

03069
1ej. 2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de
Posgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades



Caracterización de mutaciones afectadas en la
asimilación del ión amonio en Escherichia coli K12

T E S I S

Que para obtener el Grado de
Maestro en Investigación Biomédica Básica
P r e s e n t a

LUIS SERVIN GONZALEZ

Instituto de Investigaciones Biomédicas

1984

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 fue realizado en el laboratorio del Dr. Fernando Bastarrachea, del Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología de la UNAM.

RESUMEN.

En este trabajo se describe la caracterización de - mutaciones afectadas en la asimilación de amonio en Escherichia coli.

Tres de estas mutaciones afectan al gene estructural de la glutamina sintetasa, el gene glnA; dos de las mutaciones consisten en deleciones, y la otra una inserción. Las tres mutaciones fueron analizadas mediante un mapeo físico por hibridización tipo Southern con un plásmido híbrido que contiene clonada a la región del gene - glnA. Las dos cepas con deleciones fueron también caracterizadas mediante pruebas de complementación con diferentes plásmidos híbridos.

Se caracterizaron también otras cuatro cepas con mutaciones que ocasionan auxotrofia por glutamina. Las mutaciones de estas cepas fueron mapeadas y se localizaron en el gene glnD, involucrado en la adenilación de la glutamina sintetasa.

Asimismo se presenta la caracterización del sistema de transporte de amonio, y de su regulación por la calidad de la fuente de nitrógeno, mediante el mismo sistema genético que regula la expresión de la glutamina sintetasa y los sistemas Ntr.

I N T R O D U C C I O N .

La gran mayoría de los microorganismos poseen la capacidad de sintetizar los compuestos orgánicos que requieren para vivir a partir de moléculas inorgánicas simples. Dicha capacidad varía entre diferentes especies de microorganismos, siendo algunas más dependientes que otras de moléculas orgánicas para crecer. En el caso de los microorganismos autótrofos, éstos no requieren de ningún compuesto orgánico para crecer, ya que tienen la capacidad de incorporar átomos de carbono a moléculas orgánicas mediante el proceso de fotosíntesis, y además incorporan átomos de nitrógeno a las moléculas orgánicas a partir de iones inorgánicos, como el NH_4^+ , o directamente mediante la fijación biológica del nitrógeno atmosférico. Los microorganismos heterótrofos requieren de una fuente de átomos de carbono ya incorporados en una molécula orgánica, como por ejemplo un azúcar, pero la mayoría conserva la capacidad de utilizar fuentes inorgánicas de átomos de nitrógeno. En el caso de las enterobacterias, y particularmente en Escherichia coli, la fuente preferida de átomos de nitrógeno es el ión amonio (1, 2), el cual es transportado al interior de las células y posteriormente asimilado incorporándolo a moléculas orgánicas, particularmente a glutamato y glutamina.

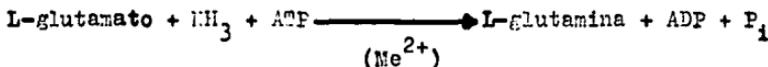
Las enzimas capaces de llevar a cabo esta asimilación del amonio a glutamato y glutamina son la deshidrogenasa glutámica (L-glutamato:NADP⁺ oxidoreductasa, ECl.4.1.4.) o GDH, y la glutamina sintetasa (L-glutamato:amonio

(2)

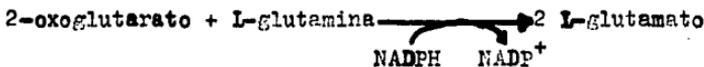
ligasa EC6.3.1.2.) o GS. La GDE asimila el amonio incorpo-
rándolo a una molécula de glutamato a partir de una molé-
cula de 2-oxoglutarato, con la intervención de una molé-
cula de NADPH:



La GS asimila al amonio incorporándolo a una molécula de
glutamina, utilizando una molécula de ATP, y requiriendo_
la presencia de un catión metálico divalente:



Existe además otra enzima capaz de transaminar al 2-oxo--
glutarato con la glutamina para formar dos moléculas de -
glutamato. Dicha enzima es la glutamato sintasa (L-gluta-
mato:NADP⁺ oxidorreductasa, EC1.4.1.3.) o GOGAT, la cual
también depende de NADPH:



La manera en que estas tres enzimas se encuentran in-
terrelacionadas se presenta en la figura #1, en donde se
puede observar como estas enzimas serán responsables de -
los niveles intracelulares de 2-oxoglutarato, glutamato y
glutamina.

