

03062
1984



Universidad Nacional Autónoma de México

**Unidad Académica de los Ciclos Profesional
y de Postgrado del C. C. H.**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE MUTACIONES
QUE AFECTAN LA SINTESIS DE GOGAT
DE E. coli**

T E S I S

Que para obtener el título de:

MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

presenta

IRENE BEATRIZ CASTAÑO NAVARRO

1986

**TESIS CON
FALTA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se desarrollo en el laboratorio del Dr. Bastarrachea en el Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología; y en el laboratorio de la Dra. Alejandra Covarrubias en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno.

I N D I C E

I. INTRODUCCIÓN	1
a) Organización física de los genes que codifican para las dos subunidades de la enzima de GOGAT	9
b) Fisiología de la expresión de GOGAT y GDH	10
c) Mutaciones que afectan la síntesis de GOGAT	11
d) Localización genética de mutaciones <u>asm</u> ⁻ y <u>gltB</u> ⁻	12
e) Caracterización de las mutaciones que afectan la síntesis de GOGAT	12
II. ANTECEDENTES	16
III. OBJETIVOS	19
IV. RESULTADOS	20
a) Reconstrucción genética de la cepa PA340	20
b) Construcción de una cepa <u>gltB31</u> <u>gdh1</u> en genoma de la cepa silvestre MX614	24
c) Caracterización de la actividad de GOGAT que presentan las cepas silvestre y MX988	28
d) Obtención de una cepa que contiene una mutación por inserción en el gene para la subunidad pesada de GOGAT	29
e) Caracterización de las cepas que contienen la mutación <u>glt::Δ</u>	33
V. DISCUSION	52

VI. MATERIAL Y METODOS

68

VII. BIBLIOGRAFIA

77

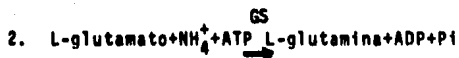
INTRODUCCION

El nitrógeno es un componente esencial de muchos compuestos celulares como las bases púricas y pirimídicas, los aminoácidos, glucosamina 6P, carbamil fosfato, etc. La gran mayoría de los organismos vivos no pueden asimilar el nitrógeno molecular presente en la atmósfera, sino que requieren que esté en forma de compuestos inorgánicos simples como amonio, nitratos, o bien como moléculas orgánicas más complejas como son algunos aminoácidos (histidina, prolina, arginina, - aspartato, etc.). Los intermediarios celulares, clave en la biosíntesis de compuestos nitrogenados, son el glutamato y la glutamina ya que son los principales donadores de su grupo -- amino y amido respectivamente, para la biosíntesis de otros aminoácidos, nucleótidos y muchos otros compuestos nitrogenados (1). Escherichia coli y otras enterobacterias, son capaces de crecer en medio mínimo con amonio como única fuente de nitrógeno, para ésto, poseen un mecanismo para sintetizar aminoácidos y otros metabolitos nitrogenados a partir de amonio. En algunas condiciones este requerimiento se satisface por la presencia de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) que sintetiza glutamato a partir de α -cetoglutarato y amonio, concomitante con la oxidación de una molécula de NADPH, como se muestra en la siguiente reacción:



Existe otra vfa para sintetizar glutamato que es por un proceso que comprende dos pasos, el primero de los cuales consiste

en la amidación del glutamato endógeno para dar glutamina, catalizado por la enzima glutamino sintetasa (GS); el segundo involucra la transferencia del grupo amido de la glutamina al carbono α del α -cetoglutarato, lo que resulta en la producción de dos moléculas de glutamato; esta última reacción la cataliza la enzima glutamato sintasa (GOGAT) (2, 3). Las reacciones son las siguientes:



Las reacciones catalizadas por estas dos enzimas resultan en la producción neta de glutamato a partir de α -cetoglutarato y amonio, el equilibrio es favorable para la síntesis de glutamato debido a la hidrólisis de ATP. De esta forma puede asimilarse el amonio presente en el medio aún cuando la concentración de este sea menor de 0.1mM, o bien derivado de otras fuentes de nitrógeno (4).

A pesar de la gran importancia que tienen las enzimas biosintéticas de glutamato y glutamina en la asimilación y metabolismo del nitrógeno, hay poca información todavía con respecto a su regulación. La mayor parte de los estudios fisiológicos y genéticos, se han centrado en los mecanismos regulatorios de la síntesis de glutamina, los cuales constituyen un sistema muy complejo.

La GS es la única enzima capaz de sintetizar glutamina, por lo que cepas mutantes que carecen de esta actividad, son auxótrofas de este aminoácido (fenotipo Gln⁻). La GS es una pro-

tefna de unos 600,000d de peso molecular (PM) compuesta por -
 doce subunidades iguales que tienen un PM de aproximadamente
 50,000d cada una. Tanto la actividad enzimática como la sín-
 tesis de la GS están sujetas a un control muy riguroso. Un -
 primer mecanismo de control sobre la actividad enzimática es-
 tá dado por inhibición acumulativa por retroalimentación por
 algunos productos del metabolismo de la glutamina (5, 6). Se
 ha descrito también una regulación de la actividad que con-
 siste en un cambio conformacional de la protefna, que depende
 de la ausencia o presencia de algunos cationes divalentes, de
 manera que en ausencia de estos, la enzima adquiere una con-
 formación "relajada" que es catalíticamente inactiva; cuando se
 agregan los cationes, la enzima se reactiva y regresa a su -
 conformación activa (6). El tercer mecanismo de regulación -
 de la actividad enzimática de GS, y quizás el más conspicuo,-
 consiste en la adenilación reversible de un grupo tirosilo de
 cada subunidad de la GS. Este mecanismo, responde a la dispo-
 nibilidad de nitrógeno en el medio, y la enzima va perdiendo
 actividad a medida que aumenta su grado de adenilación (1, 2,
 5, 6). Tanto la reacción de adenilación como la de desadeni-
 lación las cataliza una misma enzima denominada adeniltransfe-
 rase (ATasa); la cual a su vez está regulada por una pequeña
 protefna conocida como P_{II} . Esta protefna puede existir como
 2 formas interconvertibles: P_{IIA} y P_{IID} . La primera estimula
 a la ATasa para catalizar la reacción de adenilación de la --
 GS; la P_{IID} estimula la desadenilación. La iterconversión de
 P_{IIA} a P_{IID} depende de la actividad de una uridiltransferasa
 (UTasa) que une reversiblemente un grupo UMP a la protefna --

P_{IIA} . La UTasa aparentemente también es capaz de desuridilar a la P_{IID} para convertirla en la forma P_{IIA} . La actividad de la UTasa se afecta por las concentraciones intracelulares de varios metabolitos: altas concentraciones de α -cetoglutarato y ATP estimulan la uridilación de P_{II} para formar la P_{IID} , -- que a su vez estimula la desadenilación de la GS, lo cual resulta en mayor actividad biosintética de esta enzima y por lo tanto mayor síntesis de glutamina. La reacción de uridilación de la P_{II} se inhibe por glutamina y fosfato inorgánico lo que resulta en la forma P_{IIA} de esta proteína, y por lo tanto se estimula la adenilación de GS. La ATasa también responde a los niveles de ATP, α -cetoglutarato y glutamina, de manera -- que altas concentraciones de glutamina y bajas de α -cetoglutarato estimulan la adenilación; bajos niveles de glutamina y altos de α -cetoglutarato y ATP, estimulan la desadenilación. Se ha demostrado que el grado de adenilación de GS es muy sensible a concentraciones intracelulares de α -cetoglutarato y glutamina y pequeños cambios en la relación de la concentración de α -cetoglutarato a glutamina causa cambios dramáticos en la adenilación de la GS.

Además de los mecanismos que existen para regular la actividad enzimática de la GS; hay un complejo sistema de regulación de la síntesis de la enzima que incluye a varios genes regulatorios. Se sabe que en cultivos de E. coli creciendo en concentraciones limitantes de nitrógeno, se sintetizan niveles elevados de la GS, y además la enzima se encuentra desadenilada; cuando las células crecen en condiciones de exceso de nitrógeno, los niveles de GS disminuyen aproximadamente 10

veces, y la enzima se encuentra altamente adenilada (1, 4). - Hay también otros sistemas que responden a la accesibilidad de nitrógeno como son algunos operones catabólicos que funcionan para utilizar algunos aminoácidos como fuente de nitrógeno y que proveen a la célula de glutamato o amonio (algunos de estos aminoácidos son: arginina, prolina, asparagina, histidina, etc.), así como algunos sistemas de transporte de algunos aminoácidos como el de histidina, lisina-arginina-ornitina, el de glutamina y también el sistema de transporte de amonio (4, 7, 8). A todos los sistemas que responden a la accesibilidad de nitrógeno, es decir, que se inducen en respuesta a la limitación de la fuente del mismo, se les ha llamado sistemas Ntr (4). La síntesis de GS se encuentra regulada por un mecanismo complejo; se sabe que la expresión del gene estructural para esta enzima (glnA) mín 86 (1) requiere para su activación de la presencia del gene glnF que se localiza en el mín 69 (9, 10), y cotransduce con argG y nltB (11). El gene glnF ha sido clonado, y su producto identificado como una proteína de 75,000d de PM (4). Mutaciones en este gene, tanto puntuales como por inserción, resultan en auxotrofia por glutamina fenotipo (Gln⁻), así como incapacidad para inducir algunos operones catabólicos involucrados en la utilización de ciertos aminoácidos como fuente de nitrógeno; es decir, también son Ntr⁻ (4, 10, 11). Posteriormente se encontraron tanto en K.aerogenes como en E.coli y S.typhimurium, mutaciones que suprimían el fenotipo Gln⁻ de una cepa glnF⁻, aunque seguían siendo Ntr⁻ aún en presencia de un gene glnF silvestre; estas supresoras se localizaron muy cerca de glnA, en el gene

denominado glnG (12, 13). Cepas de E.coli, K.aerogenes y -- S.typhimurium que carecen del producto de glnG sintetizan niveles bajos constitutivos de GS en cualquier condición de -- crecimiento. Por lo tanto, se ha propuesto que el producto de glnG se requiere tanto para activar como para reprimir la síntesis de GS, así como para la inducción de los sistemas - Ntr (14). En ausencia del activador (glnF), no se puede inducir la expresión de glnA y mutaciones que eliminan el producto de glnG suprimen la auxotrofia por glutamina, lo que - indica que en estas cepas (glnF⁻) el producto de glnG reprime la síntesis de glnA. El hecho de que mutaciones en glnG no pueden inducir la síntesis de GS aún en presencia del glnF silvestre sugiere que también se requiere en el proceso de activación.

Posteriormente se describió en S.typhimurium el gene glnI -- que se encuentra muy ligado a glnA y que también está involucrado con la regulación de la síntesis de GS y la inducción de los sistemas Ntr (4, 14). El producto de glnI es una proteína de 36,000d de PM. Algunas mutaciones puntuales en este gene resultan en una síntesis elevada de GS, así como en una inducción constitutiva de los sistemas Ntr aún en condiciones de exceso de nitrógeno, por lo que inicialmente se le asignó un papel represor, en conjunto con el gene glnG, para la expresión de glnA y de los sistemas Ntr. Sin embargo, deleciones de glnI resultan en una regulación casi normal de - la síntesis de GS y son Ntr⁺ (15). También se han analizado un gran número de mutaciones puntuales, por inserción y deleciones en glnI, y se le ha asignado un papel bifuncional, es

decir que también se requiere de este producto para la activación de los sistemas Ntr (16). Posteriormente, se propuso -- que el producto de glnL aparentemente interfiere con la activación de la síntesis de GS, más que reprimir la síntesis de esta enzima (4). El gene glnA se encuentra formando un operón complejo con los genes glnL y glnG que se transcriben en la misma dirección; en el sentido opuesto a las manecillas -- del reloj, desde glnA hacia glnG (4, 17). Mutaciones por inserción en glnA son polares sobre glnG y tienen fenotipo - - Ntr⁻; cepas merodiploides con inserciones en glnA y glnG en posición trans tienen regulación normal de GS, pero siguen - - siendo Ntr⁻ es decir, no pueden inducir los genes encargados de utilizar arginina u otros aminoácidos como fuente de nitrógeno. Este dato puede explicarse postulando un operón con -- dos promotores, uno localizado antes de glnA y otro entre -- glnA y glnG y asumiendo que el producto de glnG requerido para la activación de glnA se puede producir a través de la iniciación de la transcripción de cualquiera de los 2 promotores y que sólo cuando la transcripción proviene del promotor de - glnA existe suficiente cantidad del producto de glnG para activar los sistemas Ntr. Utilizando fusiones del gene glnG -- con el gene lacZ, se ha estudiado la expresión de glnG, y se ha demostrado que la transcripción iniciada en el promotor de glnA (glnAp) puede seguir hasta glnG (17). Además existe - - otro promotor localizado entre el final de glnA y el principio de glnL (glnIp), que se reprime por glnG (17, 18, 19). - Debido a que glnG se autorregula, su producto se encuentra en cantidades elevadas en condiciones de limitación de nitrógeno

cuando la transcripción se inicia en el promotor fuerte al inicio de glnA y la concentración de glnG disminuye en condiciones de exceso de nitrógeno, condición en la que se sintetiza a partir de glnP. Recientemente se ha descrito que -- existen 2 promotores funcionales antes de glnA. La transcripción iniciada en el promotor lejano (glnAp1) requiere de la proteína CAP y se reprime por el producto de glnG; transcripción a partir del promotor cercano (glnAp2) requiere activación mediada por glnF y glnG (20, Garcíarrubio A. y Covarrubias A. datos no publicados). Los productos de glnB - - (P_{II}) y glnD (UTasa) también afectan la síntesis de glnA, -- probablemente a través de glnL. Ambas proteínas, como se -- mencionó anteriormente, son muy sensibles a las concentraciones intracelulares de α -cetoglutarato y glutamina, que es -- una medida de la disponibilidad de nitrógeno, y se propone -- que la P_{II} y la UTasa transmiten información al producto de glnL que a su vez actúa a través de glnG para modular la expresión de glnA y de los sistemas Ntr (4, 20).

Como se mencionó anteriormente, en E.coli y otras enterobacterias, existen 2 enzimas que sintetizan glutamato independientemente, que son la GDH y la GOGAT. El mecanismo de regulación que controla a estas 2 enzimas, ha sido poco estudiado. Estudios genéticos preliminares en E.coli (23) y - - K.aerogenes (24) establecieron que se requiere la pérdida de estas dos actividades enzimáticas capaces de producir glutamato para obtener una cepa auxotrofa de este aminoácido.

La mayor parte de los datos sobre la enzima GOGAT se han obtenido en S.typhimurium donde se han aislado una gran cantidad de mutaciones en el gene estructural para esta enzima (30, -- 31, 32). Sin embargo, en E.coli sólo existe una mutación descrita que afecta la síntesis de GOGAT, cuyo alelo se denominó glbB31.

La GOGAT de E.coli es una enzima de 800,000d de PM compuesta por 4 dímeros activos catalíticamente y cada uno compuesto -- por 2 subunidades de diferente PM, la subunidad pesada tiene un PM de 135,000d y la ligera de 53,000d (21, 22). La enzima tienen una alta afinidad y especificidad por sus sustratos, las Km aparentes son 7,3 μ M por α -cetoglutarato y 250 μ M por -- glutamina (21). Por lo que respecta a GDH, esta enzima tiene un PM de 25,000d compuesta por 5 subunidades iguales (20), el gene estructural de esta enzima (gdhA) está situado en el -- min 27 del cromosoma.

ORGANIZACION FISICA DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LAS DOS SUBUNIDADES DE LA ENZIMA GOGAT

Los genes que codifican tanto para la GDH como para la GOGAT de E.coli ya se han clonado (27). En el caso de los genes de GOGAT, se sabe que están contenidos en un fragmento de DNA -- cromosomal de 8.55Kb (28) que codifica para cada una de las - 2 subunidades, por lo que ambos genes estructurales se encuentran muy ligados en el cromosoma. Recientemente se han subclonado por separado los 2 genes y se ha descrito su organización física (29). Se demostró que ambos genes son contiguos

y se transcriben en la misma dirección, esto es, del gene de la subunidad pesada hacia el de la subunidad ligera. Por otro lado, se han reportado algunos datos que sugieren que el gene de la subunidad ligera posee su propio promotor, ya que esta se sintetiza en minicélulas que contienen plásmidos que sólo llevan este gene clonado en cualquier orientación (29). También en S.typhimurium (31) se ha reportado que los genes estructurales de GOGAT están contiguos, que la dirección de transcripción va desde el gene de la subunidad pesada (gltB) hacia el de la ligera (gltD). Es decir, que al menos a este nivel su organización es muy similar en ambas enterobacterias.

