structural Genes.En J. Mora y R. Palacios,ob.cit., Pp,123-137.
 - 19.-Covarrubias,A.A.;R. Sánchez-Pescador;A. Osorio;F. Bolívar;F. Bastarra-

- chea(1980b).- ColE1 Hybrid Plasmids Containing Escherichia coli Genes Involved in the Biosynthesis of Glutamate and Glutamine. Plasmid,3:150-164.
- 20.-Covarrubias,A.A.;M. Rocha;F. Bolívar;F. Bastarrachea(1980c).- Cloning and physical mapping of the glnA gene of Escherichia coli K-12. Gene,11:239-251.
- 21.-Chen,Y.-M.;K. Backman;B. Magasanik(1982).- Characterization of a Gene, glnL,the Product of Which is Involved in the Regulation of Nitrogen Utilization in Escherichia coli. J. Bacteriol.,150(1);214-220.
- 22.-Egner,C.;D.E. Berg(1981).- Excision of Transposon Tn5 is dependent on the inverted repeats but not on the transposase function of Tn5. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,78:459.
- 23.-Foor,F.;Z. Reuveny;B. Magasanik (1980).- Regulation of synthesis of glutamine synthetase by the P_{II} protein in Klebsiella aerogenes . Proc. Natl. Acad. Sci. USA,77(5):2636-2640.
- 24.-Garber,B.B.;B.U. Jochimsen;J.E. Gots (1980).- Glutamine and Related Analogs Regulate Guanosine Monophosphate Reductase in Salmonella typhimurium. J. Bacteriol.,143(1):105-111.
- 25.-Ginsburg,A.;E.R. Stadtman(1973).- Regulation of Glutamine Synthetase in Escherichia coli. En The Enzymes of Glutamine Metabolism. S. Prusiner y E. R. Stadtman,eds. Pp,9-43. Academic Press.
- 26.- Greene,P.J.;H.L. Heyneker;F. Bolívar;R.L. Rodríguez;M.C. Betlach; A.A. Covarrubias;K. Backman;D.J. Russell;R. Tait;H.W. Boyer (1978).- A general method for the purification of restriction enzymes. Nucl. Acids Res.,5:2373-2380.
- 27.-Guterman,S.K.;G. Roberts;B. Tyler(1982).-Polarity in the glnA Operon: Suppression of the Reg⁻ Phenotype by rho Mutations. J. Bacteriol.,150(3): 1314-1321.

- 28.-Holmes,D.S.;M. Quigley(1981).- A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids, *Anal. Biochem.*,114:193.
- 29.-Horwitz,A.H.;C. Morandi;G. Wilcox(1980).- Deoxyribonucleic Acid Sequence of araBAD Promoter Mutants of Escherichia coli, *J. Bacteriol.*,142(2): 659-667.
- 30.-Jenkins,J.M.;H. Bennett(1976).- Effect of mutations in deoxyribonucleic acid repair pathways on the sensitivity of Escherichia coli strains to nitrofurantoin, *J. Bacteriol.*,125:1214-1216.
- 31.-Jorgensen,R.A.;S.J. Rothstein;W.S. Reznikoff(1979).- A restriction enzyme cleavage map of Tn5 and location of a region encoding kanamycin resistance. *Mol. Gen. Genet.*,177:65
- 32.-Koduri,R.K.;D.M. Bedwell;J.E. Brenchley(1980).- Characterization of a Hind III-generated DNA fragment carrying the glutamine synthetase gene of Salmonella typhimurium. *Gene*,11:227-237
- 33.-Kustu,S.;D. Burton;E. Garcia;L.McCarter;N.McFarland(1979a).-Nitrogen control in Salmonella:Regulation by the gln R and gln F Gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(9):4576-4580.
- 34.-Kustu,S.G.; N.McFarland;S.P.Hui;B.Esmon;G.Ferro-Luzzi Ames(1979b).- Nitrogen control in Salmonella typhimurium: Co-Regulation of Synthesis of Glutamine Synthetase and Amino Acid Transport Systems, *J. Bacteriol.*, 138(1):218-234
- 35.-Kustu,S.;D. Burton;E. Garcia;L. Mc Carter;N. Mc Farland(1980).- Nitrogen Regulation in Salmonella typhimurium. *En J. Mora y R. Palacios*, ob. cit.,Pp.95-105.
- 36.-Laemmli,U.K.(1970).- Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*,227:680.
- 37.-Levine,R.L.;C.N. Oliver;R.M. Fulks;E.R. Stadtman(1981).- Turnover of bacterial glutamine synthetase:oxidative inactivation precedes proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,78(4):2120-2124.
- 38.-Lowry,O.H.;N.J. Rosebrough;A.L. Farr;R.J. Randall(1951).- Protein mea-

- surements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265-275.
- 39.-Masters, P.S.; J.-S. Hong (1981).- Genetics of the Glutamine Transport System in Escherichia coli. J. Bacteriol., 147(3):805-819.
- 40.-Mc Farland, N.; L. Mc Carter; S. Artz; S. Kustu (1981).- Nitrogen regulatory locus "glnR" of enteric bacteria is composed of cistrons ntrB and ntrC: Identification of their protein products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78(4):2135-2139.
- 41.-Mc Neil, T.; D. Mc Neil; B. Tyler (1982).- Fine-Structure Deletion Map and Complementation Analysis of the glnA-glnL-glnG region in Escherichia coli. J. Bacteriol., 150(3):1302-1313.
- 42.-Meagher, R.B.; R.C. Tait; M. Betlach; H.W. Boyer (1977).- Protein expression in E. coli minicells by recombinant plasmids. Cell, 10:521-536.
- 43.-Meins Jr., F.; M.L. Abrams (1972).- How methionine and glutamine prevent inhibition of growth by methionine sulfoximine. Biochim. Biophys. Acta, 266:307-311.
- 44.-Meister, A. (1980).- Catalytic Mechanisms of glutamine synthetase: overview of glutamine metabolism. En J. Mora y R. Palacios, ob. cit., pp. 1-40.
- 45.-Miller, J.H. (1972).- Experiments in Molecular Genetics (2a, ed.). Cold Spring Harbor Laboratory.
- 46.-Miller, E.S.; J.E. Brenchley (1981).- L-Methionine-SR-Sulfoximine resistant glutamine synthetase from mutants of Salmonella typhimurium. J. Biol. Chem., 256:11307-11312.
- 47.-Miller, R.E.; E. Shelton; E.R. Stadtman (1974).- Zinc-induced paracrystalline aggregation of glutamine synthetase. Arch. Biochem. Biophys., 163:155.
- 48.-O'Farrell, P.H. (1975).- High-resolution, two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem., 250:4007-4021.
- 49.-Orr, J.; R. Haselkorn (1982).- Regulation of Glutamine Synthetase Activity and Synthesis in Free-Living and Symbiotic Anabaena spp. J. Bacteriol., 152(2):626-635.