El glutamato y la glutamina desempeñan un papel sum-
amente importante en el metabolismo del nitrógeno, siendo_
especialmente relevante el papel de la glutamina, como se
ilustra en la figura #2; en dicha figura se muestra como_

(3)

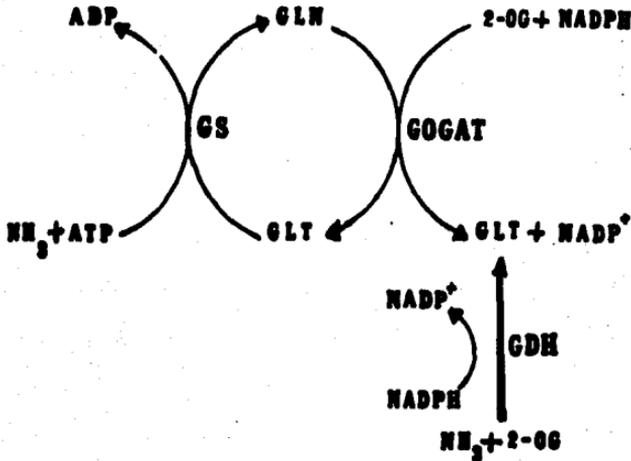


Figura #1.- Interrelación de las enzimas GS, GDH y GOGAT dentro de la célula.

2-OG = 2-oxoglutarato.

GLT = glutamato.

GLN = glutamina.

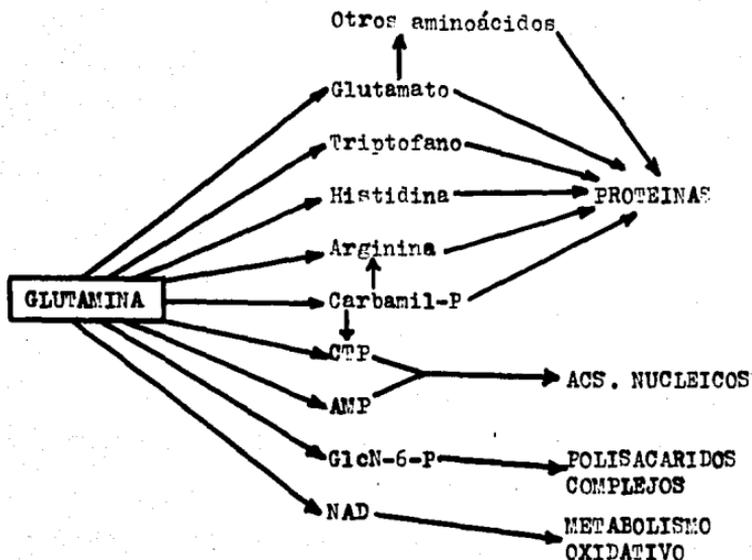


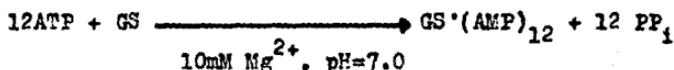
Figura #2.- El papel de la glutamina en el metabolismo de compuestos nitrogenados.

el grupo amido de este aminoácido se utiliza para la síntesis de varios otros aminoácidos, como triptofano e histidina, así como para la síntesis de purinas y pirimidinas, glucosamina-6-P, carbamil-P, NADP, etc. Además del grupo amido, la glutamina puede transferir el grupo α -amino a varios α -cetoácidos para producir los aminoácidos correspondientes. Además la glutamina, al dar lugar a glutamato por medio de la GOGAT es una importante donadora de los grupos α -amino de varios aminoácidos sintetizados por medio de transaminaciones entre glutamato y α -cetoácidos (3).