FISIOLOGIA DE LA EXPRESION DE GOGAT Y GDH.

Se sabe que la GDH se encuentra en cantidades detectables en cultivos de E.coli (2) y K.aerogenes (3) crecidos en alta concentración de amonio (15mM), en tanto que en cultivos de K.aerogenes limitados de amonio (<0.5mM) no presentan actividad detectable de GDH y la GOGAT se encuentra inducida, (2,-3); de ahí que cepas que carezcan de actividad de GOGAT, no crecen en estas condiciones (24). Por esta razón se ha propuesto que la GOGAT se requiere para la asimilación de bajas concentraciones de amonio, y la GDH sólo puede funcionar en altas concentraciones de amonio dada su alta Km por éste compuesto (1.5-3.0mM) (2). Para el caso de E.coli, la situación es diferente, ya que, por un lado, no se ha observado que la GDH se reprima notablemente por crecimiento en bajas

concentraciones de amonio, y por otro, la GDH se induce en cultivo continuo a medida que aumenta la velocidad de crecimiento, aún cuando esté limitado de amonio (2). Así pues no es posible establecer una relación inversa entre los niveles de GDH y GS, ni tampoco una síntesis coordinada entre GS y GOGAT (2, 21).

MUTACIONES QUE AFECTAN LA SÍNTESIS DE GOGAT.

Las primeras mutaciones aisladas que afectan la síntesis de GOGAT, se seleccionaron como cepas incapaces de crecer en -- fuentes limitantes de nitrógeno (Ntr^-) en K.aerogenes (24) y se les denominó asm⁻; estas mutantes presentaban menos del 10% de la actividad de GOGAT de la cepa silvestre.

En S.typhimurium también se aislaron cepas Ntr^- , denominadas asm⁻, y se encontró que el alelo asm101 abate los niveles de GOGAT a un 20%-40% de los niveles de la cepa silvestre (30).

Posteriormente el grupo de J.Brenchley (31) reportó el aislamiento de varias mutaciones en alguno de los genes de GOGAT de S.typhimurium, que resultan en una actividad termosensible, y que tienen fenotipo Ntr^- , a estas mutaciones se les designó gltB⁻.

Un análisis más exhaustivo ha permitido el aislamiento y caracterización preliminar de un gran número de mutaciones puntuales (sin sentido), deleciones e inserciones de Mud1 en el gene de la subunidad pesada de GOGAT de S.typhimurium (gltB)

(32). Todas estas mutantes también presentan fenotipo Ntr^- - lo que sugiere que se requiere actividad de GOGAT para poseer el fenotipo Ntr^+ .

Como se mencionó anteriormente, en E.coli sólo se ha reportado una mutación que afecta la síntesis de GOGAT, denominada - gltB31 (23, 25, 26). También en este caso, la cepa que lleva ésta mutación (CB100, y una derivada de ésta, la PA340) presenta fenotipo Ntr^- , y no presenta actividad detectable de -- GOGAT.

LOCALIZACION GENETICA DE MUTACIONES asm^- Y $gltB^-$.

Se ha reportado que las mutaciones de K.aerogenes que afectan la síntesis de GOGAT, están ligadas un 20% al gene argG por - transducción mediada por P1 (33). Sin embargo, las mutacio-- nes asm^- aisladas en S.typhimurium no están ligadas a argG -- aunque si cotransducen con glnF (7%) y con cod (36%) (30, 31, 32).

En el caso de E.coli, el grupo de B.Tyler (25) ha localizado la mutación gltB31 ligada a argG (44% cotransducción con P1) - en el min 69, y han demostrado que el locus anteriormente de-- nominado aspB (26) es en realidad gltB que en ese reporte se estableció como el gene estructural de GOGAT.

CARACTERIZACION DE LAS MUTACIONES QUE AFECTAN LA SINTESIS DE GOGAT.

Un fenotipo interesante que presentan las cepas asm^- o gltB^- -

de K.aerogenes y E.coli (24, 25), es que además de ser Ntr^- , son incapaces de inducir la GS en un medio que contiene glutamina como única fuente de nitrógeno (condición de limitación de este, en donde la GS se induce, (1, 4). Una explicación posible para este dato, es que en estas mutantes debe existir una acumulación de glutamina, ya que carecen de actividad de GOGAT, lo que resulta en una represión de la expresión del operón glnALG y por lo tanto no existe una inducción de GS. Por otra parte, se ha descrito en K.aerogenes (24) y en E.coli (25) que algunas revertantes Ntr^+ de cepas asm⁻ o nltB31 se localizan en glnL, y son cepas que sintetizan GS constitutivamente. Estos datos sugieren que existe una correlación entre los sistemas de control de GS y de GOGAT de E.coli, aunque no se refleje en una síntesis coordinada de ambas enzimas en las condiciones de crecimiento probadas hasta ahora.

Aquí es importante hacer notar que ni en K.aerogenes ni en E.coli se han estudiado las mutaciones asm⁻ o nltB31 respectivamente, con el suficiente detenimiento como para establecer definitivamente si se trata de mutaciones que afecten el gene estructural de GOGAT, o bien si son regulatorias. A este respecto resulta interesante mencionar que a partir de la cepa de S.typhimurium que lleva la mutación asm101, se aislaron cepas auxótrofas de glutamato que perdieron la actividad de GDH, debido a la mutación gdh51. Ahora estas mutantes -- presentan una actividad de GOGAT que representa un 5% o menos de la actividad de la cepa silvestre, actividad aún me-

nor que la de la cepa padre (asm101 gdh⁺), que es aproximadamente un 20% - 40% de la actividad de la silvestre. Por otro lado, al transferir la mutación gdh51 a la cepa Ntr⁻ aislada inicialmente (asm101), se encontró que no era auxótrofa estricta de glutamato, sino que crecía en altas concentraciones de amonio con un tiempo de duplicación mayor que la silvestre, y seguía conservando un 20% - 40% de la actividad de GOGAT. - Estos datos sugirieron que se requiere de la pérdida total de las dos actividades enzimáticas para que haya auxotrofia total por glutamato, y que la mutación asm101, que confiere el fenotipo Ntr⁻, en conjunto con la pérdida de la actividad de GDH, no son suficientes para dar lugar a una auxotrofia por glutamato. De tal forma que la cepa auxótrofa que se aisló a partir de la cepa Ntr⁻ (asm101) pudiera poseer una mutación adicional responsable de los niveles no detectables de GOGAT (30).

Esta última interpretación se ve apoyada por el hecho de que el grupo de J. Branchley (31, 32) ha reportado que mutaciones en el gene estructural de la subunidad pesada de GOGAT en conjunto con la mutación gdh51, sí resultan en auxotrofia total por glutamato y fenotipo Ntr⁻. Resulta interesante que varias cepas gdh51, que tienen además mutaciones sin sentido en el gene para la subunidad pesada (gltr), en presencia de supresores ambas, recuperan tanto el fenotipo Glt⁺ y Ntr⁺ como cierta actividad de GOGAT que va del 10% al 50% en las diferentes mutantes. La caracterización de las cepas por inmunoprecipitación de las 2 subunidades de GOGAT, mostró que las -

mutaciones se localizan en gltB, y que todas las cepas mutantes, excepto las inserciones de MudI en gltB, se detecta la subunidad ligera, de forma que sólo por inserción se observa una polaridad clara sobre la transcripción del gene de la subunidad ligera (32). En E.coli la primera cepa auxótrofa de glutamato descrita, es la CB100 (23), la cual no presenta actividad detectable ni de GDH ni de GOGAT, y tiene también fenotipo Ntr^- .

A partir de la CB100 se han construido cepas isogénicas que sólo llevan la mutación gdh51, o bien que sólo tienen el alelo gltB31 (25).

Aquellas que sólo tienen la mutación gdh51 en el genoma de la cepa CB100, carecen de actividad de GDH y no presentan ningún otro fenotipo (es decir son protótrofas de glutamato y son Ntr^+); en cambio las que sólo llevan la mutación gltB31 presentan muy baja actividad de GOGAT y son Ntr^- ; lo que reafirma que se requiere de la pérdida tanto de la actividad de GDH como de GOGAT para que resulte en auxotrofia. Así pues, los fenotipos que confiere la mutación gltB31 en cepas isogénicas de la CB100 son: Ntr^- , niveles no detectables de GOGAT, e incapacidad para despreimir completamente la GS por crecimiento en glutamina como fuente de nitrógeno.

El plásmido híbrido aislado, que lleva un fragmento cromosomal de 8.55Kb que contiene los dos genes estructurales de GOGAT de E.coli (PRSP20), es capaz de complementar a la cepa PA340, que ha sido descrita como una derivada de la cepa CB100 (25). La cepa PA340 con PRSP20, ahora presenta actividad de GOGAT,

y fenotipo Ntr^+ (28). Esto indica que la mutación gltB31 es pleiotrópica; sin embargo, hasta ahora se desconoce si es una mutación estructural o regulatoria. En cualquier caso, el - - PRSP20 complementa para los fenotipos Glt^+ y Ntr^+ .

En resumen, hay algunas cosas en común entre el E.coli y S.typhimurium: (a) los genes estructurales para GOGAT están contiguos en una región similar del cromosoma, (b) se transcriben - en el mismo sentido y al menos en el caso de S.typhimurium, se puede comportar como un operón aunque posiblemente haya un pro motor en el gene de la subunidad línera, tal como se sugiere - que sucede en E.coli (29) y (c) en ambos casos se requiere máxima actividad de GOGAT para que haya crecimiento en arginina o prolina como únicas fuentes de nitrógeno.

ANTECEDENTES

En el laboratorio, hemos estado trabajando principalmente con el sistema glnALG de E.coli y su regulación.

Nuestro interés por estudiar la regulación de la síntesis de GOGAT surgió en el proceso de caracterización de la cepa MX988 (Tabla 1), que es una derivada de la cepa silvestre MX614, que contiene el alelo gltB31 proveniente de la cepa PA340 (Tabla 1).

Para la transferencia del alelo gltB31, utilizamos fago P1 pro pagado en la cepa PA340, e infectando a una cepa derivada de - la MX614 que contiene el alelo argG31 (MX971, Tabla 1). Selec

cionamos prototrofia por arginina (Arg^+) y contraseleccionamos fenotipo Aut^- (incapacidad de utilizar arginina como única fuente de nitrógeno, que es como monitoreamos el fenotipo Ntr^-).

Durante la caracterización de la cepa MX988, se le determinó actividad de GOGAT, GDH y GS. Contrario a lo esperado, esta cepa presentaba actividad detectable de GOGAT (aproximadamente 7 veces menos que la silvestre), lo que no ocurría con la cepa PA340; sin embargo, la cepa MX988, conservaba el fenotipo Aut^- , y también la característica de no inducir su GS por crecimiento en glutamina como única fuente de nitrógeno. Estos datos sugerían que sí se había transferido el alelo gltB31 proveniente de la PA340, por cotransducción con argG. Por otro lado, la actividad de GDH era muy similar a la que posee la cepa silvestre.

Resultaba interesante que en un genoma silvestre, la mutación gltB31, permitiera la síntesis de bajos niveles de GOGAT, cosa que no sucede en el genoma de la cepa PA340. Esto parecía indicar que la mutación gltB31 afectaba o bien un gen regulatorio, o bien el gen estructural de GOGAT de tal manera que se sintetizara una enzima menos activa, una última posibilidad, era que la actividad tipo GOGAT no estuviera determinada por un solo gen, y que en la PA340 ambos estuvieran mutados.

Para descartar que la actividad baja de GOGAT de la cepa gltB31 (en genoma por lo demás silvestre), se debía a que sí poseía actividad silvestre de GDH, se transformó la cepa PA340 con el plásmido que lleva el gen gdhA (pRSP1, 27), y -

se determinó actividad de GOGAT, el resultado fue que no tiene actividad detectable de esta última enzima, de manera que la GDH silvestre no interfiere con el ensayo de GOGAT, y por lo tanto en la cepa PA340 existe al menos una mutación adicional a las dos previamente identificadas; es decir, posee los alelos gdh51 gltB31 y una tercera mutación responsable de la disminución a cero de los niveles de GOGAT y, consecuentemente de su auxotrofia por glutamato.

Resumiendo, la mutación gltB31 en un genoma silvestre, permite la síntesis de bajos niveles de GOGAT (7 veces menos que la silvestre); y en genoma de la cepa PA340 no se detecta actividad de GOGAT por lo que esta cepa debiera tener una tercera mutación.

OBJETIVOS

Tomando en cuenta los datos mencionados en la sección anterior, aún no es claro si la mutación gltB31 afecta a alguno de los genes estructurales de GOGAT, o codifica para una proteína reguladora.

Por otra parte, los datos mencionados sugieren que la cepa - - PA340 posee al menos tres mutaciones, gdh51, gltB31 y una tercera que baja los niveles a no detectables la síntesis de GOGAT.

Dada esta confusión y la escasa información disponible sobre la biosíntesis y la regulación de GOGAT de E.coli, el trabajo incluido en esta tesis pretende aclarar algunas preguntas básicas acerca de su papel en la célula, así como sobre los mecanismos de regulación involucrados en su síntesis.

Así pues, los objetivos particulares fueron: a) reconstrucción genética de la PA340, b) caracterización de la mutación gltB31 -- que nos permitiera determinar si esta se encuentra en un gene estructural o regulatorio, c) la obtención de mutaciones en el gene estructural de GOGAT para localizarlo, y su comparación con el alelo gltB31 con el fin de definir el fenotipo conferido por una mutación estructural, d) la caracterización de esta mutación en diferentes fondos genéticos y distintos medios de cultivo para dilucidar algunos de los aspectos sobre la regulación de la síntesis de GOGAT y su relación con los sistemas Ntr y con GS.

RESULTADOS

La cepa PA340, de donde proviene el alelo gltB31, cuya genealogía no se conoce con certeza, no presenta actividad detectable de GOGAT ni de GDH y por lo tanto es auxótrofa de glutamato. -- Los valores de las actividades específicas de GOGAT de la PA340, no se ven afectados por la presencia de una GDH funcional, ya -- que cuando esta cepa se complementa con el plásmido pRSP1 (MX729) que lleva el gene gdhA⁺, tampoco presenta actividad de GOGAT -- (Tabla 2). Estos datos parecen indicar que no es la falta de -- GDH en la PA340 la responsable de los niveles no detectables de GOGAT.

A diferencia de la PA340, la cepa MX988, que contiene el alelo gltB31 en el genoma de la silvestre MX614, presenta actividad específica de GOGAT de 10nmol de NADPH oxidado/min/mg proteína, -- aproximadamente 7 veces menos a la que se detecta en la silvestre.

Una explicación posible a estos datos, es la presencia de una mutación adicional a las descritas en la PA340.

RECONSTRUCCION GENETICA DE LA CEPA PA340

El primer enfoque que utilizamos para demostrar que la cepa -- PA340 lleva otra mutación, responsable de los niveles no detectables de GOGAT fue un experimento de reconstrucción de esta cepa, descrito en la Tabla 3. Se propagó P1 en una cepa gltB⁺ argG31 (MX971, Tabla 1) y se cruzó por la PA340, seleccionando para Aut⁺ (gltB⁺) y contraseleccionando Arg⁻; se purificó una cepa

Tabla 1.

Cepas bacterianas y plásmidos.

CEPA	Genotipo Relevante	Referencia
RR1	$r_B^- m_B^-$	Bolívar et al (1972)
PA340	<u>gltB31</u> <u>gdh1</u>	F. Jacob vfa B.J. Bachmann
MX614	silvestre	Colección del laboratorio
MX848	<u>glnF73::Tn5</u>	Osorio et al. (1983)
MX971	igual que MX614 pero con <u>argG31</u>	Castaño y Bastarrachea (1984)
MX988	igual que MX614 pero <u>gltB31</u>	Colección del laboratorio
MX1163	igual que PA340 pero <u>gltB⁺</u> y <u>argG31</u>	Este trabajo
MX1165	igual que PA340 pero reconstruido a partir de MX1163	
MX1166	igual que PA340 pero <u>gdhA⁺</u> , Tn5 a 0.1 min de distancia de <u>gdhA⁺</u>	"
MX1168	igual que MX971 pero <u>gdh1</u> , Kan ^R	"
MX1170	igual que MX1168 pero <u>gltB31</u> , <u>argG31</u>	"
MX1171	igual que MX1170	"
MX1172	igual que MX614 pero <u>gdh1</u> , Kan ^R	"
MX1174	igual que MX1172 pero <u>glt::Ω</u> (Transductante Sp ^R Sm ^R de MX1172 con PI de <u>poIA⁺</u> <u>glt::Ω</u>)	"
MX1176	igual que MX1172 pero <u>glt::Ω</u> (Transductante Sp ^R Sm ^R de MX1172 con PI de MX1174)	"
MX1178	igual que MX614 pero <u>glt::Ω</u> (Transductante Sp ^R Sm ^R de MX614 con PI de MX1174)	"
poIA⁺(ts)		
PLASMIDOS	Genotipo Relevante	Referencia
PHP45 Ω	Fragmento Ω : Sp ^R Sm ^R de 1.33 md	36
pRSP1	<u>gdhA⁺</u>	Covarrubias et al.
pRSP20	lleva los 2 genes estructurales de GOGAT Subunidad pesada (Sp ⁺) y subunidad ligera (Sl ⁺)	"
pRSP21	igual que pRSP20 pero Cm ^R	Este trabajo
pGo12	lleva solo el gene para la subunidad ligera (Sl ⁺)	Garcarrubio et al
pGOP3	lleva sólo el gene para la subunidad pesada (Sp ⁺)	"
pGOP3:: Ω	igual que pGOP3 pero con inserción del fragmento Ω en el sitio de <u>glnII</u> (Sp ^R)	Este trabajo

Tabla 2

Actividad enzimática de GS, GDH y GOGAT de cepas que contienen el alelo gltB31 en genoma silvestre MX614 o genoma PA340.