- 50.-Pahel,G.;A.D. Zelenetz;B.M. Tyler(1978).- gltB Gene and Regulation of Nitrogen Metabolism by Glutamine Synthetase in Escherichia coli. J. Bacteriol.,133:139-148.
- 51.-Pahel,G.;F.R. Bloom;B.Tyler(1979a).- Deletion mapping of the polA-metB region of the E. coli chromosome.J. Bacteriol.,138:653.
- 52.-Pahel,G.;B. Tyler(1979b).- A new glnA linked regulatory gene for glutamine synthetase in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,76(9): 4544-4548.
- 53.-Pahel,G.;D.M. Rothstein;B. Magasanik(1982).- Complex glnA-glnL-glnG Operon in Escherichia coli. J. Bacteriol.,150(1):202-213.
- 54.-Pannekoek,H.;J. Hille;I. Noordermeer(1980).- Relief of polarity caused by transposon Tn5:application in mapping a cloned region of the Escherichia coli uvrB locus essential for UV resistance. Gene,12:51-61.
- 55.-Reuveny,Z.;F. Foor;B. Magasanik(1981).- Regulation of Glutamine Synthetase by Regulatory Protein P_{II} in Klebsiella aerogenes Mutants Lacking Adenyltransferase.J. Bacteriol.,146(2):740-745.
- 56.-Rocha Sosa,Mario(1981).- Caracterización de plásmidos híbridos que codifican para glutamina sintetasa de Escherichia coli K-12.Tesis. Químico Farmacéutico Biólogo.
- 57.- Roozen,K.J.;R.G. Fenwick;R. Curtiss III(1971).- Synthesis of ribonucleic acid and protein in plasmid containing minicells of Escherichia coli K-12. J. Bacteriol.,107:21-33.
- 58.-Rothstein, D.M.; G. Pahel; B. Tyler; B. Magasanik (1980 a). Regulation of expression from the glnA promoter of Escherichia coli in the absence of glutamine synthetase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77(12): 7372-7376.
- 59.-Rothstein, D.M.; B. Magasanik (1980 b). Isolation of Klebsiella aerogenes Mutants cis - dominant for Glutamine Synthetase Expression. J. Bacteriol., 141(2):671-679.

- 60.-Rothstein, S.J.; R.A. Jorgensen; K. Postle; W. Reznikoff (1980).
The Inverted Repeats of tr5 are Functionally Different. *Cell*, 19:
795-805.
- 61.-Schwartz, S.A.; D.R. Helinski (1971). Purification and characterization
of Colicin E1. *J. Biol. Chem.*, 246:6318-6327.
- 62.-Servin, G., Luis (1981). Un nuevo fenotipo relacionado con la asimilación
de amonio por Escherichia coli K-12. Tesis Licenciatura en Biología.
- 63.-Shapiro, B.M.; E.R. Stadtman (1970). Glutamine synthetase (Escherichia
coli). En Methods in Enzymology. H. Tabor y C.N. Tabor, eds., Vol. 17A,
pp. 910-922. Academic Press.
- 64.-Stacey, K.A.; E. Simson (1965). Improved Method for the Isolation of
Thymine-Requiring Mutants of Escherichia coli. *J. Bacteriol.*, 90(2)
554-555.
- 65.-Stadtman, E.R. (1973). A note on the significance of glutamine in
intermediary metabolism. En the of Enzymes of Glutamine Metabolism. S.
Prusiner y E. R. Stadtman (eds.) Academic Press. pp. 1-6.
- 66.-Stadtman, E.R.; A. Ginsburg (1974). The Glutamine Synthetase of Escherichia
coli: structure and Control. En the Enzymes (3a. ed.) P.D. Boyero ed.
Vol. X, pp. 755-807. Academic Press.
- 67.-Stadtman, E.R.; U. Mura; P. Boonchock; S. Goo Rhee (1980). The intercon-
vertible enzyme cascade that regulates glutamine synthetase activity. En
Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation. J. Mora y R. Palacios
(eds.) pp. 41-59. Academic Press.
- 68.-Stauffer, G.V.; G. Zurawski; G. N. Bennett (1979). In vivo cloning of
DNA Regions Carrying Mutations Linked to Selectable Genes: Application
to Mutations in the Regulatory Region of the Escherichia coli Tryptophan
Operon. *Plasmid*, 2:498-502.

- 69.- Steimer-Veale, K.; J.E. Brenchley (1974). Characterization of Salmonella typhimurium Strains Sensitive and Resistant to Methionine Sulfoximine. J. Bacteriol. 119(3):848-856.
- 70.-Streicher, S.L.; P.S. Pares; B. Tyler (1981). Regulation of Glutamine Synthetase Formation in Streptomyces eatleya. Abstract. K. 181, Annual Meeting of the American Society for Microbiology. Dallas, Texas, 1981.
- 71.-Swanstrom, M.; M.H. Adams (1951).- Agar layer method for production of high titer phage stocks. Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 78:372.
- 72.-Tyler, B. (1978). Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. An. Rev. Biochem., 47: 1127-1162.
- 73.-Weeke, B. (1973). Rocket Immuno-electrophoresis. En: A Manual of Quantitative Immuno-electrophoresis. N.N. Axelsen, J. Kroll y B. Weeke, eds. pp. 37-46. Universitets Forlaget, Oslo.
- 74.-Wei, G.R.; S. Kustu (1981). Glutamine Auxotrophs with Mutations in a Nitrogen Regulatory Gene, ntnC that is Near qlnA. Mol. Gen. Genet., 183: 392-399.
- 75.-Weisbrod, R.E.; A. Meister (1973). Studies on Glutamine Synthetase from Escherichia coli. Formation of Pyrrolidone Carboxylate and Inhibition by Methionine Sulfoximine. J. Biol. Chem., 248:3997-4002.
- 76.-Willis, R.C.; K.K. Iwata; C.E. Furlong (1975). Regulation of Glutamine Transport in Escherichia coli. J. Bacteriol., 122(3):1032-1037.
- 77.-Wohlhueter, R.M., H. Schutt; H. Holzer (1973). Regulation of Glutamine Synthesis In vivo in E. coli. En: The Enzymes of Glutamine Metabolism. S. Prusiner y E.R. Stadtman (eds.). pp. 45-46. Academic Press.
- 78.-Yamamoto, T.; T. Yokota (1980). Construction of a physical map of a Kanamycin (Km) transposon, Tn5, and a comparison to another Km transposon, Tn903. Mol. Gen. Genet., 178-77.

79.- Mc Neil,T;G.P. Roberts;D. Mc Neil;B. Tyler (1982).- The Products of glnL and glnG are Bifunctional Regulatory Proteins. Mol. Gen. Genet., 188:325-333.

TABLA 1.-CEPAS BACTERIANAS.

CEPA	GENOTIPO.
MX614	F ⁻ <i>thi ilv680</i> Δ (<i>pro-lac</i>).
MX615	F ⁻ <i>thi ilv680</i> Δ (<i>pro-lac</i>) Δ (<i>gal-attλ-bio</i>).
MX727	F ⁻ <i>thi ilv680</i> Δ (<i>pro-lac</i>) Δ (<i>gal-attλ-bio</i>) <i>glnA71::Tn5</i> .
MX850	F ⁻ <i>thi ilv680</i> Δ (<i>pro-lac</i>) Δ (<i>gal-attλ-bio</i>) <i>supF</i> Δ (<i>zig-zih</i>) <i>zih::Tn5</i> .
MX902	F ⁻ <i>thi ilv680</i> Δ (<i>pro-lac</i>) <i>glnG74::Tn5</i> .
MX914	F ⁻ <i>thi ilv680</i> Δ (<i>pro-lac</i>) Δ (<i>gal-attλ-bio</i>) <i>supF</i> Δ (<i>zig-zih</i>)
MX918	F ⁻ <i>thi ilv680</i> Δ (<i>pro-lac</i>) Δ (<i>gal-attλ-bio</i>) <i>supF</i> Δ (<i>zig-zih</i>) <i>thyA</i> .
MX919	F ⁻ <i>thi ilv680</i> Δ (<i>pro-lac</i>) Δ (<i>gal-attλ-bio</i>) <i>supF</i> Δ (<i>zig-zih</i>) <i>recA56</i> .
MX920	Transformante MX919/pACR71.
MX921	Transformante MX919/pACR74.
MX922	Transformante MX919/pACR1.
MX924	Transformante MX914/pACR1.
MX927	F ⁻ <i>thi ilv680</i> Δ (<i>pro-lac</i>) <i>glnG74::Tn5 gln-76</i>
MX929	F ⁻ <i>thi ilv680</i> Δ (<i>pro-lac</i>) <i>gln-76</i> .
MX940	F ⁻ <i>thr leu thi-1 supE lacY tonA gal mal xyl ara mtl min</i> Δ (<i>zig-zih</i>) <i>zih::Tn5</i> .
MX966	Transformante MX914/pACR71.
MX967	Transformante MX940/pACR74.
MX968	Transformante MX940/pACR1.
MX990	Transformante MX919/pACR76.
AB1157	F ⁻ <i>thr-1 leu-6 thi-1 lacY1 galK2 ara14 xyl-5 mtl1 proA2</i> <i>his4 argE3 str31 tsx33 sup37</i> .