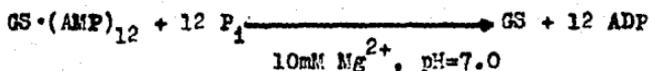
Debido a la importancia de la glutamina para el metabolismo de nitrógeno en la célula, y debido a que la GS es la única enzima capaz de sintetizar glutamina, ésta enzima está sujeta a un control muy riguroso, tanto a nivel de actividad enzimática como a nivel de síntesis a partir de su gene estructural.

La GS es una enzima de 600,000 daltones de peso molecular, compuesta de doce subunidades idénticas, cada una con un peso molecular de 50,000 daltones, aunque existen ligeras diferencias entre enzimas de diferentes especies de microorganismos (4). Un primer mecanismo de control sobre la actividad enzimática del dodecámero de GS es el que consiste en la inhibición acumulativa por retroalimentación de los productos derivados de glutamina; en este caso, cada uno de los metabolitos es capaz de inhibir solo parcialmente la actividad de la enzima, mientras que juntos inhiben la actividad casi completamente (3, 4, 5). Otro control que se ejerce sobre la actividad de GS está

dado por la disponibilidad de varios cationes divalentes; por ejemplo, la enzima es inactivada por la remoción de Mn^{2+} o Mg^{2+} , lo que provoca un cambio conformacional de la estructura proteínica conocido como "relajación" de la GS, que resulta en la exposición de residuos de triptofano y tirosina, y en un decremento del coeficiente de sedimentación. Al agregar nuevamente los cationes divalentes, la enzima se reactiva, y se eliminan los cambios conformacionales producidos durante la relajación. Aparentemente, cada una de las doce subunidades del dodecámero posee dos sitios de interacción con cationes metálicos (4). El tercer control está ejercido sobre la actividad enzimática de la GS mediante un complejo sistema que involucra la adenilación y desadenilación de cada una de las subunidades de la enzima (4, 5, 6). Dicho sistema responde a la disponibilidad de la fuente de nitrógeno. En la reacción de adenilación cada subunidad de la enzima no adenilada adquiere un grupo AMP unido a un residuo de tirosina específico:



La reacción de desadenilación ocurre por un rompimiento del enlace adenil-O-tirosil, sintetizándose ADP:



Ambas reacciones son llevadas a cabo por la misma enzima, llamada adeniltransferasa o ATasa. Para prevenir que las reacciones de adenilación y desadenilación se acoplen in vivo de manera inútil, existe un control sobre

la ATasa, el cual es ejercido por una pequeña proteína reguladora, conocida como proteína P_{II} . Esta proteína puede existir en dos formas interconvertibles: P_{IIA} y P_{IID} ; la forma P_{IIA} estimula a la ATasa para que lleve a cabo la adenilación de las subunidades no adeniladas de la GS, y la forma P_{IID} estimula a la ATasa para que desadenile a las subunidades adeniladas de la GS. Esta interconversión entre las formas P_{IIA} y P_{IID} es llevada a cabo por la enzima uridiltransferasa o UTasa, la cual une covalentemente un grupo UMP a la forma P_{IIA} para dar la forma P_{IID} . La forma P_{IIA} puede ser regenerada a partir de P_{IID} retirando el grupo UMP, lo cual aparentemente también es llevado a cabo por la UTasa.

Las reacciones de uridilación y desuridilación de la proteína P_{II} por la UTasa son estimuladas e inhibidas por diferentes metabolitos; la reacción $P_{IIA} \xrightarrow{P} P_{IID}$ es estimulada por 2-oxoglutarato y ATP, e inhibida por glutamina y fosfato inorgánico. La reacción $P_{IID} \xrightarrow{P} P_{IIA}$ requiere de la presencia de Mn^{2+} , y es fuertemente inhibida por UMP. La ATasa, además de responder a las formas P_{IID} y P_{IIA} de la proteína P_{II} , también responde a los niveles de ATP, 2-oxoglutarato y glutamina; altas concentraciones de glutamina y bajas concentraciones de 2-oxoglutarato estimulan la reacción de adenilación, mientras que bajas concentraciones de glutamina y altas concentraciones de 2-oxoglutarato y ATP estimulan la reacción de desadenilación. De esta manera ciertos metabolitos juegan un papel determinante sobre el estado de adenilación de la GS, tanto controlando la interconversión $P_{IID} \rightleftharpoons P_{IIA}$, como es-

estimulando o inhibiendo directamente a la ATasa para que - adenile o desadenile a las subunidades de la enzima.