Cepa	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ^a						Fenotipo ^d	
	GOGAT		GDH		GS		Glt	Aut
	NH ₄ ^b	Gln ^c	NH ₄	Gln	NH ₄	Gln		
MX614 Silvestre	76	75	206	239	128	1040	+	+
MX988 ^f <u>gltB31</u>	9	12	256	236	100	220	+	-
PA340 ^g <u>gltB31</u> <u>gdh1</u>	n.d. ^e	n.d.	n.d.	n.d.	270	260	-	-
MX729 ^g PA340/pR5P1	n.d.	n.d.	449				+	-
MX1163 ^g		11		n.d.		50	+	+
MX1165 ^g PA340 reconst.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	100	100	-	-
MX1172 ^f <u>gdh1</u>	76	79	n.d.	n.d.	120	1100	+	+
MX1170 ^f <u>gltB31</u> <u>gdh1</u>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	300	170	+	-

a) Las actividades de GOGAT y GDH están expresadas en nmol de NADPH oxidado por min por mg de proteína; las de GS en nmol de γ -glutamil hidroxamato formado por min por mg de proteína.

b) NH₄ significa que los cultivos se crecieron en amonio 15mM como fuente de nitrógeno.

c) Gln significa crecimiento en glutamina 1mg/ml como fuente de nitrógeno

d) Glt o Aut significa crecimiento en amonio 15 mM o bien en arginina 0.2% respectivamente como únicas fuentes de nitrógeno.

+ significa crecimiento después de 12 Hrs de incubación en medio líquido a 37°C con agitación.

- significa que no se observa crecimiento al cabo de 48 Hrs de incubación

e) n.d. significa no detectable

f) Cepas derivadas de la silvestre MX614

g) Cepas isogénicas de la PA340

Tabla 3.

Experimento de reconstrucción genética de la cepa PA340 por transducción

DONADOR	RECEPTOR	SELECCION	CONTRASELECCION	ACTIVIDAD DE GOGAT DE LAS TRANSDUCTANTES ^a
MX971 (<u>argG31</u>)	PA340 (<u>gltB31 gdh1</u>)	Aut ⁺ ^b	Arg ⁻ (MX1163) ^c	11
MX988 (<u>gltB31</u>)	MX1163 (<u>gltA⁺argG31</u>)	Arg ⁺	Aut ⁻ (MX1165)	n.d. ^d

- a) Actividad de GOGAT en glutamina 1mg/ml como fuente de nitrógeno expresada en nmol de NADPH oxidado por min por mg de prot.
- b) Aut⁺ significa crecimiento en arginina como única fuente de nitrógeno
- c) Entre paréntesis está el número asignado a la cepa transductante aislada
- d) n.d. significa no detectable

con estas características y se le designó MX1163 (Tablas 1 y 3). Posteriormente, se propago P1 en la cepa MX988 y se cruzó por la - MX1163, en este caso la selección fue para Arg⁺ y la contraselección fue para Aut⁻, es decir gltB31; a esta cepa se le denominó -- MX1165. Como se muestra en las Tablas 2 y 3, la cepa MX1165 no -- presenta niveles detectables de la enzima, a pesar de que la cepa MX988 de donde provenía el alelo gltB31 sí presenta actividad de - GOGAT (Tablas 2 y 3); de tal manera que el alelo gltB31, en el genoma de la cepa silvestre MX614, afecta la síntesis de GOGAT, aunque no la anula, pero al transferir este mismo alelo el genoma de la cepa PA340 la actividad de GOGAT se abate y resulta en auxotrofia por glutamato.

CONSTRUCCION DE UNA CEPA gltB31 gdh1 EN GENOMA DE LA CEPA SILVESTRE MX614

Los datos anteriores, permitan suponer que la cepa PA340 tenía una tercera mutación y, por lo tanto, si el alelo gltB31 sólo disminuía la actividad de GOGAT 7 veces, entonces una cepa gltB31 y gdh1, en genoma por lo demás silvestre, posiblemente no sería -- auxótrofa de glutamato, pues la actividad de GOGAT que permite la mutación gltB31, aunque baja, tal vez fuera suficiente para permitir crecimiento en amonio aún en ausencia de GDH. Así pues, se decidió transferir el alelo gdh1 a la cepa MX988.

Como la pérdida de la GDH no resulta en ningún fenotipo observable, inicialmente, para transferir el alelo gdh1 a la cepa MX971

(argG31), fue necesario aislar una cepa que contuviera una inserción de Tn5 cotransducible por P1 con el gene gdhA. La estrategia fue la siguiente: se infectó a la cepa MX615 (Tabla 1), que tiene una delección cromosomal de la región de integración de λ , con el fago λ kan2 que lleva el elemento transponible Tn5; posteriormente, se seleccionó en medio rico con kanamicina para obtener transposiciones al azar del Tn5. Después se propagó el fago P1 en la mezcla de cepas infectadas con λ kan2 y resistentes a kanamicina, y este lisado de P1 se utilizó como vector para la transferencia de Tn5. Con éste P1 se infectó a la cepa PA340 y se hizo la doble selección $\text{Glt}^+ \text{Kan}^R$ y se contraseleccionó Aut^- . De esta forma probamos que la cepa MX1166 (Tabla 1) había heredado por transducción el alelo gdhA silvestre así como el Tn5 cercano que cotransduce aprox. 85% - 90% con este gene.

Posteriormente se utilizó este Tn5 para transferir el alelo - - gdh1 a la cepa MX614 y a la MX971 (Tabla 1). Se seleccionó resistencia a kanamicina, y por ensayo cualitativo de GDH en colonia (25), se aislaron 2 cepas que carecían de esta actividad; MX1168 y MX1172 (Tabla 1 Tabla 2).

El siguiente paso fue la transferencia del alelo gltB31 a la cepa MX1168 por cotransducción con argG para lo cual se seleccionó - - Arg^+ (Tabla 4) y se contraseleccionó el fenotipo Aut^- (Figura 1B).

Estas transductantes (MX1170 y MX1171) fueron Glt^+ , a pesar de llevar la mutación gltB31 en conjunto con la mutación gdh1 (Figura 1). En la Tabla 2 se muestran las actividades enzimáticas que tiene la cepa MX1170; como se ve, esta cepa no presenta actividad detectable de GDH, la GS no se induce por crecimiento en glutamina como fuente

Tabla 4

Construcción por transducción de cepas que llevan los alelos gltB31 y gdh1 isogénicas de la silvestre MX614.

DONADOR	RECEPTOR	SELECCION	CONTRASELECCION	FENOTIPO DE LAS TRANSDUCTANTES ^a
<u>MX988</u> <u>gltB31</u>	<u>MX1168</u> <u>gdh1</u> <u>argR31</u>	Arg ⁺	Aut ⁻ (MX1171) ^b	Glc ⁺ Aut ⁻
<u>PA340</u> <u>gltB31</u>	<u>MX1168</u>	Arg ⁺	Aut ⁻ (MX1170)	Glc ⁺ Aut ⁻

- a) Fenotipo Glc⁺ significa crecimiento en amonio 15mM como fuente de nitrógeno al cabo de 12 Hrs. de cultivo a 37°C con agitación. Aut⁻ significa que no se observó crecimiento al cabo de 24 Hrs de cultivo a 37°C con agitación en arginina al 0.2% como única fuente de nitrógeno.
- b) Entre paréntesis se especifica el número asignado a las diferentes transductantes aisladas.

FIGURA 1A.
 CURVAS DE CRECIMIENTO EN AMONIO Y AMONIO MAS 0.2 mg/ml DE L-glutamina
 DE CEPAS QUE CONTIENEN LA MUTACION gH 833
 ME 616 SILVESTRE
 ME 600 gH 833
 ME 170 gH 833 gH 833
 Cultivos procesados en NH₄

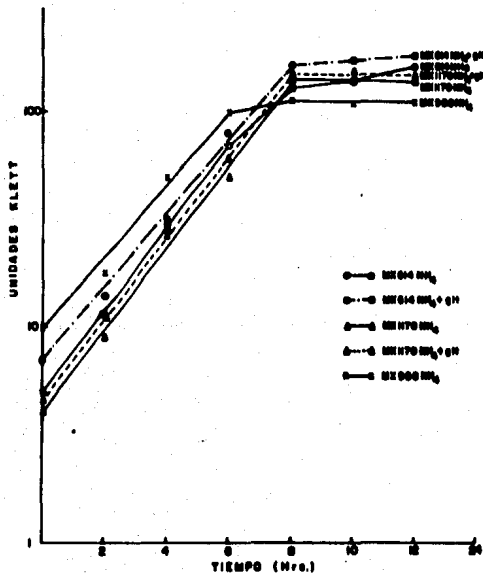
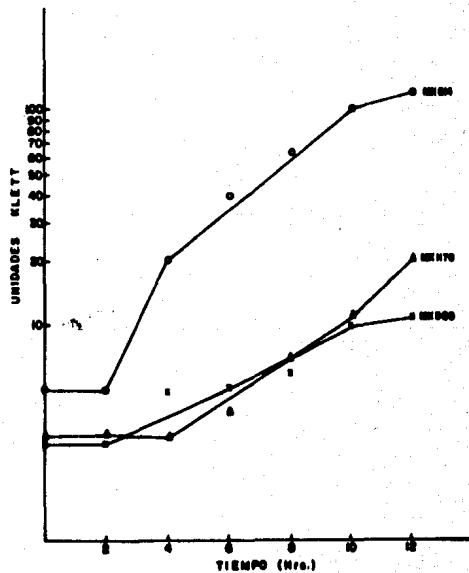


FIGURA 1A

FIGURA 1B -
 CURVAS DE CRECIMIENTO EN 0.2% DE L-ARGININA COMO UNICA FUENTE
 DE NITROGENO DE CEPAS QUE CONTIENEN LA MUTACION gH 833
 Cultivos procesados en Arginina
 ME 616 SILVESTRE
 ME 600 gH 833
 ME 170 gH 833 gH 833



de nitrógeno (tal como sucede en la PA340 ó MX988); pero sorprendentemente, no presentó niveles detectables de GOGAT.

Aún no se puede descartar si este dato se debe a que el ensayo enzimático para GOGAT no tiene suficiente sensibilidad, para detectar niveles muy bajos de esta enzima y que le pudieran ser suficientes para crecer; o bien, que en realidad esta cepa no sintetiza - - GOGAT y obtiene glutamato a partir de alguna otra reacción de transaminación o transamidación, en cuyo caso, la mutación adicional en la cepa PA340 pudiera encontrarse en algún gene involucrado en la - síntesis de transaminasas o transamidadas puesto que la PA340 si es auxótrofa de glutamato.

CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD DE GOGAT QUE PRESENTAN LAS CEPAS SILVESTRE Y MX988.

Con el objeto de descartar la posibilidad de que la actividad detectada en la MX988 correspondiera a alguna otra enzima capaz de oxidar NADPH se hicieron experimentos donde se añadió al ensayo de GOGAT dos inhibidores específicos, azaserina (0.8 mg/ml), o bien, metionina sulfona (MSF) (100mM) (34, 35). En estos experimentos - se encontró que la actividad de esta enzima registrada en cual- - quier cepa, (MX614, MX988, etc) es completamente inhibida por estos compuestos a las concentraciones señaladas, lo que sugiere que en el ensayo se está detectando una reacción de transamidación dependiente de glutamina.

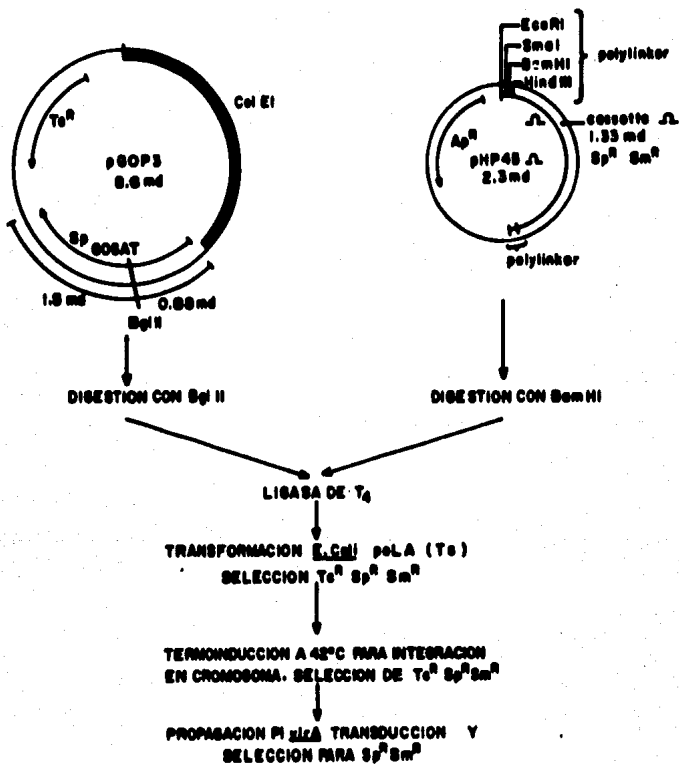
OBTENCION DE UNA CEPA QUE CONTIENE UNA MUTACION POR INSERCIÓN EN EL GENE PARA LA SUBUNIDAD PESADA DE GOGAT.

Para obtener una mutación en el gene estructural de GOGAT, y compararla debidamente con la gltB31, se realizó una mutagénesis dirigida utilizando plásmidos que contienen los genes para GOGAT de E.coli (29) que amablemente nos facilitaron el Dr. Bolívar y colaboradores.

Como se había mencionado anteriormente, los genes que codifican para cada una de las subunidades de GOGAT se tienen clonados por separado (29). El plásmido que contiene el gene para la subunidad pesada de GOGAT, pGOP3 (29; Tabla 1 y Figura 2), se utilizó para hacer una mutagénesis por inserción. Utilizamos un fragmento de DNA de 1.33 md que contienen los genes que confieren resistencia a espectinomicina y a estreptomycin (36), los cuales llevan su propio promotor, por lo que las resistencias se expresan en cualquier orientación en la que se inserte; además este fragmento está flanqueado por varios sitios de restricción lo que permite manipularlo como cassette (Figura 2, 36).

La estrategia experimental fue como sigue: el plásmido pGOP3 se digirió con la enzima de restricción BglII, para la cual posee un sitio único de corte. El sitio de BglII se encuentra dentro del gene para la subunidad pesada de GOGAT a aproximadamente 0.88 md del extremo 5'. Por otro lado se digirió el plásmido pHP45 Ω con la enzima BamHI, con lo que se obtienen dos fragmentos de DNA, uno de los cuales lleva el cassette que contiene resistencia a espectinomicina denominado fragmento Ω . Este frag-

FIGURA 2.- Esquema de la construcción de una mutación por inserción en el gene estructural de la subunidad pesada de GOGAT



Sp significa subunidad pesada de GOGAT

Ω fragmento flanqueado por múltiples sitios de restricción que codifica para la resistencia a espectinomicina (Sp^{R}) y estreptomomicina (Sm^{R}).

mento se purificó de un gel de agarosa de bajo punto de fusión, y se ligó con el pGOP3 digerido con BglII sin hacer ninguna manipulación adicional, puesto que ambas enzimas BglII y BamHI generan extremos compatibles. El plásmido resultante se utilizó para transformar la cepa RR1 seleccionando tanto para la resistencia que contiene el pGOP3, tetraciclina, como para estreptomina y espectinomicina (codificadas por el fragmento Ω).