TABLA 2.- ACTIVIDAD ESPECIFICA DE GS EN CEPAS DE *Escherichia coli* K-12.

CEPAS	GENOTIPO Gln		ACTIVIDAD ESPECIFICA DE GS			
	Cromosomal	Plasmídico	Represión		Desrepresión	
			NH ₄	NH ₄ +MS	Gln	Arg
MX615	A ⁺ L ⁺ G ⁺	-----	0.148	0.05	1.79	1.55
MX850/pACR1	Δ(A-L-G)	A ⁺ L ⁺ G ⁺ (pACR1)	0.342	NP	2.17	NP
MX924	Δ(A-L-G)	A ⁺ L ⁺ G ⁺ (pACR1)	0.201	NP	2.68	NP
MX922	Δ(A-L-G)	A ⁺ L ⁺ G ⁺ (pACR1)	0.196	0.07	2.51	2.69
MX727	glnA71::Tn5	-----	----	----	<0.01	----
MX920	Δ(A-L-G)	glnA71::Tn5	----	----	<0.01	----
MX902	glnG74::Tn5	-----	0.06	----	0.05	----
MX921	Δ(A-L-G)	glnG74::Tn5	0.38	----	0.55	----

Abreviaturas: MS, L-metionina-DL-sulfoximina; Gln, L-glutamina; Arg, L-arginina; Np, condición no probada; --, ausencia de crecimiento.

Para el caso de MX727, MX920, MX902 y MX921, los cultivos contenían 30 µg/ml de sulfato de kanamicina.

TABLA 3.- ACTIVIDAD ESPECIFICA DE GS EN CEPAS DE *Escherichia coli* K-12.

CEPAS	GENOTIPO Gln		ACT. ESP. DE GS		Aumento en veces
	Cromosomal	Plasmídico	Repres.	Desrep.	
			NH ₄ Cl	Gln	
MX615	A ⁺ L ⁺ G ⁺	_____	0.122	1.79	14.67
MX929	<i>gln-76</i>	-----	0.444	1.68	3.8
MX922	Δ(A-L-G)	A ⁺ L ⁺ G ⁺ (pACR1)	0.282	5.05	17.92
MX990-1	Δ(A-L-G)	<i>gln-76</i> (pACR76)	1.645	5.36	3.26
MX990-2	Δ(A-L-G)	<i>gln-76</i> (pACR76)	1.863	4.03	2.16

Abreviaturas, condiciones de crecimiento y ensayo similares a la tabla 2.

TABLA 4.- Datos de la inmunoelectroforesis cuantitativa mostrada en la fig.13.

CEPA	CRECIMIENTO EN:	μg DE GS	μg de GS en MS/ μg de GS sin MS.
MX614	NH_4Cl	1.60	5.42
MX614	$\text{NH}_4\text{Cl} + \text{MS}$	8.67	
MX927	NH_4Cl	9.07	1.10
MX927	$\text{NH}_4\text{Cl} + \text{MS}$	10.00	
MX929	NH_4Cl	3.07	2.52
MX929	$\text{NH}_4\text{Cl} + \text{MS}$	7.73	

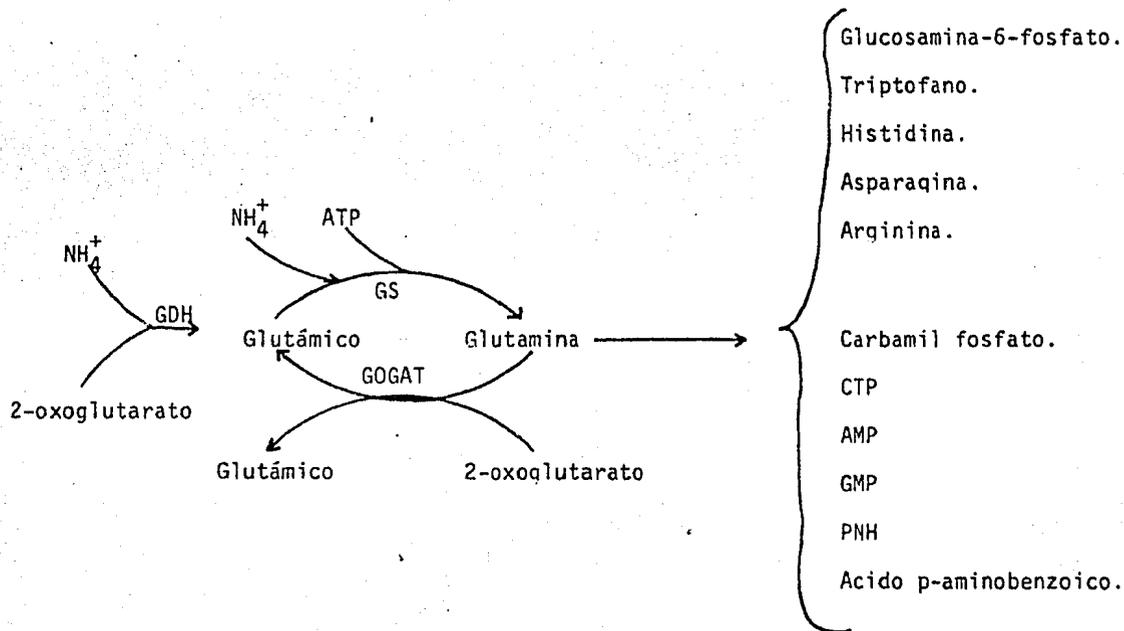


Fig. 1.- Biosíntesis y distribución de glutamina en Escherichia coli.