Además de estos mecanismos para la regulación de la actividad enzimática de la GS, existe un complejo sistema genético que se encarga de la regulación de la síntesis de la GS, en el cual se encuentran involucrados varios genes reguladores además del gene estructural.

Dependiendo de las diferentes condiciones en que se pueden encontrar creciendo las células, éstas requerirán de niveles altos o bajos de GS. Se ha observado que en -- condiciones en que las células se encuentran limitadas de nitrógeno, los niveles de la enzima se elevan, y además - el grado de adenilación que presenta es muy bajo, lo que significa que la mayor parte de la enzima es biosintéticamente activa. Por el contrario, cuando las células se encuentran en condiciones de exceso de nitrógeno en el medio, los niveles de GS disminuyen, y la enzima presenta - un alto grado de adenilación, es decir su actividad biosintética se encuentra baja. Existen varios otros sistemas capaces de responder a condiciones limitantes de nitrógeno además de la GS; estos otros sistemas sujetos a - regulación por nitrógeno se encargan de la utilización de fuentes de nitrógeno tales como aminoácidos que puedan -- proveer a la célula de moléculas de glutamato o de amonio intracelularmente. La síntesis de los sistemas de transporte específicos de estos aminoácidos se regula de igual forma que la GS, y aparentemente constituyen un paso limitante en la utilización de estas fuentes de nitrógeno -- (7). Es interesante mencionar que además de los sistemas

de transporte de aminoácidos como arginina, prolina, histidina, lisina, ornitina, etc., el mismo sistema de transporte de glutamina está sujeto a regulación por nitrógeno (8, 9). Cuando se utiliza glutamina como fuente de nitrógeno, la GS se induce, lo que indica que es una condición de limitación de nitrógeno. Esto pudiera deberse a que la glutamina no es transportada eficientemente al interior de la célula, y por lo tanto no logra acumularse y ocasionar la represión de GS. El amonio, por otra parte, posee un sistema de transporte eficiente (10). Esto explicaría porqué cuando la fuente de nitrógeno es glutamina los niveles de GS son altos, mientras que cuando la fuente de nitrógeno es amonio la enzima se reprime; es decir en presencia del sustrato de la enzima hay represión y en presencia del producto hay inducción. Desde luego para comprobar ésto sería necesario medir las pozas intracelulares de glutamina en ambas condiciones.

A todos los sistemas que están regulados por la fuente de nitrógeno se les conoce como sistemas "Reg" (1), y más recientemente como sistemas "Ntr"(2). La regulación similar de la síntesis de la GS y de la expresión de los sistemas Ntr encargados de la utilización de fuentes alternas de nitrógeno fue interpretada originalmente como una evidencia de que la misma GS estaba encargada de regular la expresión de los sistemas Ntr, así como su propia expresión. Esta hipótesis proponía que la GS se autorregulaba y además servía como un regulador del metabolismo de nitrógeno en general. La hipótesis suponía que la GS adenilada funcionaba como un represor y la GS no adenilada como un activador, y se apoyaba en ciertas mutaciones ais

ladas en el gene estructural para la GS, el gene glnA -- (11, 12). Las mutaciones en el gene glnA pueden ser Ntr^- o $NtrC$, pero no Ntr^+ . Las mutantes Ntr^- son las que carecen de GS, y las $NtrC$ las que poseen niveles de GS constitutivos, pero esta GS es enzimáticamente inactiva. El hecho de que estas mutaciones se localizaran en el gene estructural se veía apoyado por experimentos de mapeo mediante cruza de tres puntos, que localizaban a las mutaciones $GlnC$ $NtrC$ entre mutaciones Gln^- Ntr^- . Otra evidencia importante para la hipótesis de regulación autógena era el hecho de que una mutante que poseía una proteína P_{II} alterada que siempre se encontraba en la forma P_{IIA} -- (mutación glnB3), y por lo tanto una GS siempre adenilada presentaba niveles muy bajos de GS (fenotipo Gln^-) y además era Ntr^- (13).