Posteriormente, se obtuvo DNA de plásmido de las colonias - transformantes, y se verificó por patrón de digestión con la enzima HindIII, que el fragmento Ω se encontrara insertado en el sitio de BglII, es decir, dentro del gene de la subunidad pesada de - - GOGAT. Con el fin de transferir el gene mutado al cromosoma bacteriano, el plásmido resultante, pGOP3:: Ω , se utilizó para transformar a una cepa de E.coli que tiene una mutación en el gene polA -- que resulta en una DNA polimerasa I termosensible. La replicación de los plásmidos tipo ColE1 depende de la DNA polimerasa I, de forma que en una cepa polA⁻ el plásmido se pierde con una frecuencia elevada (37, 38). Utilizando esta característica de las cepas - - polA⁻ se puede forzar una recombinación del plásmido con una región de homología en el cromosoma si se mantiene presión selectiva sobre alguno o algunos de los genes para los que codifica el plásmido. En el caso de este trabajo, como muestra la Figura 2, en -- primer lugar el fragmento Ω esta insertado cerca del centro del gene de la subunidad pesada de GOGAT, en el sitio de BglII, ésto deja aproximadamente 1300 pb del extremo 5' que deben ser 100% homólogos con parte de la región cromosomal que codifica para GOGAT de la cepa receptora polA⁻ts; hacia el extremo 3' aún quedan aprox. -

2200 pb del gene silvestre para la subunidad pesada de GOGAT. Esto permite que por homología recombine fácilmente el gene clonado en el plásmido (que contiene el fragmento Ω) con su homólogo cromosomal en la cepa polA⁻. Dado que el fragmento Ω confiere resistencia a espectinomycinina y a estreptomycinina se cuenta con una selección directa para la recombinación. La estrategia fue obtener las transformantes de la cepa polA⁻ (a 30°C) con el plásmido que lleva el inserto, pGOP3:: Ω . El vehiculo codifica para la resistencia a tetraciclina, por lo que las transformantes son resistentes a los tres antibióticos. Posteriormente se hicieron incubaciones a 42°C (para inactivar la DNA polimerasa I mutante) en presencia de espectinomycinina y estreptomycinina, pero no de tetraciclina para no crear una presión selectiva para la recombinación de todo el plásmido. Posteriormente, se buscaron colonias que crecieran bien a 37°C o a 42°C en presencia de espectinomycinina y que fueran sensibles a tetraciclina.

De aproximadamente 800 colonias probadas, se encontraron 2 colonias resistentes a espectinomycinina y estreptomycinina ($Sp^R Sm^R$) y sensibles a tetraciclina (Tc^S). Estas cepas, muy probablemente, habrían sufrido una recombinación, y habrían incorporado al cromosoma la mutación por inserción del fragmento Ω .

Para transferir la inserción Ω a la cepa MX1172 (Tabla 1), derivada gdh1 de la silvestre MX614, se propagó P1 en cada una de ellas.

Si la mutación no se hubiera recombinado en el cromosoma de la cepa polA⁻ no hubiera sido posible transducirla con P1 puesto que este fago no puede encapsidar plásmidos chicos, sino que toma -

fragmentos grandes de DNA (aproximadamente 82 Kb).

De esta forma, por transducción con P1, se transfirió la mutación a la cepa MX614 y a la cepa MX1172. Para clonar la mutación se propagó P1 de estas primeras transductantes, y se transdujeron otra vez a las cepas MX1172 y MX614 seleccionando para Sp^R y Sm^R. Las cepas resultantes se les denominó MX1176 y MX1178, respectivamente. De manera que la MX1176 es una derivada de la silvestre MX614, que contiene las mutaciones gdh1 y glt::Ω, en tanto que la MX1178, solamente contiene la mutación glt::Ω.

CARACTERIZACION DE LAS CEPAS QUE CONTIENEN LA MUTACION glt::Ω.

1) Fenotipo

El primer fenotipo que se probó de las cepas que contienen la mutación glt::Ω, fue su crecimiento en amonio o arginina como únicas fuentes de nitrógeno. Como se observa en la Figura 3B, las cepas -- que contienen esta inserción presentan un fenotipo Ntr⁻, es decir no crecen en arginina como fuente de nitrógeno, lo que parece indicar -- que se requiere de actividad silvestre de GOGAT para inducir los sistemas Ntr. Por otra parte, esta cepa gltB::Ω crece igual que la silvestre en amonio puesto que posee actividad de GDH; como era de esperarse la cepa MX1176 (gdh1 glt::Ω) no crece en amonio y sí en amonio más glutamato (Figura 3-A). Es claro que las cepas que contienen la mutación por inserción tienen un comportamiento diferente de las -- que contienen el alelo gltB31, puesto que la cepa MX1170 (gltB31 - gdh1) no es auxótrofa de glutamato y crece con un tiempo de duplicación similar al de las silvestre (Figuras 1A y 3A). En -- resumen la mutación por inserción del fragmento Ω en el gene - -

FIGURA 3A -

CURVAS DE CRECIMIENTO EN ARGONINA Y ARGONINA + 0.8 mg/ml DE L-GLUTAMATO DE CEPAS QUE CONTIENEN LA MUTACION Δ .

CEHITO Δ
 CEHITO Δ + A
 CEHITO Δ + A
 Cultivos preparados en NH_4

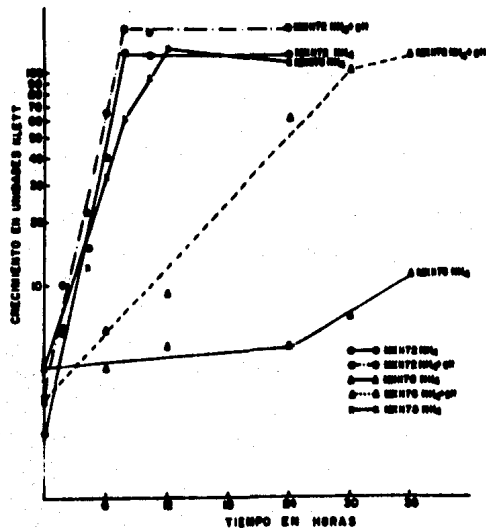


FIGURA 3 A

FIGURA 3B

CURVAS DE CRECIMIENTO EN ARGONINA COMO UNICA FUENTE DE NITROGENO DE CEPAS QUE CONTIENEN LA MUTACION Δ .

CEHITO Δ
 CEHITO Δ + A
 CEHITO Δ + A
 Cultivos preparados en Arginina

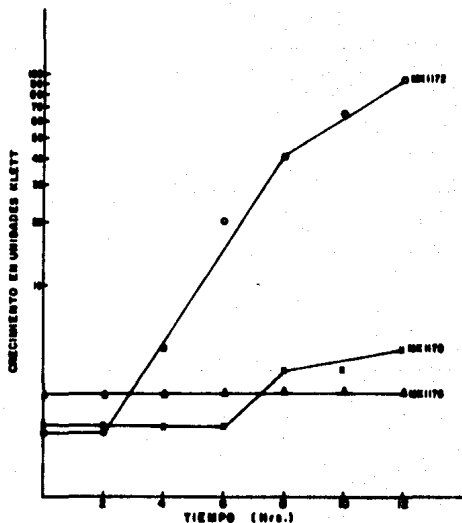


FIGURA 3B

estructural de la subunidad pesada de GOGAT, en conjunto con la mutación gdh1, son necesarias y suficientes para resultar en auxotrofia por glutamato. Sin embargo, la mutación gltB31 en combinación con el alelo gdh1 no resultan en auxotrofia por glutamato. Tanto la mutación gltB31 como glt:: Ω confieren el fenotipo Ntr⁻.

2) Mapeo por transducción.

Se realizaron experimentos por transducción con P1 para localizar genéticamente la mutación glt:: Ω ; los resultados se muestran en la Tabla 5. Como se observa, el fragmento Ω aparentemente está más cerca de argG y de glnF que gltB31. Según los datos de la Tabla 5, los marcadores se pueden acomodar como se muestra en la Figura 4A; donde se observa que el fragmento Ω se encuentra entre -- argG y gltB, muy cerca de glnF. En esta figura (4 B) se muestra el mapa de esta región del cromosoma, reportado por Pahel y colaboradores (25) en donde gltB y glnF cotransducen con argG 44% y 22%, respectivamente. Los datos presentados en esta tesis no coinciden con los reportados, pero las frecuencias de cotransducción que se obtuvieron entre glnF y argG, y entre el fragmento Ω y glnF coinciden cuando se realizan las cruces inversas (39 y Tabla 5). Sólo para comparar, se incluyó en la Figura 4 el mapa de la región glt de S.typhimurium reportado por Madonna et al. (32). En este caso se le denominó gltB al gene para la subunidad pesada de GOGAT, y gltD al de la ligera. Estos genes no cotransducen con argG como en E.coli, aunque se encuentran en una región análoga del cromosoma cerca de glnF y de cod.

En resumen, los datos de cotransducción indican que la mutación gltB31 y glt:: Ω se localizan en lugares diferentes con respec

Tabla 5

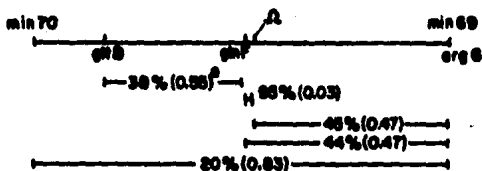
Mapeo por transducción de las mutaciones gltB31 y glt:: Ω con respecto a glnF74::Tn5 y argG31

DONADOR	RECEPTOR	SELECCION	CONTRASELECCION	% DE COLONIAS QUE CONTIENEN EL MARCADOR NO SELECCIONADO
<u>MX988</u> <u>gltB31</u>	<u>MX848</u> <u>glnF74::Tn5</u>	Gln ⁺ MS ^R	Aut ^{-b}	36 (73/200)
MX988	<u>MX971</u> <u>argG31</u>	Arg ⁺	Aut ⁻	20 (100/500)
<u>MX1176</u> <u>glt::Ω gdh1</u>	MX848	Sp ^R Sm ^R C	Kan ^R d Gln ⁻	5 (5/100)
MX848	MX1176	kan ^R	Sp ^R Sm ^R	8 (8/100)
MX1176	MX971	Arg ⁺	Sp ^R Sm ^R	45 (89/200)

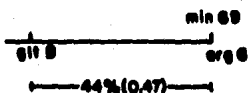
- a) Gln⁺ significa crecimiento en amonio como fuente de nitrógeno
MS^R significa crecimiento en amonio 15mM más 80 μ M de metionina DL-sulfoximina.
- b) Aut⁻ significa que no se observa crecimiento en arginina 0.2% como fuente de nitrógeno.
- c) Sp^RSm^R significa crecimiento en 20 μ g/ml de espectinomicina y 100 μ g/ml de estreptomicina respectivamente.
- d) Kan^R significa crecimiento en presencia de 30 μ g/ml de kanamicina

FIGURA 4 - Mapa de la región glt de E. coli.

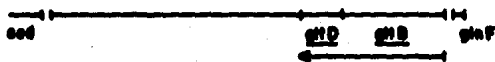
A) Mapa elaborado según los datos de la Tabla 5.



B) Mapa de la región glt de E. coli según Pachel et al (25)



C) Mapa de la región glt de S. typhimurium según Madonna et al (32)^b



a) Los números entre paréntesis indican distancia en min, los porcentajes son la frecuencia de cotransducción entre los marcadores.

b) gltB gene para la subunidad pesada de GOGAT

gltD gene para la subunidad ligera de GOGAT

La flecha indica el sentido de la transcripción que es en el sentido de las manecillas del reloj.

to a argG y qlnF.

3) Localización física de la inserción del fragmento Ω .

Para demostrar que el fragmento Ω se encuentra en el gene de la subunidad pesada de GOGAT, se hizo un experimento de hibridización DNA-DNA tipo Southern (40).

El experimento fue el siguiente y se encuentra esquematizado en la Figura 5. Se purificó DNA cromosomal de las cepas MX1172 -- (gdh1) y MX1176 (gdh1, qlt:: Ω). Estos DNAs se digirieron con la enzima HindIII, y se corrieron en un gel de agarosa al 1% en buffer de acetatos (Material y Métodos); posteriormente, se transfirió el DNA a un filtro de nitrocelulosa y se hibridizó con el plásmido pGOP3 (Figura 5) marcado con CTP (32 P). Se obtuvo el resultado que se muestra en la figura 5B. De los 5 fragmentos que se generan al cortar pGOP3 con HindIII (Figura 5B, carril 1), el mayor (4md) no hibridiza con el DNA cromosomal ya que sólo incluye secuencias del vehículo; el siguiente fragmento de 2.65 md incluye alrededor de 0.5 md del extremo 3' del gene para la subunidad pesada, y el resto es vehículo. Los otros 3 fragmentos, de 1.2 md, -- 0.44 md y 0.35 md, son internos del gene estructural. El fragmento Ω se insertó en el sitio de BglIII que está dentro del fragmento de 1.2 md. En la cepa MX1172 (gdh1) se observan las 3 bandas correspondientes a los fragmentos internos, y otra banda de aproximadamente 2.4 md que corresponde al extremo 3' del gene de la subunidad pesada hasta el siguiente sitio de HindIII en el cromosoma, -- que se localiza en el gene para la subunidad ligera (ver mapa -- PRSP20 Figura 6).

FIGURA 5 -

A) Mapa lineal del plásmido pGCF3

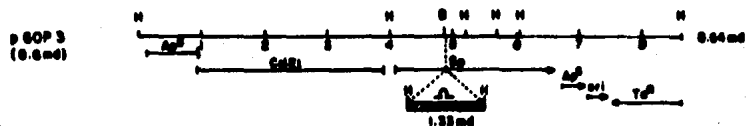
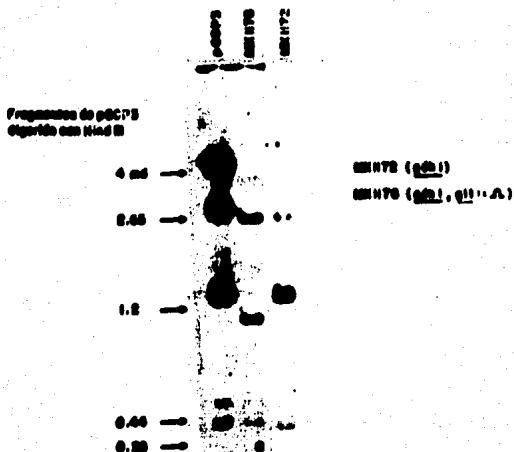


FIGURA 5 B - Autorradiografía de la hibridación de DNA cromosomal digerido con Hind III contra pGCF3



Se muestran los sitios de Hind III (H) y el sitio único de Sma I (S) donde se insertó el fragmento. Sp significa genes para la subunidad pesada que se transcribe en el sentido que indica la flecha.

En la cepa que lleva la mutación glt:: Ω (MX1176), el fragmento de 1.2 md desaparece, y se genera un fragmento de 0.88 md que corresponde al tamaño esperado al interrumpir el fragmento de 1.2 md en el sitio de BglII por el cassette Ω (que está flanqueado por sitios de HindIII y por lo tanto se escinde completo con la digestión y de esta manera no altera los tamaños de los fragmentos); también se genera un fragmento más pequeño de 0.28 md que corresponde al resto del fragmento de 1.2 md, desde el sitio de BglII hasta el siguiente sitio de HindIII.

Con este experimento se demuestra claramente que el fragmento Ω se encuentra insertado en la primera mitad del gene estructural de la subunidad pesada de GOGAT.

4) Actividades enzimáticas de las diferentes mutantes.

Se determinaron las actividades enzimáticas de GS, GDH y GOGAT de las cepas que contienen la mutación glt:: Ω en diferentes condiciones de crecimiento. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Como se puede observar la actividad de GOGAT de la cepa silvestre no varía por crecimiento en exceso de amonio (15mM) o por limitación de nitrógeno (glutamina 1 mg/ml) y presenta una actividad de aproximadamente 70 nmol de NADPH oxidado por min por mg de prot. Como ya se había mencionado, la cepa MX988 (gltB31) tiene una actividad de esta enzima de aproximadamente 7 veces menos que la silvestre (aproximadamente de 10 nmol NADPH oxidado por min por mg de proteína). Como se observa en esta Tabla, y según lo esperado, las cepas MX1176 y MX1178 que contienen la mutación glt:: Ω no presentan actividad detectable de GOGAT. La cepa MX1178 presenta una activi-

TABLA 6

Actividad enzimática de GS, GDH y GOGAT de cepas que contienen la mutación glt:: Ω

Cepa	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ^a							
	GOGAT		GDH		GS		Fenotipo	
	NH ₄	Gln	NH ₄	Gln	NH ₄	Gln	Glt	Aut
MX614 Silvestre	76	75	206	239	128	1040	+	+
MX988 <u>gltΩ31</u>	9	12	256	236	100	220	+	-
PA340 <u>gltΩ31</u> <u>gdh1</u>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	270	260	-	-
MX1172 <u>gdh1</u>	76	79	n.d.	n.d.	120	1100	+	+
MX1176 <u>gdh1</u> <u>glt::Ω</u>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	330	410	-	-
MX1170 <u>glt::Ω</u>	n.d.	n.d.	167	256	100	190	+	-

a) Todos los símbolos utilizados en esta Tabla son los mismos que los de la Tabla 2.

dad de GDH similar a la de la silvestre, y por lo tanto no es auxótrofa de glutamato aunque sí es Aut⁻ (debido a la mutación glt::Ω).