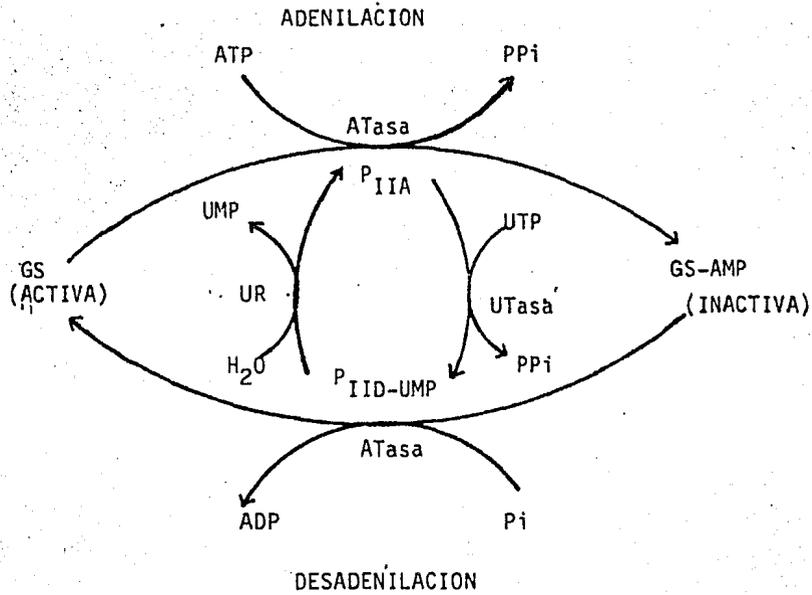


Fig. 2.- Regulación de la actividad de GS por la cascada de adenilación-desadenilación.

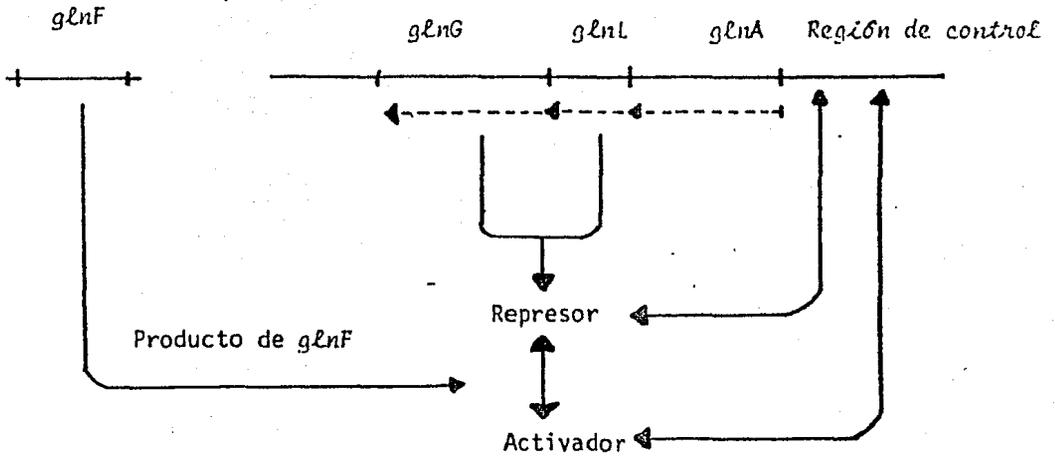


Fig.3.- Modelo para la regulación de *glnA* propuesto por Kustu et al. Las flechas discontinuas ilustran la dirección de transcripción de cada gene.

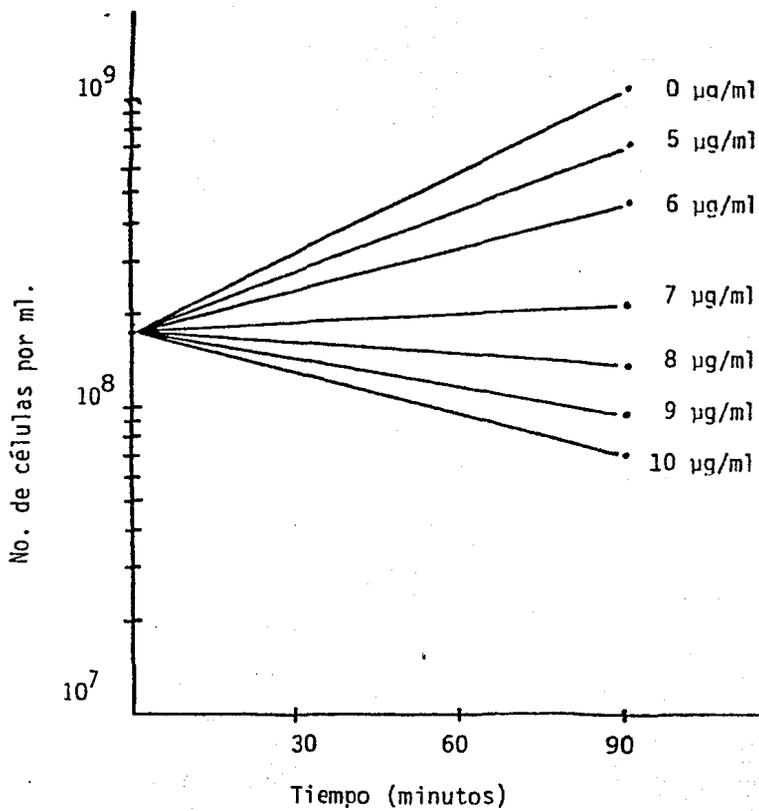


Fig. 4.- Sensibilidad a kanamicina de la cepa MX615

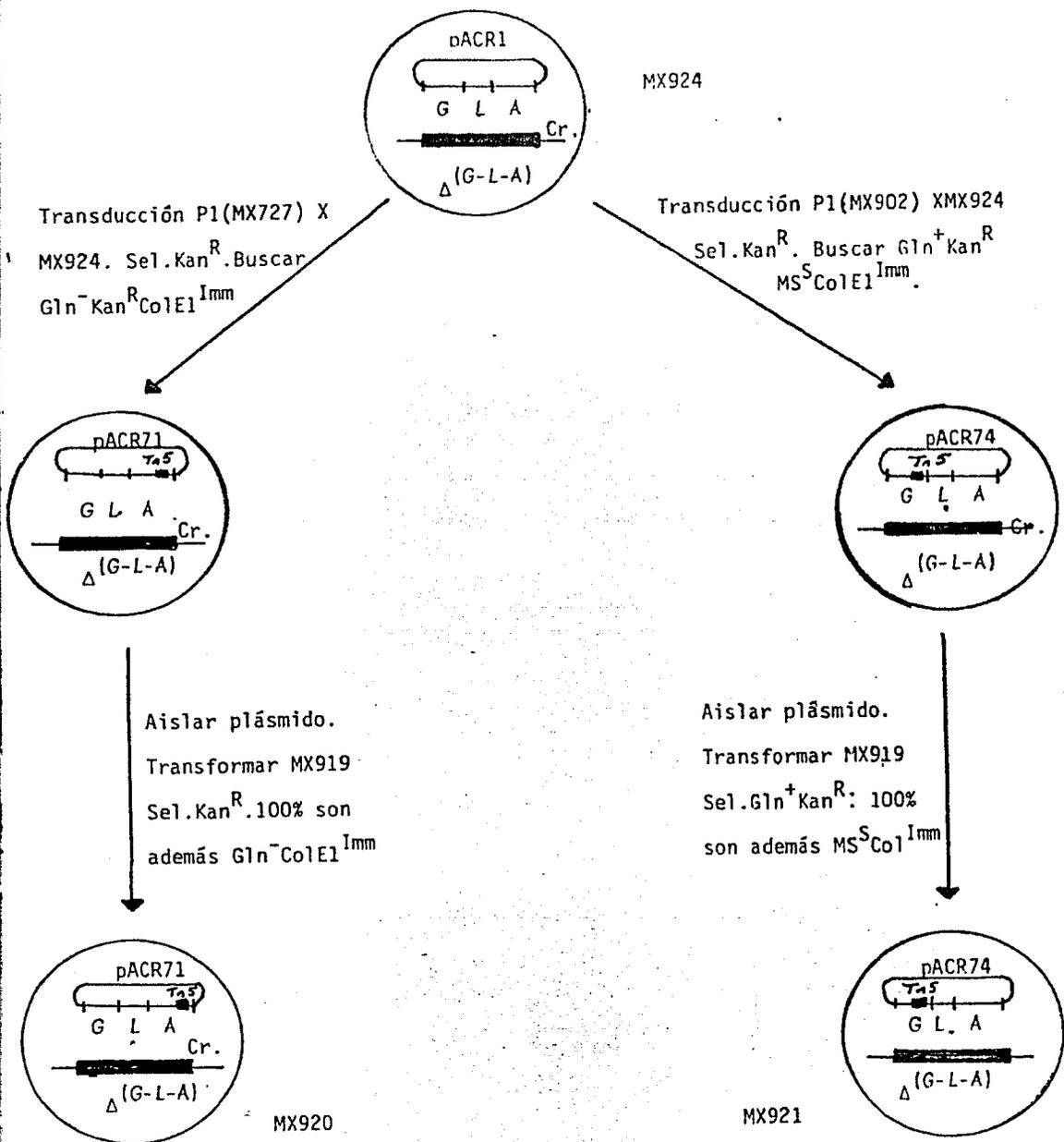
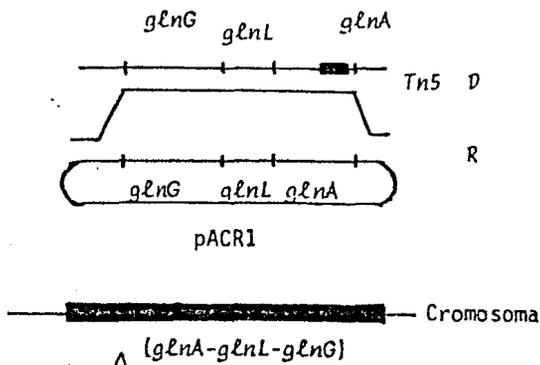