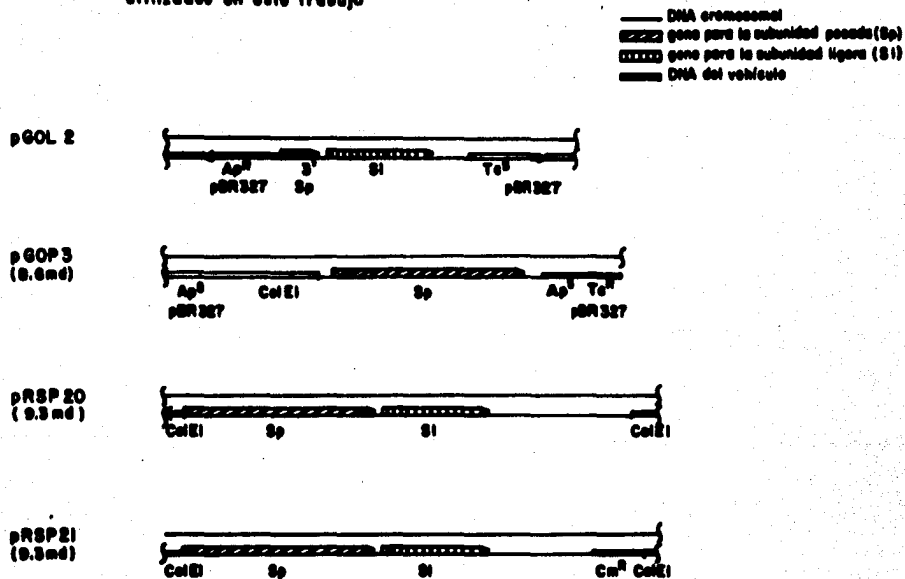
En cuanto a las actividades de GS, la silvestre presenta aproximadamente 10 veces más actividad de esta enzima en cultivos en glutamina como fuente de nitrógeno que en exceso de amonio. Es interesante recalcar que tanto la mutación gltB31 como la glt::Ω tienen un efecto pleiotrópico sobre la inducción de GS cuando las células se crecen en glutamina, como única fuente de nitrógeno como lo muestran las actividades de GS en las cepas MX988 y MX1176 - - (glt::Ω) en ambas fuentes de nitrógeno. La cepa MX1176 (gdh1 - - glt::Ω) presenta niveles ligeramente más elevados de GS, aunque al na recer, tampoco están regulados por la fuente de nitrógeno.

En resumen se puede decir, por una parte, que cepas que contienen la mutación glt::Ω no presentan niveles detectables de GOGAT, a diferencia de cepas que contienen el alelo gltB31. Sin embargo, los dos tipos de mutación tienen 2 características en común, una de ellas es que ambos alelos confieren a la cepa la incapacidad de inducir la síntesis de GS en respuesta a limitación de nitrógeno por crecimiento en glutamina; la otra se refiere a que ambas mutaciones confieren el fenotipo Aut⁻.

5) Experimentos de complementación con plásmidos.

Los plásmidos utilizados en estos experimentos de complementación fueron los siguientes (Fig. 6). En términos generales, el plásmido pGOL2 (29) contiene el gene completo para la subunidad ligera de GOGAT (S1⁺), y dirige la síntesis de la subunidad ligera en un sistema de minicélulas (29). El plásmido pGOP3 (Figuras 5 y

FIGURA 3. Esquema de las porciones relevantes de los plásmidos utilizados en este trabajo



Las puntas de las flechas indican el sentido de la transcripción.
 El DNA del vehículo no está trazado a escala. Los supraíndices indican: R, resistencia; S, sensibilidad al antibiótico indicado

6) contiene solamente el gene de la subunidad pesada completo (Sp^+), y también es capaz de dirigir la síntesis de esta proteína en el -- sistema de minicélulas. El plásmido pRSP20, que fue el aislado ori-- ginalmente (27), contiene un fragmento cromosomal de 5.7 md que in-- cluye los dos genes estructurales de GOGAT (Figura 6). Por último, se utilizó un derivado de pRSP20, denominado pRSP21 (Figura 6), el cual es el resultado de sustituir un fragmento SmaI - SmaI de apro-- ximadamente 2 md en el pRSP20 (este fragmento se localiza a aproxi-- madamente 1.3 md hacia abajo del extremo 3' del gene para la subuni-- dad ligera por lo que esta sustitución no afecta la síntesis de la enzima), por un fragmento de aproximadamente el mismo tamaño, que -- codifica para la resistencia a cloranfenicol. Este nuevo plásmido, pRSP21, representa una ventaja para la manipulación de cepas que lo contienen, ya que ahora es posible presionar para su mantenimiento en la célula utilizando medios con cloranfenicol que, a diferencia de la colicina, da resultados más claros.

Los plásmidos arriba mencionados se introdujeron por transfor-- mación en las diferentes cepas y en todos los casos, excepto con -- pRSP20, se seleccionó en medio rico con el antibiótico adecuado. -- Debido a la falta de un marcador adecuado para su selección, sólo -- se pudo transformar las cepas PA340 y MX1176 (que son auxótrofas de glutamato) y se seleccionó en medio mínimo con amonio como única -- fuente de nitrógeno.

Como se puede ver en la Tabla 7 ninguna de las 2 subunidades -- por separado es capaz de complementar el fenotipo Git^- p Aut^- de la cepa PA340. Sólo los plásmidos pRSP20 ó pRSP21 complementan para ambos fenotipos; es decir, las cepas PA340/pRSP20 ó PA340/pRSP21 --

Tabla 7.

Actividad enzimática y fenotipos que presentan las diferentes cepas complementadas con distintos plásmidos.

Cepa	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ^a							
	GOGAT		GDH		GS		Fenotipo	
	NH ₄	Gln	NH ₄	Gln	NH ₄	Gln	Glt	Aut
MX614 Silvestre	76	75	206	239	128	1040	+	+
MX988 glt:β31	9	12	256	236	100	220	+	-
MX1176 glt:α gdh1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	330	410	-	-
PA340 glt:β31 gdh1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	260	270	-	-
MX1176/pGOL2 S1^b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	460	450	-	-
MX1176/pGOP3 Sp^c	87	72	n.d.	n.d.	200	320	+	-
MX1176/pRSP21 Sp^bS1^d	628	586	n.d.	n.d.	210	731	+	+
MX988/pGOL2 S1^b		7		113		170	+	-
MX988/pGOP3 Sp^b		8		142		270	+	-
MX988/pRSP21 Sp^bS1^b		212		132		114	+	+
PA340/pGOL2 S1^b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	120	110	-	-
PA340/pGOP3 Sp^b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	130	120	-	-
PA340/pRSP21 S1^bSp^b	126	97	n.d.	n.d.	160	70	+	+
MX614/pRSP21	758		229		150		+	+

- a) todos los símbolos utilizados en esta tabla son los mismos que en la tabla 2
- b) Plásmido que lleva el gene para la subunidad ligera de GOGAT (Sl⁺)
- c) Plásmido que codifica para la subunidad pesada de GOGAT (Sp⁺)
- d) Plásmido que codifica para las 2 subunidades de GOGAT

son Aut^+ y Glt^+ (Tabla 7).

Lo mismo sucede con el fenotipo Aut^- de la cepa MX988 (gltB31), es decir, ninguna de las 2 subunidades de GOGAT por separado fue capaz de complementar a esta cepa para el fenotipo Aut^+ , sólo el plásmido pRSP21 (o pRSP20) confirieron este fenotipo.

Por lo que respecta a la cepa MX1176 (glt:: Δ , gdh1), esta cepa tampoco se complementó para el fenotipo Aut^+ con ninguna de las dos subunidades por separado y, otra vez, el plásmido completo complementó para los fenotipos Aut^+ y Glt^+ ; sin embargo, resultó interesante que el fenotipo Glt^- de esta cepa se complementó por el plásmido que codifica sólo para la subunidad pesada (pGOP3) (Tabla 7), lo que no ocurrió con el fenotipo Aut^- . La cepa MX1176/pGOP3 presentó actividad de GOGAT semejante a la que presenta la cepa silvestre apoyando el hecho de que la subunidad ligera se sintetiza en cepas que llevan la mutación glt:: Δ que al complementarse en trans por la subunidad pesada codificada por el plásmido, se producen niveles de GOGAT suficientes para que exista crecimiento en ausencia de glutamato. Cabe mencionar que la actividad de GDH no varió por la presencia de ninguno de los plásmidos utilizados, así como tampoco por las fuentes de nitrógeno probadas.

Las cepas PA340 y MX988 (gltB31) presentaron un comportamiento similar: ninguna de las subunidades por separado introducidas por transformación afectó las actividades ni de GOGAT ni de GS; es decir la PA340 transformada con pGOP3 o con pGOL2 no presentó actividad detectable de GOGAT, y tampoco indujo la GS por crecimiento en glutamina. La cepa MX988 transformada con pGOL2 o con pGOP3 presentó aproximadamente 7 veces menos actividad de GOGAT que la silvestre

(igual que la cepa MX988 sin plásmido); la GS en la MX988/pGOL2 tam poco se indujo en glutamina. Estas cepas (PA340 y MX988) complementadas con pRSP21 presentaron actividad de GOGAT (aproximadamente 2 veces más que la silvestre en el caso de la PA340, y alrededor de 3 veces más para la MX988); y sin embargo en ambos casos (PA340/pRSP21 y MX988/pRSP21), la GS no se indujo como respuesta al crecimiento en glutamina (Tabla 7).

La cepa MX1176 presentó un comportamiento notablemente distinto. Por un lado, el plásmido pGOP3 en esta cepa fue capaz de complementar para actividad de GOGAT, a niveles similares a los de la cepa silvestre, en tanto que la actividad de GS, no se indujo en glutamina. Por otro lado, la cepa MX1176 conteniendo pRSP21 presentó actividades de GOGAT 8 a 10 veces mayores que la silvestre, que pudiera deberse a un efecto multicopia, a diferencia de lo que sucede en la PA340 y en la MX988. Esta cepa (MX1176/pRSP21), sí indujo la síntesis de GS por crecimiento en glutamina como fuente de nitrógeno (Tabla 7), a diferencia de lo que sucedió en las cepas que contienen el alelo glbD31 (PA340 y MX988).

La cepa silvestre MX614, transformada con pRSP21, también presentó efecto multicopia, es decir, sintetizó aproximadamente 10 veces más actividad de GOGAT que la silvestre (Tabla 7).

Dado el hecho de que una inserción polar en la subunidad pesada de GOGAT pudo complementarse con un plásmido que lleva únicamente esta subunidad, no se puede pensar que la cepa PA340 tiene una mutación similar puesto que se comportaría como la cepa que lleva el alelo glt: Δ pero posiblemente se trate de una delección de manera

que no sea posible complementarla con ninguna de las 2 subunidades por separado.

Para explorar esta posibilidad se efectuó un experimento de hibridización DNA-DNA tipo Southern utilizando DNA cromosomal de la cepa PA340 así como de la MX988, usando como monitor el plásmido - - pRSP21. La autorradiografía en la Figura 7A (carril 3) muestra que la cepa PA340 carece de los genes de GOGAT; sorprendentemente la - - MX988 tampoco hibridizó con estos genes (Figura 7A, carril 2). Así mismo, en este experimento se incluyó la cepa MX1163, y como se ve - en el carril 6 de la Figura 7A, los genes de GOGAT en este caso sí - estuvieron presentes.

Como la cepa PA340 es una delección de al menos los 2 genes estructurales de GOGAT, la transferencia de una delección por transducción, no ocurre con la misma frecuencia que la transferencia de una mutación puntual. De tal forma que, posiblemente, durante el proceso de construcción de la cepa MX988 por cotransducción con argG, se - haya obtenido una mezcla de cepas, aquellas que hubieran heredado la delección de GOGAT (lo que debe resultar en fenotipo Aut⁻), y aque - llas que hubieran heredado alguna mutación regulatoria presente en - la cepa PA340 (ver Discusión) y que también resulte en fenotipo Aut⁻.

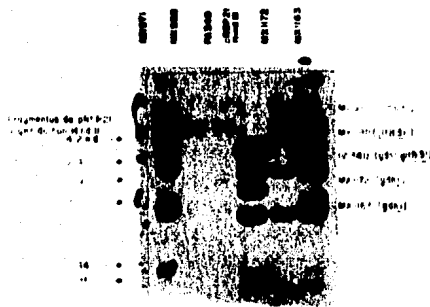
Para explorar esta posibilidad, se hicieron otros dos experimen - tos de hibridización DNA-DNA que se muestran en la Figura 7B. Se -- aislaron 50 colonias Aut⁻ tal como se aisló la cepa MX988: se propa - go P1 en la cepa PA340, y se cruzó por la cepa MX971 (argG31), se se - leccionó Arg⁺ y se aislaron 50 colonias Aut⁻. Posteriormente se cre - cieron sobre un filtro de papel Whatman 3MM durante 12 Hrs a 37°C.

Estas colonias se utilizaron para hacer hibridización en colonia contra el plásmido pGOP3 marcado con dCTP (32 p) para determinar que porcentaje de colonias Aut^- provenientes de esta cruce conservan los genes de GOGAT.

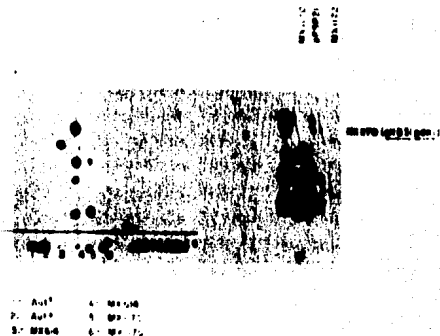
Como se muestra en la Figura 7B, de 50 colonias probadas, sólo 7 hibridizaron contra el gene de la subunidad pesada. En la última hilerera se encuentran dos colonias Aut^+ (Arg^+) de la misma cruce, dos colonias de la cepa silvestre MX614, y dos colonias de la cepa MX1170 - (gltB31 gdh1). Estas 6 colonias también presentaron hibridización -- con el gene de la subunidad pesada, incluyendo la cepa MX1170. Para ver si la cepa MX1170 conserva los genes estructurales de GOGAT, como los de la cepa silvestre, se purificó DNA cromosomal de esta, y se hizo un Southern utilizando como probador el plásmido pRSP21. Como se muestra en la figura 7B, las cepas MX1170 y MX1172 presentaron el mismo patrón de hibridización de los genes para GOGAT.

1) **Hind III. Autoradiografías de la hibridación in situ cromosomal (gel 1)**
con **Hind III**

A) Hibridación contra **pRSP21**



B) Hibridación en colonias de transformantes Aut⁺ contra **pRSP21**
C) Hibridación de DNA cromosomal de la cepa **MX1170**
contra **pRSP21**



La hibridación en colonia se realizó escogiendo 50 transduc-
tantes Aut⁺ de la siguiente cruce: se propagó P1 en la cepa -
PA340, y con él se infectó a la cepa MX971 (arg31) seleccio-
nando para Arg⁺.

Como controles se incluyeron 2 colonias Aut⁺ de esta cruce --
(marcadas Aut⁺) 2 colonias de la cepa silvestre MX614 y 2 de
la cepa MX1170 (glc31, gdh1) a un lado se muestra el Southern
de DNA cromosomal de las cepas MX1170 y MX1172 (gdh1) digeri-
do con Hind III e hibridado con pRSP21 marcado con d CTP --
(32p).

DISCUSION

Tomando en cuenta que existe poca información sobre la regulación de la expresión de GOGAT, y su relación con los sistemas Ntr y con GS; en este trabajo traté de responder algunas preguntas que surgieron a partir de la caracterización de la cepa MX988 (gltB31) (Tabla 2). Como se enfatizó en la sección de Antecedentes y en la de Resultados, esta cepa presenta actividad detectable de GOGAT, - aunque siete veces menos que la cuantificada en la cepa silvestre (Tabla 2); sin embargo, la cepa PA340, de donde proviene el alelo - gltB31, no posee actividad de la enzima, y es auxótrofa de glutamato. Estos datos sugieren que la cepa PA340 tiene al menos otra mutación. Con el objeto de investigar más a fondo esta posibilidad, así como para obtener más información acerca de los mecanismos -- que controlan la síntesis de GOGAT, se hizo una mutagenesis dirigida en el gene para la subunidad pesada de GOGAT. La caracterización de esta mutación arrojó algunos datos sobre la regulación de la síntesis de GOGAT, así como ciertos aspectos sobre la organización física del operón constituido por sus genes estructurales; -- también permitió comparar el fenotipo de la mutación estructural - con el que presentan las cepas que contienen el alelo gltB31.

Ahora bien, en cuanto a la hipótesis de que la cepa PA340 tiene una mutación regulatoria, los datos que la apoyan son los siguientes:

1) El experimento de reconstrucción genética de la PA340 mostrado en la Tabla 3, indica que al retransferir el alelo gltB31 de la --

cepa MX988, a la cepa MX1163, que es una derivada glt^B de la - - PA340 por transducción (Tabla 3), resulta en la supresión de la -- síntesis de GOGAT y en auxotrofia por glutamato.

2) La cepa MX1163 (Tabla 3), que por experimentos tipo Southern - se mostró que adquirió los genes silvestres de GOGAT (Figura 7A, - carril 6); presenta niveles bajos de actividad enzimática (1nmol- de NADPH oxidado/min/mg de protefna).

Es un experimento similar, pero seleccionando 2 transductan-- tes Aut⁺ a partir de la cepa MX1176 (glt:: Ω gdh1) se regeneró el - 90% de la actividad de GOGAT (datos no mostrados). Esto indica -- que por transducción, en el caso de la PA340, no es posible regene- rar todos los fenotipos que caracterizan a la cepa silvestre; sin embargo para la mutación estructural, se regeneró casi totalmente la actividad de GOGAT.

3) La cepa PA340 complementada con el plásmido pRSP21 tiene una - actividad de GOGAT, solo 2 a 2.5 veces mayor que la cepa silvestre (Tabla 7). Sin embargo la cepa MX1176 (glt:: Ω) o la MX614 comple- mentada con el mismo plásmido presentan de 8,5 a 10 veces más acti- vidad enzimática que la silvestre sin plásmido (Tabla 7). Estos - datos podrían deberse a que tanto en la cepa silvestre como en la .MX1176, se observa un efecto multicopia que no se aprecia en la ce- pa PA340 debido a la mutación regulatoria.

4) El experimento de la Figura 7A, carril 3, muestra conclusiva- mente que la cepa PA340 es una delección que abarca al menos los -- dos genes estructurales de GOGAT. Esto por sí solo, sin duda ex- plica tanto el hecho de que la cepa no presenta actividad de esta

enzima, como su fenotipo Aut^- . Sin embargo, en la Figura 7B se muestra la hibridización DNA-DNA de 50 colonias aisladas tal como se obtuvo la cepa MX988, siete de cincuenta transductantes Aut^- , hibridizan con la subunidad pesada de GOGAT, lo que indica que conservan los genes de la enzima. Esto implica que la mutación regulatoria que posee la cepa PA340, también confiere el fenotipo Aut^- , y cotransduce con argG.

Para este trabajo, tal vez no sea tan importante explicar los diversos fenotipos de la PA340 (cuya genealogía no conocemos con certeza), como explicar los de la cepa MX988. También en este caso por el experimento de la Figura 7A, carril 2, es claro que tiene la misma delección que la PA340. Por el experimento de la Figura 7B, se observa que hay cepas aisladas como la MX988 que conservan los genes de GOGAT. El hecho de que hay mezcla de poblaciones, es decir, unas que heredaron la delección, otras que adquirieron la mutación regulatoria, o bien aquellas que hayan heredado ambas pueden explicar el dato de que durante las primeras determinaciones de actividad de GOGAT se haya trabajado con mezcla de poblaciones puesto que se utilizaron varios aislados de la misma cepa, y resultaría en detección de actividad en las transductantes que no hubieran heredado la delección.

De cualquier forma, la cepa MX988 que se utilizó en el experimento de la Figura 7B carril 2, no lleva los genes de GOGAT. Sin embargo las determinaciones de actividad de GOGAT de esta cepa se realizaron en extractos dializados y en presencia de inhibidores específicos de transaminasas (azaserina y MSF); el resultado indica que presenta actividad baja, aunque detectable, de una transaminasa

dependiente de glutamina que utiliza α -cetoglutarato y oxida NADPH. Cabe mencionar que el ensayo de GOGAT no es muy específico puesto que se mide la oxidación de NADPH en presencia de α -cetoglutarato y glutamina, de manera que es posible que se trate de otra transaminasa y no de GOGAT. Parece probable que durante la construcción de esta cepa, se seleccionó alguna mutación que resulta en la sobreproducción de alguna transaminasa o transaminasa cuya actividad interfiere con el ensayo de GOGAT.

Considerando lo arriba mencionado, hay dos explicaciones posibles para entender el fenotipo de la cepa MX1170 (gltB31 gdh1). Como se observa en la Figura 1A, la cepa no es auxótrofa de glutamato y crece en amonio con un tiempo de duplicación muy similar al de la silvestre en la misma condición. Los resultados indican que: a) la cepa no crece en arginina como fuente de nitrógeno (Figura 1B y Tabla 2), en esta Figura se observa que esta cepa alcanza sólo 20 unidades Klett (u.K.) a las 12 Hrs. y llega a alrededor de 40 u.K. a las 24 Hrs. (probablemente en este momento se trate de mutaciones supresoras Aut^+ que aparecen con relativa alta frecuencia (25); la silvestre, en cambio, a las 12 Hrs de incubación alcanza aproximadamente 120 u.K. b) la cepa MX1170 es incapaz de inducir la síntesis de GS por crecimiento en glutamina (Tabla 2) c) no presenta actividad detectable de GOGAT (Tabla 2). Todo esto sugiere que la cepa contiene el alelo gltB31, pero resulta difícil de explicar puesto que no presenta actividad de ninguna de las dos enzimas que sintetizan glutamato.

Por el experimento de la Figura 7B, se demostró que la cepa -- MX1170 posee los genes estructurales de GOGAT y, aparentemente, durante su construcción se le transfirió una mutación regulatoria responsable de los fenotipos mencionados. El hecho de que no presenta actividad de GOGAT, podría indicar que la mutación regulatoria abate la síntesis de la enzima hasta un grado que no es posible detectar por este ensayo, pero que se produjeran niveles suficientes de la enzima para proveer a la célula con el glutamato necesario para permitir su crecimiento en amonio. Se están empezando a realizar experimentos de hibridación de RNA de esta cepa contra un probador de DNA para ver si se detecta el mRNA de GOGAT.

Otra explicación para el fenotipo de la MX1170, es que durante su construcción se haya seleccionado la sobreproducción de alguna transamidasa o transaminasa que provea a la célula del glutamato necesario para crecer, de manera análoga a lo que se propone que ocurre en la cepa MX988.

Existen varias transamidases que utilizan glutamina, y producen glutamato al catalizar la transferencia del grupo amido de la glutamina; también se conocen algunas transaminasas que utilizan α -cetoglutarato como aceptor del grupo amido de varios aminoácidos lo que resulta también en la producción de glutamato.

Es interesante el hecho de que a la cepa PA340 se le puede sustituir el glutamato que necesita para crecer, por aspartato; este compuesto transamina con α -cetoglutarato para formar glutamato y oxaloacetato, pero parece ser necesario agregar concentraciones relativamente elevadas de aspartato (200 $\mu\text{g/ml}$) para que la cepa pueda producir suficiente glutamato a través de esta vía; pero - -

podría ser que esta enzima se sintetizara en mayores cantidades en las cepas MX1170 y MX988. Otra posibilidad es la enzima asparagino sintetasa dependiente de glutamina (codificada por el gene - - asnB). La reacción que cataliza es la transferencia del grupo amido de la glutamina al carbono y del aspartato para formar glutamato y asparagina.

Desde luego hay que realizar varios experimentos para explorar más a fondo estas posibilidades: por una parte hay que determinar actividad enzimática de algunas transamidases y transaminasas en extractos de las cepas MX988 y MX1170 comparadas con la cepa -- silvestre. Por otro lado, vale la pena afinar el ensayo de GOGAT para medir específicamente producción de glutamato conjuntamente - con el consumo de glutamina y NADPH en las proporciones estequiométricas de la reacción que cataliza GOGAT, y cuantificarlo en extractos de varios aislados de la cepa MX988 así como en la MX1170. También se puede hacer un experimento de inmunoprecipitación de - los extractos de estas cepas con anticuerpos específicos contra -- GOGAT.

En resumen, pueden afirmarse algunas cosas de los datos mencionados en esta parte de la DISCUSIÓN:

a) La cepa PA340 tiene al menos 3 mutaciones:

1.- gdh cuyo único fenotipo es la pérdida de la actividad de GDH.

2.- (glt)_Δ delección de al menos los dos genes estructurales de - GOGAT, que resulta en la pérdida de la actividad enzimática y en el fenotipo Aut⁻.

iii.- Una mutación regulatoria que también confiere el fenotipo Aut^- y cotransduce con argG.

b) A las cepas aisladas como Aut^- por cotransducción con argG se les denominó MX988, pero hay al menos 2 y posiblemente 3 tipos de recombinantes.

i.- aquellas que heredaron la delección de los genes de GOGAT.

ii.- las que heredaron la mutación regulatoria.

iii.- las que adquirieron ambas.

En cuanto a la cepa MX1176 (glt:: Ω , gdh1), como se muestra en la figura 5B, carril 2, la inserción del fragmento Ω se encuentra dentro del gene para la subunidad pesada de GOGAT, y como era de esperarse, no presenta actividad detectable de GOGAT (Tabla 6).

Los datos de mapeo genético indican que dicho fragmento se encuentra relativamente cerca del gene argG (40%-45% de cotransducción, (Tabla 5, Figura 4A).

Como se ve en esta Tabla, la cotransducción entre argG y el gene que confiere el fenotipo Aut^- (gltB31?) de la cepa MX988 (o de la -- PA340) es de un 20%. Inicialmente, esta diferencia en cotransducción con respecto a argG de la mutación glt:: Ω comparada con gltB31, parecía apoyar la hipótesis de que eran mutaciones diferentes; sin embargo, la frecuencia de cotransducción disminuye cuando se transfiere -- una delección, y esta disminución depende, entre otras cosas, del tamaño de la misma. De manera que las diferencias en cotransducción mostradas en la Tabla 5 y Figura 4, no indican necesariamente que se encuentren en posiciones diferentes del mapa, sino que podría reflejar el hecho de que se esté transfiriendo una delección y/o una mutación -

puntual.

Con respecto a la caracterización fisiológica de las cepas -- que contienen la mutación glt:: Ω , en la Tabla 7 se presentan una serie de datos con el propósito de comparar los fenotipos de las cepas MX1176, MX988 y PA340.

En primer término puede decirse que la cepa PA340 y MX988 tienen un comportamiento muy similar en cuanto a las actividades enzimáticas determinadas y fenotipos probados cuando se complementan con los diferentes plásmidos; la cepa MX1176 tiene un comportamiento muy diferente.

Cuando se hacen transformaciones de las cepas MX988 y PA340 con cada uno de los plásmidos que contienen las subunidades de GOGAT por separado (pGOL2 sl^+ ; pGOP3 sp^+); ninguna cambia su fenotipo con respecto a la cepa sin plásmido. Esto es, la cepa PA340, permanece $Glt^- Aut^-$, y no presenta actividad detectable de GOGAT ni de GDH; la actividad de GS, no se induce en glutamina. La cepa MX988 transformada, conserva el fenotipo Aut^- así como los niveles bajos de actividad de GOGAT que presenta la cepa sin transformar; las actividades de GDH y GS tampoco sufren cambio; cuando se transforma a las cepas PA340 y MX988 con el plásmido completo, pRSP20 o pRSP21, entonces, sí hay complementación para el fenotipo Aut^+ en ambos casos, y para el fenotipo Glt^+ en el caso de la PA340. En cuanto a las actividades de GOGAT, la cepa PA340/pRSP21, presenta alrededor de 2 veces más actividad de la enzima que la silvestre, y para el caso de la MX988 con el mismo plásmido, presenta 3 veces mayor actividad que la silvestre. A pesar de que --

este plásmido, pRSP21, complementa para casi todos los fenotipos - en estas cepas; la GS no se induce por crecimiento en glutamina, - es decir permanece igual que en las cepas sin complementar. Este dato apoyaría también la existencia de una mutación regulatoria -- adicional en estas cepas, (PA340 y MX988) que tiene un efecto - - pleiotrópico sobre la inducción de GS. Para el caso de la cepa -- MX1176, cuando se le complementa con el plásmido pGOP3 (Sp⁺) presenta fenotipo Glt⁺ y actividad de GOGAT muy semejante a la silvestre (Tabla 7). De este dato se desprende una conclusión importante: sabemos que el fragmento Ω contiene secuencias de terminación de la traducción y de la transcripción en ambos extremos (36), y - que por lo tanto debe generar mutaciones polares. Sin embargo en la cepa MX1176 hay síntesis de la subunidad ligera, lo que sugiere que el gene de esta subunidad posee su propio promotor tal y como se habia propuesto anteriormente (29). El hecho de que el mismo - plásmido no complementa para la actividad de GOGAT a la cepa PA340 ni a la MX988, se explica si consideramos que ambas cepas poseen - una delección que incluye los dos genes estructurales (Figura 7A).

Ahora bien, la mutación glt:: Ω confiere además otros dos fenotipos: En la Tabla 6 se muestra que las cepas que la contienen -- (MX1176 y MX1178) son incapaces de inducir la síntesis de GS por crecimiento en glutamina. Estas cepas también presentan fenotipo Aut⁻ (Figura 3B) al cual me referiré más adelante.

A diferencia de lo que sucede en las cepas MX988 y PA340 complementadas con el plásmido pRSP21; la cepa MX1176 transformada -- con este mismo plásmido sí induce la síntesis de GS por crecimeno

to en glutamina (Tabla 7). Puede decirse que todos los efectos -- causados por la mutación glt:: Ω se revierten al complementarla con PRSP21.

Pasando al fenotipo Aut^- que confiere esta mutación, también en *S. typhimurium* se ha reportado que mutaciones estructurales en gltB confieren el fenotipo Aut^- (32). Para explicar este efecto -- ya se ha postulado que cepas que carecen de actividad de GOGAT se acumula glutamina, la cual en altas concentraciones intracelulares reprime el operón glnALG que resulta en fenotipo Aut^- . Esto también explicaría la incapacidad de estas mutantes para inducir la GS^+ por crecimiento en glutamina (Tabla 6). Desde luego habría que cuantificar las pozas internas de glutamina en estas mutantes para verificar la hipótesis.

Sin embargo existe un dato que no concuerda con esta explicación, y es el siguiente: ya se había discutido que la cepa MX1176 complementada con el plásmido pGOP3 que codifica para la subunidad pesada de GOGAT únicamente, complementa para el fenotipo Glt^+ y -- que presenta actividad de GOGAT muy similar a la silvestre (Tabla 7); pero el punto quizá más interesante, es que esta cepa es Aut^- . En este caso no se puede utilizar el argumento de que se -- acumula glutamina intracelular puesto que hay síntesis normal de -- la enzima. Por lo tanto, al menos en este caso, el fenotipo Aut^- se debe a algún otro problema. Esto podría implicar la existencia de un tercer gene que se encuentre hacia abajo de la subunidad ligera de GOGAT que forme parte de un circuito regulatorio que inter venga en la inducción de los sistemas Ntr. Entonces la inserción

del fragmento Ω en la subunidad pesada, sería polar sobre la transcripción de este tercer gene. Habría que postular que el promotor que debe existir entre la subunidad pesada y la ligera, no es suficientemente fuerte como para que se transcriban los niveles necesarios de este tercer gene para la inducción de los sistemas Ntr. - Esto sería un caso análogo al del operón glnALG, en el que los niveles de transcrito de glnG que se producen a partir del promotor de glnL no son suficientes para el fenotipo Aut^+ (17), sino que se requiere que la transcripción se inicie en el promotor fuerte de glnA para alcanzar altos niveles del producto de glnG. Hay varios datos que apoyan la existencia de este tercer gene: a) los plásmidos pRSP20 o pRSP21 (Figura 6) contienen un fragmento cromosomal-- que incluye los dos genes estructurales de GOGAT, y en ambos, existe al menos 1 md de DNA cromosomal hacia abajo del gene de la subunidad ligera, lo cual sería suficiente para un gene que codificara para una protefna de al menos 55,000 d. de PM. Estos plásmidos son los únicos que complementan a la cepa MX1176 para el fenotipo Aut^+ . b) Experimentos preliminares de hibridización usando RNA de la cepa silvestre transformada con el plásmido pRSP21, contra un probador de la subunidad pesada o de la ligera, muestran una banda correspondiente a un RNA de al menos 5 md de peso molecular, que es mucho mayor que lo que se requiere para un transcrito que incluya solamente ambas subunidades (alrededor de 4 md). c) Por último, se realizó un experimento de complementación con un plásmido denominado pGOP1 (29). Este plásmido es un derivado del pRSP20, al cual se le hizo una delección de un fragmento EcoRI (0.5 md), y

que sólo afecta a la subunidad ligera. En minicélulas este plásmido dirige la síntesis de la subunidad pesada, y un fragmento de la ligera (29). El resultado de la transformación de la cepa MX1176 con este plásmido, indica que es capaz de complementar para el fenotipo -- Aut⁺.