Fig. 5.- Clonación *in vivo* de *glnA71::Tn5* y *glnG74::Tn5* en pACR1.

Primer tipo.



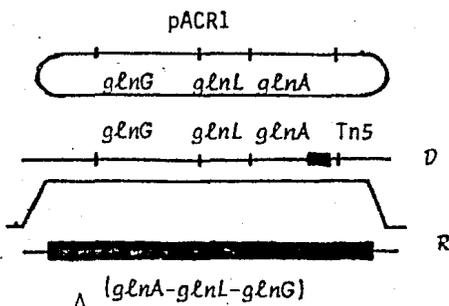
Genotipo resultante.

$\Delta (glnA-glnL-glnG) /$
 $pACR1 glnA71::Tn5$

Fenotipo resultante.

$Gln^- Kan^R ColE1^{Imm}$

Segundo tipo.



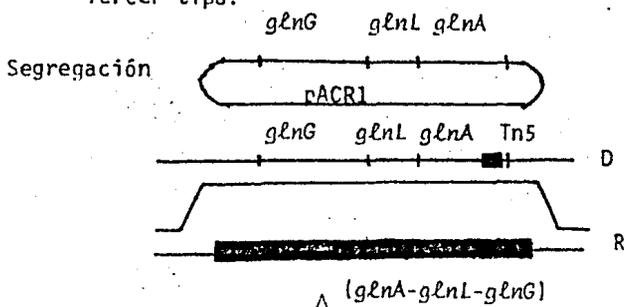
Genotipo resultante.

$glnA71::Tn5/pACR1$

Fenotipo resultante.

$Gln^+ Kan^R ColE1^{Imm}$

Tercer tipo.



Genotipo resultante.

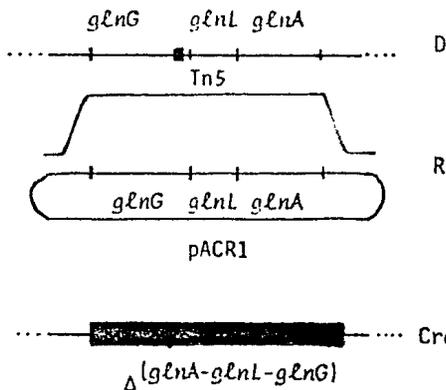
$glnA71::Tn5$

Fenotipo resultante.

$Gln^- Kan^R ColE1^S$

Fig.6.- Recombinantes en la cruz P1(MX727) X MX924.D, donador; R, receptor.

Primer tipo



Genotipo resultante.

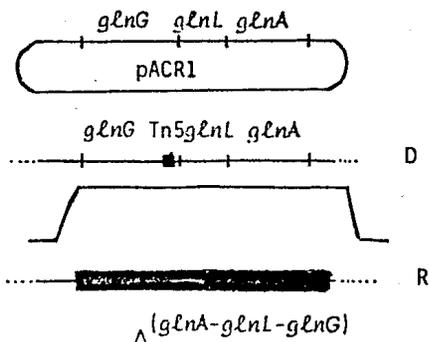
$\Delta(glnA-glnL-glnG)/$

pACR1 glnG74::Tn5

Fenotipo resultante

Gln⁺ Kan^R MS^S CoIE1^{Imm}.

Segundo tipo



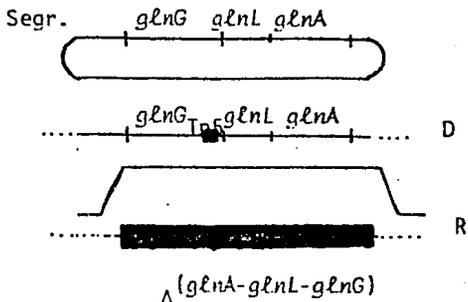
Genotipo resultante.

glnG74::Tn5 / pACR1

Fenotipo resultante.

Gln⁺ Kan^R MS^R CoIE1^{Imm}.

Tercer tipo.



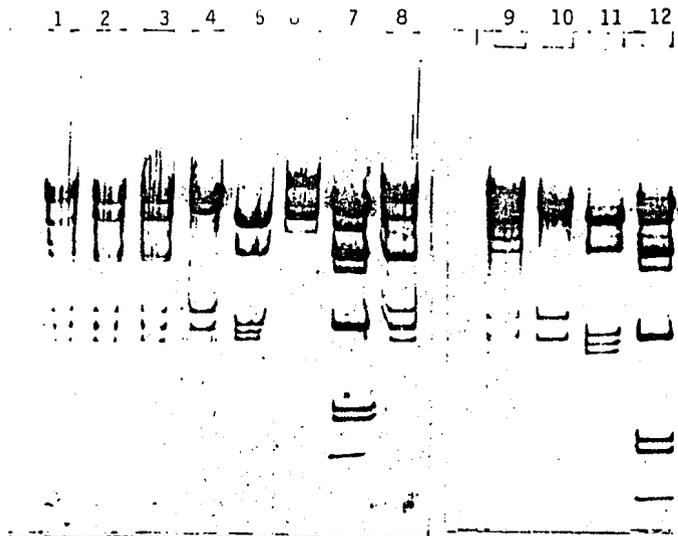
Genotipo resultante.

glnG74::Tn5

Fenotipo resultante.

Gln⁺ Kan^R MS^S CoIE1^S.