De aquí se desprende la conclusión de que no parece ser la subunidad ligera exclusivamente la que ejerce un papel regulatorio, -- puesto que este plásmido que no la contiene, complementa para el fenotipo Aut⁺. Aunque sabemos que hay síntesis de la subunidad ligera cromosomal de forma que no podemos descartar la posibilidad de que -- de alguna forma ésta intervenga.

Es interesante que este plásmido, pGDP1 (Sp⁺, Si⁻) no complementa a la cepa MX988 ni a la PA340 para el fenotipo Aut⁻. En el caso de la PA340, tampoco complementa para el fenotipo Git⁺, como se espera, ya que esta cepa no tiene forma de sintetizar la subunidad ligera. Ahora el hecho de que no complemente a la cepa MX988 para el fenotipo Aut⁺, es más extraño puesto que esta cepa no es auxótrofa de glutamato (ya que posee actividad de GDH). Esto indica que se requiere también de la subunidad ligera de GOGAT, en conjunto con el tercer gene para establecer el circuito regulatorio sobre los sistemas Ntr; o bien que la MX988 heredó también la mutación regulatoria tal que, aún en multicopia, no se permita la síntesis necesaria de este gene regulatorio.

Ahora bien, es interesante mencionar aquí, que recientemente se reportó que en B. subtilis (que carece del gene gdhA y por lo tanto de la enzima GDH) los genes de GOGAT se regulan transcripcionalmente por la fuente de nitrógeno, y que existen 3 transcritos, dos de ellos corresponden a los genes --

estructurales para cada una de las dos subunidades de GOGAT; el -- tercer transcrito parece definir una unidad separada (se transcribe en el sentido contrario a la transcripción del gene de la subunidad pesada). Mutaciones en esta tercera unidad transcripcional causan auxotrofia por glutamato (41).

Se tratará de construir inserciones del operón lac en el sitio único para la enzima Sali que tiene el plásmido pRSP20. Este sitio debe interrumpir el tercer gene (ver Figura 6). De esta manera, si se demuestra que un plásmido así contruido, no complementa para el fenotipo Aut^+ de las distintas cepas, probaría la existencia de este gene. Así mismo, se podría estudiar su expresión - determinando la actividad enzimática de β -galactosidasa.

Aunque en los resultados presentados en esta tesis, no hay variación de la actividad de GOGAT con respecto a cultivos en diferentes fuentes de nitrógeno, así como tampoco se ve una relación clara entre los niveles de síntesis de GS y de GOGAT, hay datos - que sugieren cierta relación. Un dato que indica que hay relación entre el sistema que regula la síntesis de GS, y GOGAT, es que algunas de las revertantes Aut^+ de la cepa MX988 (y de otras cepas - gltB⁻ de E.coli y K.aerogenes (4)) se localizan en glnI y son altas constitutivas para la síntesis de GS (1, 4). Entonces una manera de aliviar el fenotipo Aut^- que resulta de una inserción polar o una delección de la región glt, es produciendo mutaciones puntuales en glnI que no sean polares sobre glnG. Curiosamente el fenotipo Aut^- de las cepas MX988 y MX1176, no se suprimen por introducir el plásmido pACR3 que codifica para glnG; parece pues que es - preferible cambiar la estructura del producto de glnI (a una con--

formación que probablemente sea incapaz de reprimir o antiactivar los sistemas Ntr) que aumentar las concentraciones del producto de glnG.

Por otro lado, existen por lo menos dos condiciones probadas en las que la síntesis de GOGAT se reprime. Se ha visto que en cultivos de la cepa silvestre MX614, en glutamato como única fuente de nitrógeno, la actividad de GOGAT disminuye alrededor de 10 veces; aparentemente la regulación es a nivel de transcripción puesto que los niveles de mRNA específico de GOGAT disminuye notablemente por crecimiento en glutamato (datos no mostrados).

La actividad de GOGAT disminuye también alrededor de 10 veces cuando las células se cultivan en succinato como fuente de carbono. En este caso también la GS se encuentra muy reprimida aún cuando glutamina sea la única fuente de nitrógeno. Ya se había reportado con anterioridad, el hecho de que cultivos de K.aerogenes en una fuente de carbono limitante (como histidina) con amonio más glutamina, producen la mayor represión observada de la síntesis de GS - (1, 4).

Así pues, parece probable que haya un sistema de regulación de la síntesis de GOGAT, y más aún un mecanismo que comunique el sistema de GOGAT con el de GS, así como con el sistema Ntr.

El papel de glnL en la regulación de GS y de Ntr, no es claro (4, 14, 15, 16). Mutaciones puntuales en este gene, tienen un fenotipo muy diferente a deleciones del mismo, por otro lado se le ha asignado un papel bifuncional tanto para la regulación de GS como para la de los sistemas Ntr (16). Parece claro que los efectos

regulatorios de la proteína PII sobre la síntesis de GS, se llevan a cabo a través de glnL. En cepas con deleciones de glnL, la regulación de GS es casi normal en condiciones muy extremas de limitación o exceso de nitrógeno. Solamente en condiciones medias de limitación o exceso de nitrógeno se observa el efecto del producto de glnL (4). Pudiera ser precisamente glnL el mediador de la comunicación entre la síntesis de GOGAT, y la inducción de GS y los sistemas Ntr. Los datos que parecen apoyar esto son, por una parte, la existencia de mutaciones en glnL que suprimen el fenotipo Aut^- característico de mutantes afectadas en la síntesis de GOGAT. Por otro lado, la actividad de GOGAT de 2 alelos diferentes de glnL (uno es por inserción de Tn5, y el otro puntual que resulta en alta síntesis constitutiva de GS), muestra distintos efectos: la inserción de Tn5 en glnL no parece afectar la síntesis de GOGAT; sin embargo la mutación puntual, disminuye la actividad de GOGAT aproximadamente 7 veces (datos no mostrados).

Por lo pronto se puede proponer la existencia de un gene regulador, posiblemente positivo, que se requiere para la activación de la transcripción del operón compuesto por los genes estructurales de GOGAT y el tercer gene; este sería el gene que se encuentra mutado en la cepa PA340, y el que se transfirió a la cepa MX1170 por cotransducción con argG.

Mutaciones en el regulador resultan en el fenotipo Aut^- probablemente por que no se activaría la síntesis de este tercer gene. (Ver esquema).

Aparentemente se requiere tanto del tercer gene como el producto de glnG en cantidades relativamente elevadas para que las cepas presenten el fenotipo Ntr^+ . En el caso del producto codificado

por el tercer gene, al parecer se requiere en cantidades relativamente elevadas (Ej.: cuando se encuentra en plásmidos multicopia para revertir el fenotipo Aut^- de la mutación regulatoria - - (PA340/pRSP21, Tabla 7); sin embargo, estas cantidades no confieren la capacidad de inducir la síntesis de GS en glutamina.

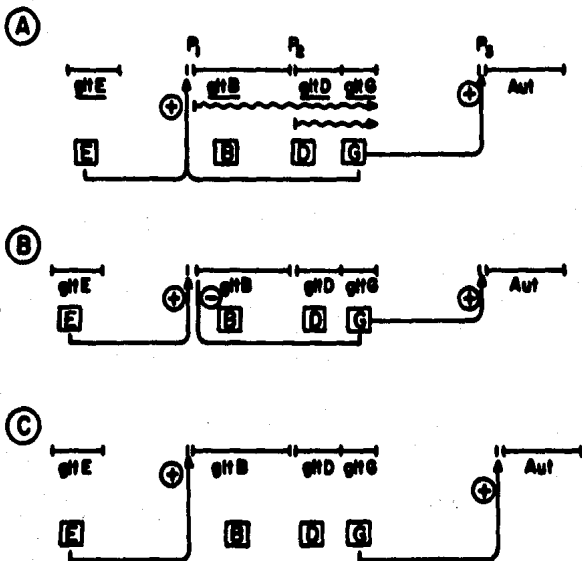
Según estos datos se requeriría entonces, tanto del gene regulador silvestre como del tercer gene para mediar la inducción de GS en glutamina, posiblemente a través de glnL.

De esta manera se puede explicar por qué la cepa PA340 complementada con pRSP21 es Aut^+ pero incapaz de inducir la GS en glutamina; en este caso la cepa PA340 tiene una deleción que abarca todo el operón de GOGAT, y una mutación regulatoria. Cuando se le suministra en multicopia el operón de GOGAT; se sintetiza suficiente cantidad del producto del tercer gene el cual puede activar los sistemas Ntr (siempre que haya también producto de glnG).

Sin embargo, la mutación en el regulador no le permite inducir la síntesis de GS en glutamina aún cuando haya síntesis del tercer gene (Tabla 7).

En la cepa con la mutación glt: Ω , el fenotipo Aut^- , se debe a la polaridad del fragmento Ω sobre la transcripción del tercer gene. Cuando se transforma con un plásmido que contiene este gene - (pRSP21), se restablece el fenotipo Aut^+ , y la capacidad de inducir la síntesis de GS en glutamina, puesto que la cepa no tiene ninguna mutación regulatoria adicional.

Posibles modelos de la regulación de la síntesis de GOGAT



P_1 promotor del gene *gntB*

P_2 promotor de la subunidad ligera

P_3 promotores regulados por el sistema Ntr

gntE gene regulador probablemente positivo

gntB gene para la subunidad pesada de GOGAT

gntD gene para la subunidad ligera de GOGAT

gntG gene hacia abajo de la subunidad ligera,
regulador de los sistemas Ntr y posiblemente
del operon de GOGAT.

MATERIAL Y METODOS

1. Cepas Bacterianas:

Las cepas utilizadas en este trabajo son derivadas de Escherichia coli K-12, y se encuentran descritas en la Tabla 1.

2. Condiciones de cultivo:

Para realizar los experimentos, los cultivos se hicieron en los siguientes medios:

Luria (42) que contiene 1% de peptona de caseína, 0.5% de extracto de levadura y 1% de cloruro de sodio. Para cepas auxótrofas de glutamina se le adiciona este aminoácido a una concentración final de 1 mg/ml esterilizado por filtración.

Medio Mínimo NN (27) que contiene fosfato monobásico de potasio 13.6 gr/lt., sulfato de potasio, 2.61 gr./lt., sulfato de magnesio heptahidratado 0.2 gr/lt., cloruro de calcio 0.01 gr/lt., - sulfato ferroso heptahidratado 0.0005 gr/lt. A este medio se le agrega glucosa 0.2% final como fuente de carbono; cloruro de amonio 15mM. (amonio en exceso) ó 0.5M (limitación de amonio) ó glutamina 1 mg/ml, o arginina 0.2% como fuentes de nitrógeno. - Todo esto se esteriliza independientemente por filtración. - Otros requerimientos como aminoácidos o vitaminas se añadieron también esterilizados por filtración a las concentraciones óptimas previamente determinadas (42).

Todos los cultivos se hicieron a 37°C excepto la cepa polA⁻ (ts) que se llevaron a cabo a 30°C.

Los antibióticos se adicionaron en las siguientes concentraciones: Kanamicina 30 $\mu\text{g/ml}$, estreptomycin 100 $\mu\text{g/ml}$, tetraciclina 10 $\mu\text{g/ml}$ y cloramfenicol 10 $\mu\text{g/ml}$.

Para cultivos en medio sólido, se utilizaron los mismos medios, pero se les agregó agar al 1.5%.

3. Obtención de lisados de P1 virA y Titulación.

Para los experimentos de mapeo por transducción generalizada se utilizó el fago P1 virA. Para la propagación del fago en la cepa donadora, esta se cultivó en medio luria hasta fase exponencial (40 unidades Klett). Se tomaron 0.5 ml del cultivo y se mezclaron con 0.1 ml de P1 diluido a 1×10^7 u.f.p/ml en NN estéril, y la mezcla se transfirió a tubos con 3 ml de Luria más 25mM de CaCl_2 con agar al 0.75%.

La mezcla con agar suave se vació en cajas de Petri con medio sólido Luria adicionado de 25mM de CaCl_2 , timina 25 $\mu\text{g/ml}$ y glucosa 0.2% (Medio LCTG). Las cajas se incubaron a 37°C durante aproximadamente 12 Hrs. Posteriormente se raspó el agar suave, se transfirió a tubos y se le agregó 3 ml Luria. Se añadió 1/20 de volumen de cloroformo, y se agitó vigorosamente en vortex. Posteriormente se centrifugó y el sobrenadante se recuperó y se le añadió nuevamente cloroformo. Se guardó a 4°C.

Los lisados se titularon sobre la cepa sensible AB1157 cultivada en medio rico, y recuperada en 0.01M de MgSO_4 y 0.005M de CaCl_2 . Se mezcló 0.1 ml de la suspensión celular y se mezcló con diferentes diluciones del fago P1. Después de 20 minutos de incubación se vaciaron sobre cajas de LCTG con ayuda de agar

suave LC.

4. Obtención de lisados λ Kan2 y obtención de inserciones al azar de Tn5 en la cepa MX615.

Se cultivo la cepa λ Kan2 en Luria a 30°C puesto que es termo-sensible y se le adicionó maltosa 0.2%. Cuando el cultivo alcanzó fase exponencial se transfirió a 42°C por 30' en presencia de CaCl_2 0.2M y se incubó por 2 Hrs. a 37°C hasta que se observó lisis. Posteriormente se agregó cloroformo y se centrifugó. El sobrenadante se guardó a 4°C con 1/100 volumen de CHCl_3 .

Este lisado se utilizó para infectar a la cepa MX615 que contiene una deleción de la región de integración de λ , a 30°C. Después de 30' de incubación con el fago se lavaron las células y se incubaron por 12 Hrs. en medio rico con 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de kanamicina para seleccionar la presencia de lisógenas.

Posteriormente se obtuvieron derivados termorresistentes de estas lisógenas, que se hubieran curado del fago λ , pero que conservaran las inserciones de Tn5 para lo cual se mantuvieron a 37°C o a 42°C en presencia de Kanamicina.

5. Transducciones con P1.

Una vez propagado y titulado el P1 en la cepa donadora, se cultivó la cepa receptora en medio Luria hasta 40 unidades - Klett, se centrifugó y se concentró 10 veces de peptona de caseína al 1%. Posteriormente se separó en dos tubos cada uno con 0.5 ml. de la suspensión de bacterias. Se añadió 0.5 ml. a cada tubo de una solución de CaCl_2 0.05M y MgSO_4 0.03M. Al

tubo de la transducción se le añadió 0.5 ml. de P1 propagado en la donadora adecuada diluido a 5×10^7 ufp/ml. Al control se le añadió 0.5 ml. de Luria. Después de 20 min de incubación a 37°C sin agitación, se centrifugó y las células se lavaron 2 veces con NN estéril. Las células se resuspendieron en 0.1 ml. de NN, y se plaquearon en cajas de medio selectivo.

6. Transformación por plásmidos híbridos.

Se crecieron 30 ml. de la cepa receptora en Luria hasta 30 unidades Klett. Las células se centrifugaron a 4°C, y se lavaron con 10 ml de NaCl 10mM. Posteriormente se resuspendieron en la mitad del volumen de cultivo de CaCl_2 50mM y se mantuvieron en hielo por 40 min. Posteriormente se centrifugaron y se resuspendieron en 1/15 de vol. de CaCl_2 50 mM.

Se tomaron 0.2 ml. de estas células sensibilizadas con calcio y se añadió alrededor de 100ng de plásmido puro resuspendido en 0.1 ml. de CaCl_2 50mM. Se incubaron en hielo por 60 min. Después se pasaron a un baño a 42°C durante 90 segundos. Se les agregó 3 ml. de Luria y se incubaron a 37°C sin agitación. Posteriormente se tomó 0.1 ml. de la suspensión de células transformadas y se plaquéó en cajas de medio selectivo.