Fig.7.- Recombinantes en la cruz P1(MX902) X MX924



CARRIL	MUESTRA
1	pACR71,Pst1
2	pACR74,Pst1.
3	pACR74,Pst1.
4	pACR1,Pst1.
5	pACR10,Pst1.
6	λ,EcoR1.
7	PM2,HindIII.
8	pACR74,Pst1.
9	pACR71,Pst1.
10	pACR1,Pst1.
11	pACR10,Pst1.
12	PM2,HindIII'

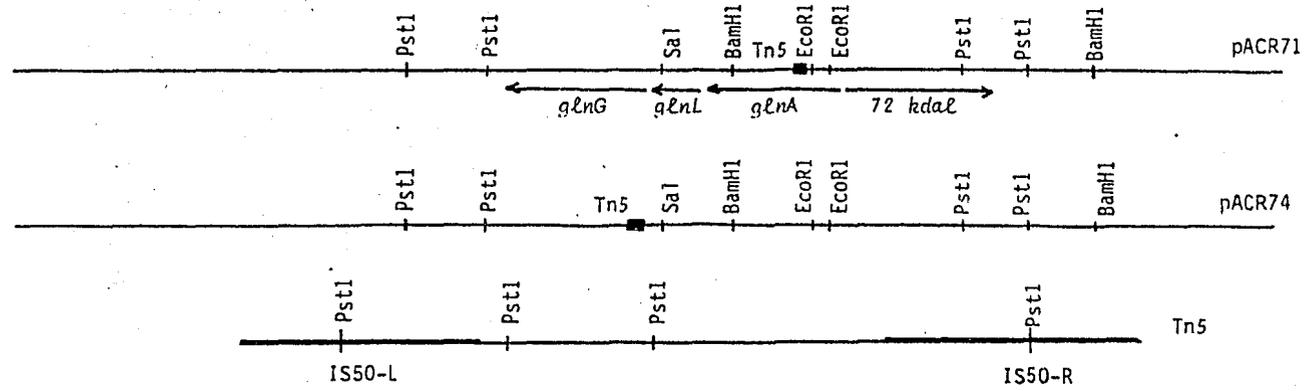
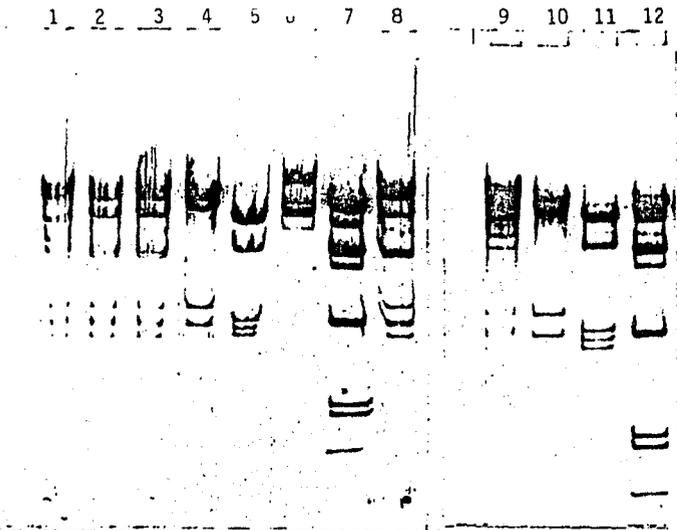


FIG. 8



CARRIL	MUESTRA
1	pACR71,PstI
2	pACR74,PstI.
3	pACR74,PstI.
4	pACR1,PstI.
5	pACR10,PstI.
6	λ,EcoRI.
7	PM2,HindIII.
8	pACR74,PstI.
9	pACR71,PstI.
10	pACR1,PstI.
11	pACR10,PstI.
12	PM2,HindIII'

- 59 -

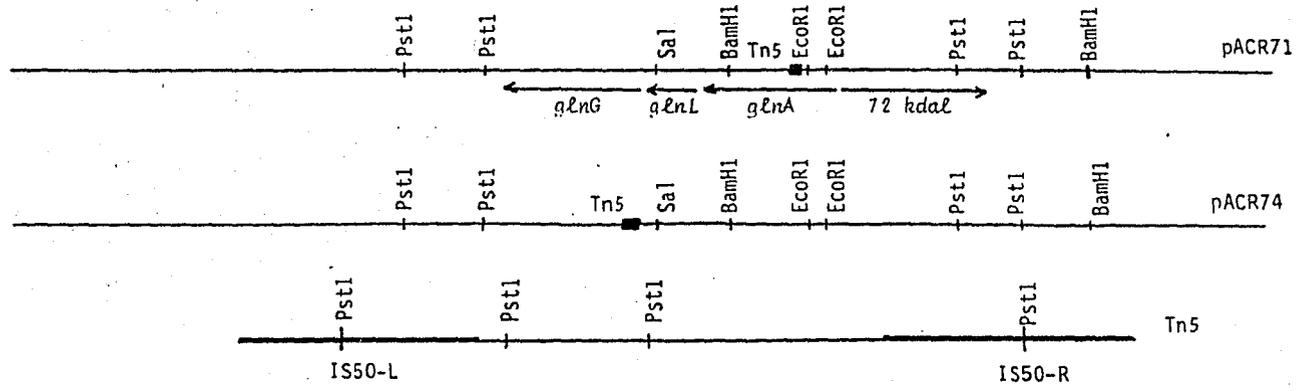
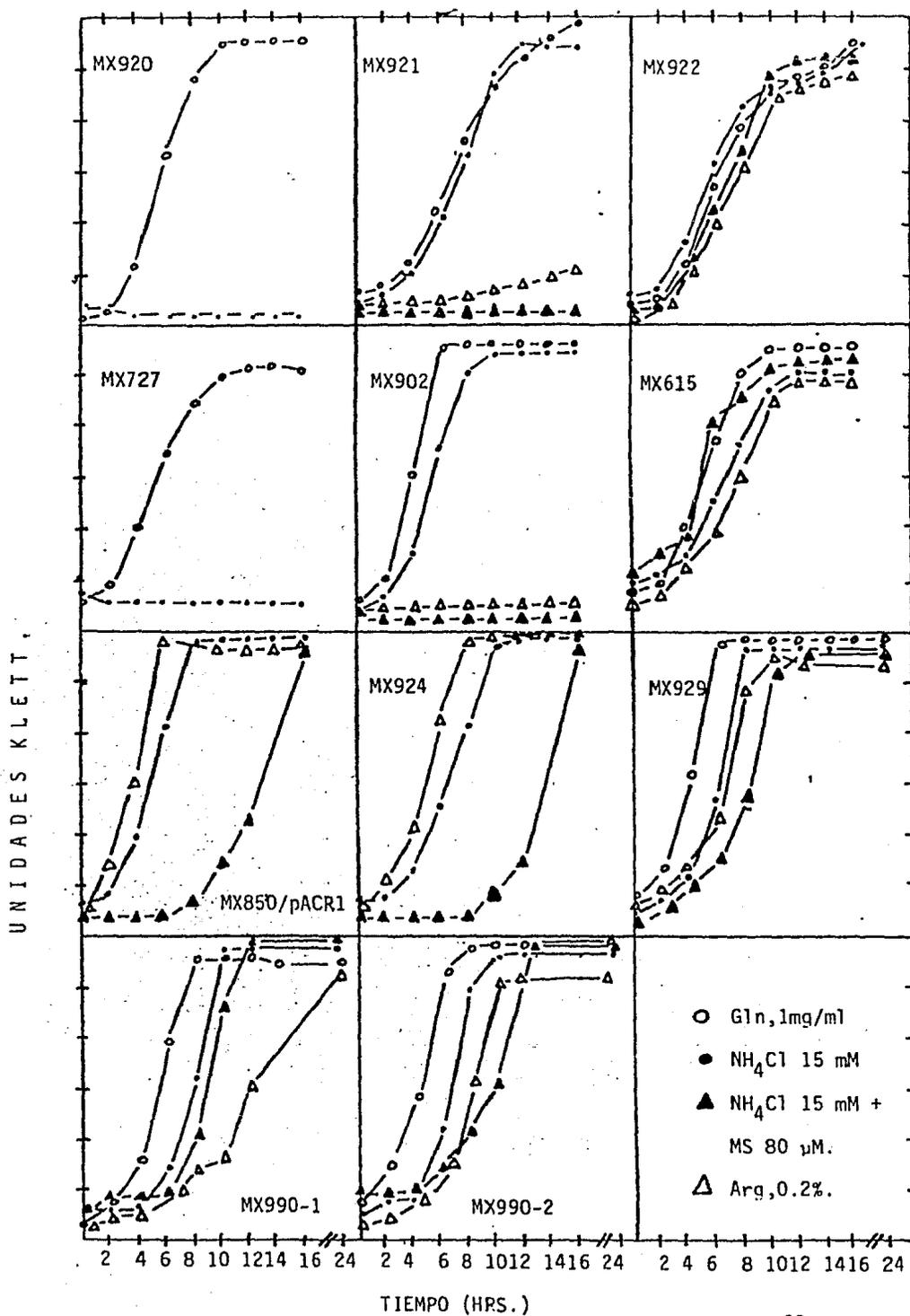


FIG. 8

FIG.9. - Curvas de crecimiento de mutantes de *E. coli* K-12



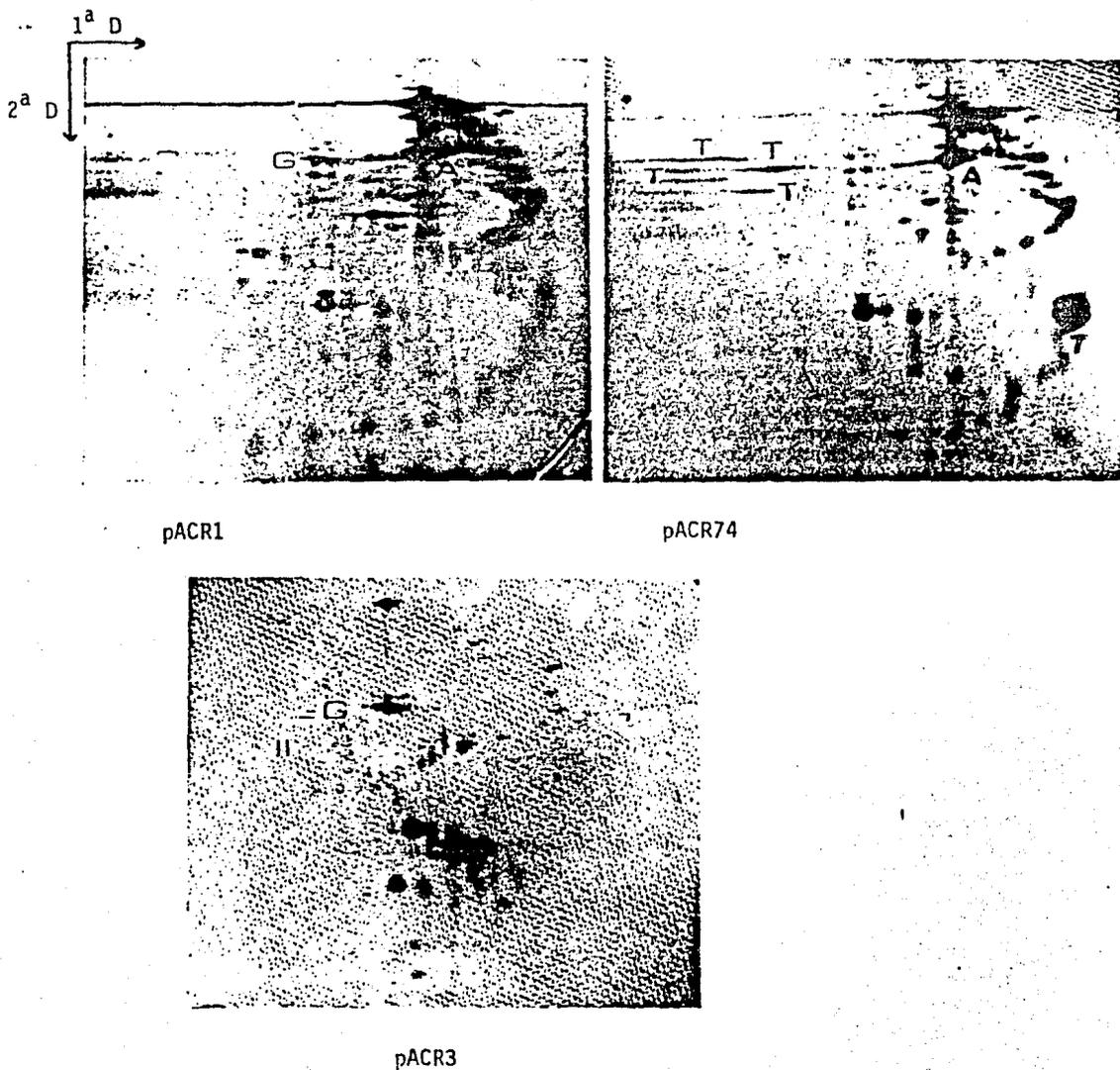


Fig. 10.- Electroforesis bidimensional (O'Farrell) de minicélulas de plásmidos mutantes. pACR3 es una subclona que lleva solamente *glnG* y *glnI* truncado. Abreviaturas: G, producto del gene *glnG*; T, polipéptidos codificados por Tn5 según Rothstein et al.; A, producto del gene *glnA*(GS).