7. Purificación de DNA de Plásmido.

Se utilizó el método reportado por Betlach (43). En este método a gran escala, se cultivó 1 lt. de la cepa adecuada, y se amplifica el plásmido por incubación con cloranfenicol. Las células se colectan y lisan con lisozima y Triton X-100. Se centrifugan y el sobrenadante se extrae con fenol-cloroformo para el

minar proteínas. La solución de DNA se concentra por precipitación con etanol. Posteriormente se pasa por una columna de - - Biogel A-50. El primer pico de absorvencia a 260nm corresponde a DNA de plásmido el cual se concentra y se pasa por un gradiente de CsCl/yoduro de propidio para eliminar fragmentos de DNA cromosomal. El DNA se precipita y finalmente se resuspende en agua.

8. Purificación de DNA de plásmido en pequeña escala.

Es un método de semipurificación rápida en pequeñas cantidades. Se cultivan 5 ml. de la cepa adecuada, sin amplificar el plásmido, y el método es muy similar al anterior, excepto que se omiten los pasos por la columna de Biogel A-50 y el gradiente de - cloruro de cesio. El DNA que se obtiene, es apropiado para análisis por restricción y para transformación.

9. Purificación de DNA cromosomal.

Se utilizó un método para purificar DNA cromosomal en pequeña - escala, utilizando cultivos en 5 ml. de medio Luria. Se lisan las células con una solución de pronasa 5 mg/ml., y SDS al 0.1%. Se extrae varias veces con fenol-cloroformo. El DNA se concentra por precipitación con etanol, y se le agrega RNAsa. Posteriormente se extrae con fenol-cloroformo, y se precipita con -- etanol. Posteriormente se resuspende en agua. El DNA obtenido de esta manera es adecuado para digerirlo con enzimas de restricción.

10. Digestión con enzimas de restricción.

Las condiciones utilizadas para las enzimas son las reportadas

por Bolívar et al (44). Las reacciones se incubaron a 37°C por el tiempo necesario según la actividad de la enzima. Las reacciones se detuvieron calentando a 65°C por 5 min.

Se utilizó DNA ligasa de T4 que puede unir tanto extremos cohesivos como rasurados de moléculas de DNA.

11. Obtención del plásmido que contiene una mutación por inserción dentro del gene que codifica para la subunidad pesada de GOGAT.

Se utilizó el plásmido pMP45 Ω (Figura 2) que contiene el fragmento Ω que codifica para resistencia a espectinomicina y a - - estreptomycin. Este fragmento está flanqueado por múltiples - sitios de restricción. Se digirió con la enzima de restricción BamHI, y se purificó el fragmento de restricción Ω de un gel de agarosa de bajo punto de fusión.

Por otro lado, se utilizó el plásmido pGOP3 que contiene el gene para la subunidad pesada de GOGAT (Figura 2). Este plásmido se digirió con la enzima BglII que genera los mismos extremos - que la enzima BamHI. Posteriormente se mezcló este plásmido digerido con el fragmento Ω , y se ligó con ligasa de T4; se transformó a la cepa RRI seleccionando para la resistencia que confiere el fragmento Ω , y para la que codifica el vehículo (Tetraciclina).

Se verificó por análisis de restricción con la enzima HindIII - que el fragmento Ω se encontraba insertado en el antiguo sitio de BglII.

12. Integración al cromosoma de la mutación por inserción del fragmento Ω en el gene estructural de GOGAT.

Se transformó a la cepa de E.coli que contienen una mutación en

el gene polA que resulta en una DNA polimerasa 1 termosensible, con el plásmido pGOP3:: Ω a 30°C.

Posteriormente se hizo una incubación a 42°C durante 5 Hrs. de las transformantes en presencia de estreptomycin y espectinomycin. Posteriormente se lavaron las células y se plaquearon diluciones del cultivo en cajas de medio Luria con estreptomycin y espectinomycin.

Después de buscaron colonias independientes que fueran sensibles a tetraciclina (Tc^S) y resistentes a espectinomycin y estreptomycin ($Sp^R Sm^R$).

13. Hibridización DNA-DNA por la técnica de Southern (40).

Las muestras de DNA cromosomal digeridas con HindIII, se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% en buffer -- acetatos que contiene Tris base .04M, ácido acético 0.02M y -- EDTA 0.01M a pH8. Se corrió a 50 volts durante aproximadamente 4 Hrs.

El gel se tiñó con bromuro de etidio, posteriormente se lavó -- con HCl 0.25N por 30 min., después con NaOH 0.5M y NaCl 1M. Para neutralizar se lavó durante 40 min. con una solución de NaCl 1.5M y Tris base 0.5M pH7.4. La transferencia de DNA al filtro de nitrocelulosa se acomodó el gel sobre un puente de papel -- Whatman 3MM, humedecido en solución SSC 6X. Sobre el gel se colocó el filtro de nitrocelulosa humedecido en agua y encima -- otro pedazo de papel Whatman 3MM del tamaño del filtro. Sobre esto se colocó medio rollo de toallas kleenex absorbentes y un peso enzima de alrededor de 0.5 Kg. Se dejó transferir durante

12 Hrs. Después de este lapso de tiempo, el filtro se secó en un horno con vacío a 80°C durante 3 Hrs. para fijar el DNA al filtro.

Para la prehibridización se colocó el filtro en bolsas selladas con 10 ml. de solución de hibridización que contiene 1 ml. de solución Denhardt's 50x; 1 ml. de buffer de fosfato de sodio di bésico 1M pH 6.7, 2.5 ml. de SSC 20x 3.5 ml. de agua y 2 ml. de DNA de tимо de terrera a 100 µg/ml y hervido por 2 min para de naturalizarlo. Se incubó el filtro con esta mezcla a 65°C por 4 Hrs.

Posteriormente se descartó esta solución, y se inyectó a la bolsa el DNA probador marcado previamente por el método de "nick - translation" 100 µg del DNA probador más 200 µg de DNA de tимо frfo en la solución de hibridización. Se incubó a 65°C por - - 12 Hrs.

Posteriormente se tiró la solución de la bolsa, y el filtro se lavó a temperatura ambiente con una solución de SSC 2x y SDS al 0.5% por 5 min. Posteriormente se hizo otro lavado de 15' con una solución de SSC 2x y SDS 0.1%. Finalmente se lavó por - - 2 Hrs. a 42°C con una solución de SSC 0.1x y SDS 0.5%.

Por último los filtros se secaron a temperatura ambiente entre 2 hojas de papel Whatman y se sometieron a autoradiografía a -- -70°C y se revelaron después de 24-72 Hrs.

Para cuantificar la actividad enzimática de las enzimas GS, GDH y GOGAT, se utilizó siempre el mismo cultivo; se utilizaron - - 20 ml del cultivo adecuado, y cuando llegó a 90 - 100 unidades Klett, el cultivo se separó en 2 alfcuotas de 10 ml. cada una.

una de ellas se utilizó para determinar GS y la otra para GDH y GOGAT.

- A) Cuantificación de actividad enzimática de GS: se utilizó el ensayo de γ -glutamyl transferasa que se basa en la transferencia del grupo glutamil de la glutamina a la hidroxilamina para formar γ -glutamyl hidroxamato que con Fe^{3+} genera un compuesto colorido que se mide colorimétricamente a una longitud de onda de 540nm.

La actividad se determinó utilizando el método reportado por -- Bender y colaboradores (45) con las modificaciones por Covarrubias et al (27).

- B) Determinación de la actividad enzimática de GDH y GOGAT: para medir estas enzimas se utilizó el método reportado por Meers y colaboradores (3).
- C) Determinación de proteína: la cuantificación de la proteína para calcular actividad específica de las enzimas, se realizaron utilizando el método descrito por Lowry et al (46)

Bibliografia

- 1.- Tyler, B., (1978) Regulation of the assimilation of nitrogen compounds., Ann. Rev. Biochem., 47: 1127-1162
- 2.- Senior, P.J., (1975) Regulation of nitrogen metabolism in Escherichia coli and Klebsiella aerogenes: Studies with the continuous-culture technique. J. Bacteriol 123 : 407-148
- 3.- Meers, J.L., Tempest, D.W. (1970). Glutamine (amide): 2-oxoglutarate amino transferase oxido-reductase (NADP)', an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. J. of Gen Microbiol 64: 187-194
- 4.- Magasanik, B., (1982) Genetic Control of nitrogen assimilation in bacteria. Ann. Rev. Genet. 16 : 135-168
- 5.- Stadman, E.R. (1973) en: the Enzymes of Glutamine Metabolism Prusiner, S. y Stadman, E.R. (eds) Academic Press N.Y. pp 9-8
- 6.- Ginsburg, A., Stadman, E.R. (1973) en: The Enzymes of Glutamine Metabolism. Prusiner, S. y Stadman E.R. (eds) Academic Pres H.Y. pp 9-44
- 7.- Kustu, S.G., McFarland H., Hui, S.P. Esmon, B., Ferro-luzzi Ames, G. (1979) Nitrogen Control in Salmonella typhimurium: Co-regulation of Synthesis of glutamine Synthetase and aminoacid transport systems. J. Bact 138: 218-234
- 8.- Servin-González, L., Bastarrachea, F. (1984). Nitrogen regulation of synthesis of the high affinity methylammonium transport system of Escherichia coli J. Gen. Microbiol. 130 : 3071-3077
- 9.- Garcia, E., Bancroft, S., Rhee S.G., Kustu S., (1977) the product of a newly identified gene, glnF is required for synthesis of glutamine synthetase in Salmonella PNAS 74 :1662-1666
- 10.- Gaillardin, C.M., Magasanik, B., (1978). Involvement of the product of the glnF gene in autogenous regulation of glutamine synthetase formation in Klebsiella aerogenes J. Bact. 133: 1329-38

- 11.- Pahel, G., Zelenetz A.D. and Tyler, B., (1978). gltD gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in E. coli J. Bact. 133: 139-148
- 12.- Kustu, S., Burton, D., Garcia, E., McCarter, L., McFarland, N. (1979) Nitrogen Control in Salmonella: regulation by the glnR and glnF gene products PNAS 76: 4576-4580
- 13.- Pahel, G., Tyler, B., (1979) A new glnA linked regulatory gene for glutamine synthetase in Escherichia coli PNAS 76: 4544
- 14.- McFarland, N., McCarter, L., Artz, S., Kustu, S., (1981) Nitrogen regulatory locus "glnR" of enteric bacteria is composed of cistrons ntxB and ntxC identification of their products PNAS 78: 2135-2159
- 15.- Chen, Y., M., Backman, K., Magasanik, B., (1982) Characterization of a gene glnL, whose product is involved in the regulation of nitrogen utilization in Escherichia coli. J. Bact. 150: 214-220
- 16.- Mac Neil, T., Roberts, G.P., MacNeil, D., Tyler, B. (1982) The products of glnL and glnG are bifunctional regulatory proteins Mol. Gen. Genet. 188: 325-333
- 17.- Pahel, G., Rothstein, D., Magasanik, B. (1982). Complex glnA-glnL-glnG operon of Escherichia coli J. Bacteriol 150:202-213
- 18.- Reitzer L. J., and Magasanik B (1983). Isolation of the nitrogen assimilatory regulator NR₁, the product of the glnG gene of Escherichia coli PNAS 80: 5554-5558
- 19.- Ueno-Nishio, S., Mango, S., Reitzer L.J., and Magasanik, B. (1984) Identification and regulation of the glnL operator-promoter of the complex glnALG operon of Escherichia coli J. Bact. 160: 379-384.
- 20.- Veronese, F.M., Boccu, E., Conienti, L., (1975) Glutamate dehydrogenase from Escherichia coli : Induction, purification and properties of the enzyme Biochim. Biophys. Acta 377: 217-228
- 21.- Miller, R.E., (1975) Glutamate synthase from Escherichia coli: An iron-sulfide Flavoprotein in "The Enzymes of Glutamine Metabolism" Prusiner,

- S. and Stadman, E.R. eds pp 183-205 Academic Press N.Y.
- 22.- Mäntsälä, P., and Zalkin, H. (1976) Active subunits of Escherichia coli glutamate synthase J. Bacteriol 126: 539-541
 - 23.- Berberich, M.A. (1972) A glutamate dependent phenotype in E. coli K-12 the result of two mutations Biochem Biophys Res Com 47: 1498-1503
 - 24.- Brenchley, J.E., Prival, M.J., Magasanik, B. (1973). Regulation of the synthesis of enzymes responsible for glutamate formation in Klebsiella aerogenes J. Biol. chem. 248:6122-6128
 - 25.- Pahel, H., Zelentz A.D., Tyler, B. (1978) gluB gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in Escherichia coli J. Bacteriol 133: 139-146
 - 26.- Reiner A.M. (1969) Isolation and mapping of polynucleotide phosphorylase Mutants of Escherichia coli J. Bact. 97: 1431-1436
 - 27.- Covarrubias, A.A., Sánchez-Pescador, R., Osorio, A., Bolívar, F., Bastarrachea, F. (1980) Col I Hybrid plasmids Containing Escherichia coli genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine. Plasmid 3: 150-164
 - 28.- Lozoya, E., Sánchez-Pescador, R., Covarrubias, A., Vichido, I., Bolívar, F. (1980) Tight linkage of genes that encode the two glutamate subunits of Escherichia coli K-12 J. Bacteriol 144: 616-621
 - 29.- Garcíarrubio, A., Lozoya, E., Covarrubias, A., Bolívar, F. (1983). Structural organization of the genes that encode the two glutamate synthase subunits of Escherichia coli Gene 26: 165-170
 - 30.- Deding, S.M., Patil, L.G., Brenchley, J. E. (1980) Salmonella Typhimurium mutants with altered glutamate dehydrogenase and glutamate synthase activities. J. Bacteriol 141: 190-198
 - 31.- Fuchs, R.L., Madonna, M.J., Brenchley, J.E., (1982) Identification of the structural genes for glutamate synthase and genetic characterization of this region of the Salmonella typhimurium chromosome J.Bact. 149: 906-915

- 32.- Madonna, M.J., Fuchs, R.L., Brenckley J.E. (1985) Fine structure analysis of Salmonella Typhimurum glutamate synthase genes J. Bacteriol 161: 353-360
- 33.- Gaillardin, M.C., Magasanik, B. (1978) Involvement of the product of the glnF gene in the autogenous regulation of glutamine synthetase formation in Klebsiella aerogenes J. Bacteriol 133 1329-1338
- 34.- Boland, M.J., Benny, A.G. (1977)
Eur. J. Biochem 79: 355-362
- 35.- Brenchley, J. (1973) Effect of methionine sulfoximine and methionine sulfone on glutamate synthesis in klebsiella aerogenes J. Bact. 114:666-673
- 36.- Prentki, P. and Krisch, H.M. (1984). In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. Gene 29: 303-313
- 37.- Greener, A. and Hill, C.W. (1980) Identification of a Novel genetic element in Escherichia coli K-12 J. Bacteriol 144:312-321
- 38.- Grindley, N.D.F. and Kelley, W.S. (1976) Effects of different alleles of the E.coli K-12 polA gene on the replication of non-transferring plasmids Mol.Gen.Genet 143:311-318
- 39.- Osorio, A.V., Servin González, L., Rocha, M., Covarrubias, A.A. and Bastarrachea, F., (1984) cis-dominant, glutamine synthetase constitutive mutations of E.coli independent of activation by de glnG and glnF product Mol Gen Genet 194: 114-123
- 40.- Southern, E.M., (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments by gel electrophoresis J. Mol. Biol. 98: 503-517
- 41.- Bohannon D.E., Rosenkrantz, M.S., Sonenshein, A.L. (1985) Regulation of Bacillus subtilis glutamate synthase genes by the nitrogen source J. Bacteriol 163: 957-964
- 42.- Miller, J.M. (1972) Experiments in Molecular Genetics 2a. edición Cold Spring Harbor Laboratoy N.Y.

- 43.- Betlach, M.C., Hershfield, V., Chow, L., Brown, W., Goodman, H.M. and Boyer, H.W. (1976). Fed Proc. 35: 2037-2043
- 44.- Bolivar, F., Rodriguez R.L., Betlach, M.C. and Boyer, H.W. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles: 1: Ampicilline-resistant derivatives of the plasmid pMB9 Gene 2: 75-93
- 45.- Bender, R.A., Janssen, K.A., Resnick, A.D., Blumberg, M., Foor, F. y Magasanik B. (1977) Biochemical parameters of glutamine synthetase from Klebsiella aerogenes J. Bacteriol 129: 1001-1009
- 46.- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J. Farr, A.L. Raudall, R.J. (1951) Protein measurements with folin phenol reagent J. Biol Chem 193: 265-275