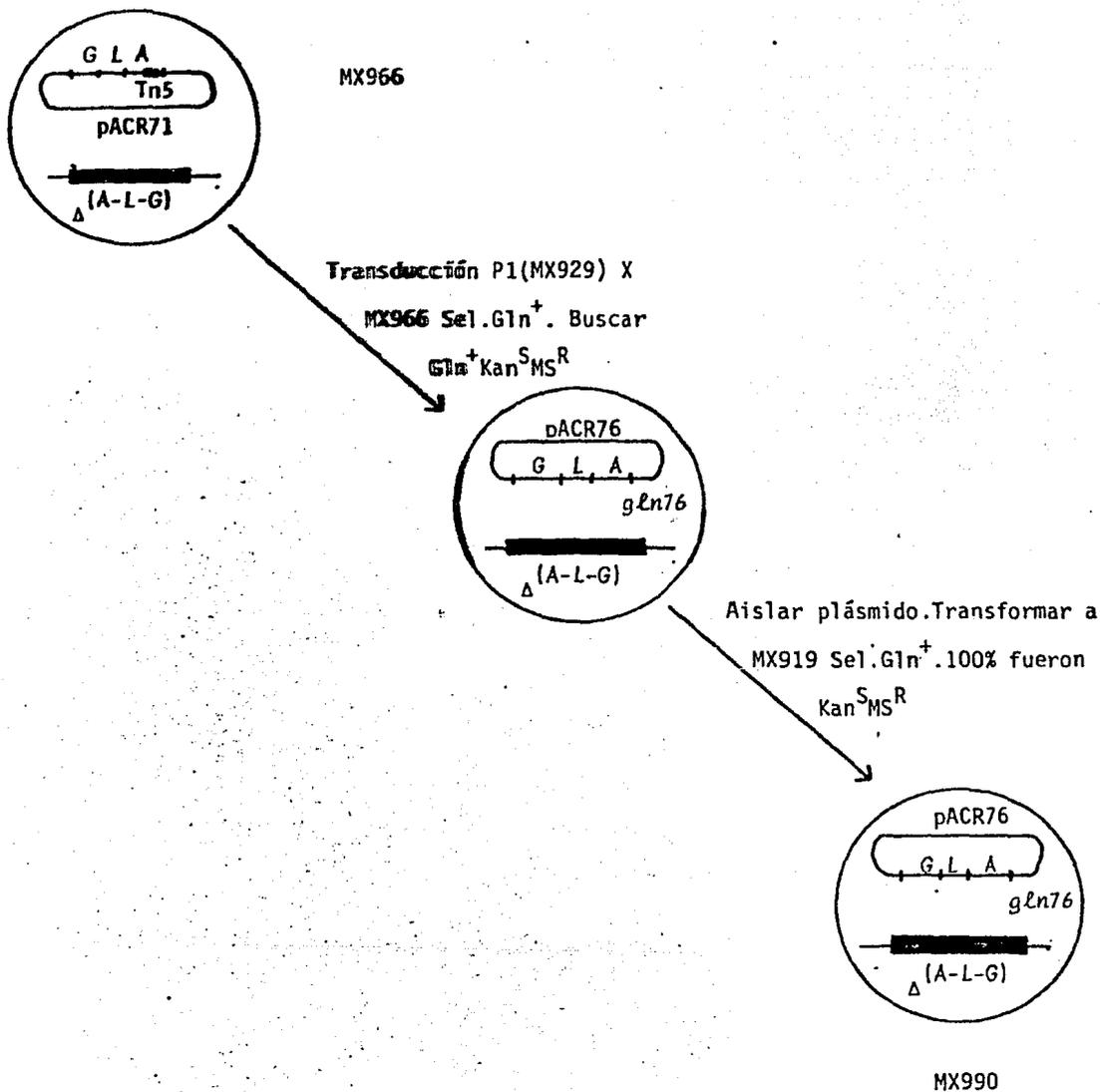
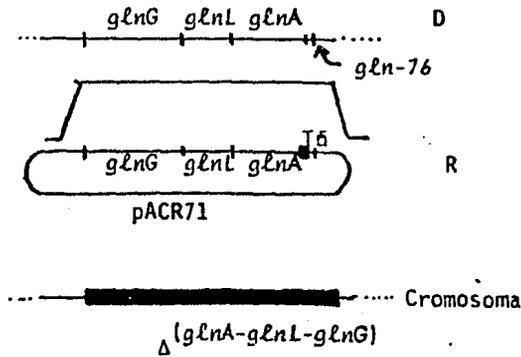


Fig.11.- Clonación *in vivo* de *gln-76* en pACR1.

Primer tipo.



Genotipo resultante.

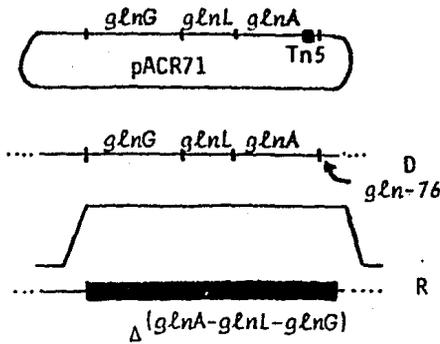
$\Delta(glnA-glnL-glnG)/$

pACR1 *gln-76*.

Fenotipo resultante.

$Gln^+ Kan^S MS^R ColE1^{Imm}$

Segundo tipo.



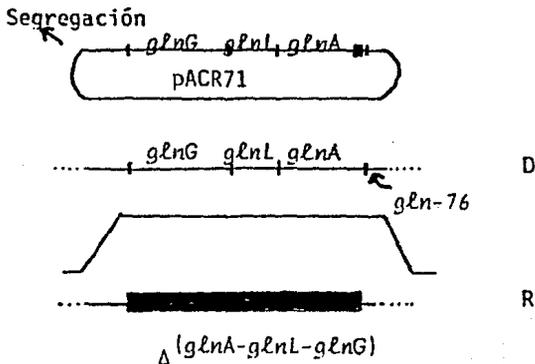
Genotipo resultante.

gln-76/pACR71

Fenotipo resultante.

$Gln^+ Kan^R MS^R ColE1^{Imm}$

Tercer tipo.



Genotipo resultante.

gln-76

Fenotipo resultante.

$Gln^+ Kan^S MS^R ColE1^S$.

Fig. 12.- Recombinantes en la cruz P1(MX929) X MX966.

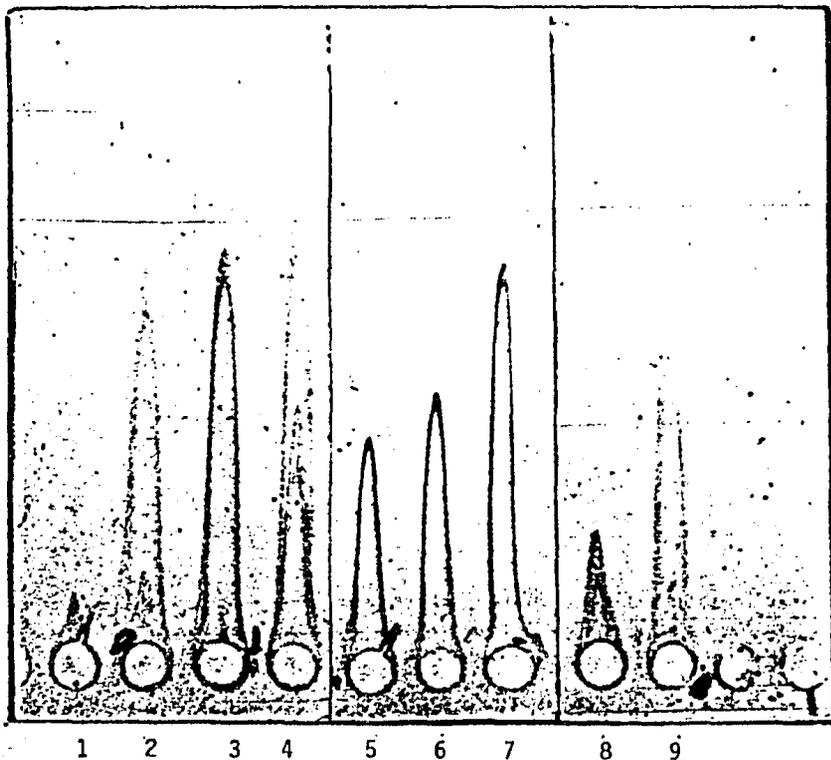


Fig. 13.- Inmunoelectroforesis cuantitativa de células crecidas en presencia o en ausencia de MS. En todos los casos las muestras se ajustaron a 40 μ g como proteína total, salvo en los pozos 5 a 7.

POZO	MUESTRA	POZO	MUESTRA
1	MX614 crecida en NH_4Cl .	7	GS pura MX614, 7 μ g.
2	MX614 crecida en NH_4Cl + MS 80 μ M	8	MX929 crecida en NH_4Cl
3	MX927 crecida en NH_4Cl .	9	MX929 crecida en NH_4Cl + MS 80 μ M.
4	MX927 crecida en NH_4Cl + MS 80 μ M.		
5	GS pura MX614, 5 μ g.		
6	GS pura MX614, 6 μ g.		