Sin embargo, desde que se propuso la teoría de la GS como reguladora de la asimilación y metabolismo de nitrógeno surgieron evidencias que parecían contradecirla. Una de estas evidencias era que ciertas cepas mutantes carecían de adeniltransferasa, y sin embargo poseían una regulación normal de los niveles de GS, aunque la enzima no se encontrara adenilada (14). Asimismo, existían evidencias de que otros factores aparte de la GS se encontraban involucrados en la regulación de la expresión de glnA y de los sistemas Ntr , como fue el descubrimiento de un gene, llamado glnF, que no está involucrado en el mecanismo de adenilación de la GS y que sin embargo es necesario para que el gene glnA se exprese (15). Posteriormente, se aislaron mutaciones fuertemente ligadas

al gene glnA, y que presentaban el fenotipo Ntr^- , así como una GS no regulada y no inducible, y que se encontraba en otro cistrón diferente a glnA (16, 17). La hipótesis de regulación autógena fue descartada cuando se pudieron aislar cepas con fusiones de glnA con lacZ, el gene estructural para la β -galactosidasa, cuya expresión se encuentra ahora bajo el promotor del gene glnA. En este caso, los niveles de β -galactosidasa (o sea la expresión de glnA) responden normalmente a la calidad de la fuente de nitrógeno, a pesar de no poseer GS (18).

Actualmente sabemos que el sistema genético que se encarga de regular la expresión del gene glnA así como de los sistemas Ntr es mucho más complejo de lo que proponía la teoría de la regulación autógena, y se conocen varios genes involucrados. A continuación se da una breve descripción de cada uno de los genes reguladores y del gene estructural.

glnF:

El gene glnF se localiza en el minuto 68 del mapa de ligamiento de E. coli, y se encuentra ligado a los genes argG y gltB (19). Las mutaciones en el gene glnF provocan auxotrofia por glutamina, puesto que las células son incapaces de sintetizar GS; además presentan el fenotipo Ntr^- . El producto del gene glnF es necesario por lo tanto para la expresión del gene glnA así como para la expresión de los sistemas Ntr . El gene glnF se expresa de manera constitutiva, como se ha demostrado por medio de fusiones del gene lacZ con el gene glnF (Castaño, I. y Bastarrachea, - F. no publicado).

glnB:

El gene glnB codifica para la proteína reguladora P_{II} , puesto que se ha demostrado que mutaciones en este gene producen una proteína P_{II} alterada (13), o bien carecen de proteína P_{II} , como es el caso de mutaciones por inserción del transposón Tn5 (20). Se localiza alrededor del minuto 55 del mapa de ligamiento de E. coli. Las cepas mutantes que producen una proteína P_{II} alterada, como es el caso de la mutación glnB3, presentan el fenotipo $Gln^- Ntr^-$, puesto que ésta no puede ser reconocida por la uridiltransferasa para dar la forma P_{IID} , de manera que la GS se encuentra exclusivamente en la forma adenilada, y además los niveles de GS son muy bajos. Las mutantes que carecen de la proteína P_{II} son constitutivas para la síntesis de GS (GlnC) y Ntr^+ ; la GS se adenila y desadenila a niveles normales en estas cepas, aunque en ausencia de P_{II} ambas reacciones ocurren más lentamente (20).

El hecho de que mutantes que tengan una proteína P_{II} alterada tengan niveles anormalmente bajos de GS y sean Gln^- , aunado al hecho de que mutantes sin proteína P_{II} presenten el fenotipo GlnC han implicado directamente a la proteína P_{II} en la regulación de la expresión de glnA, independientemente del efecto que las mutaciones ejercen sobre el sistema de adenilación de la GS.

glnD:

El gene glnD se localiza en el minuto 4 del cromosoma de E. coli. El fenotipo de mutantes en el gene glnD es similar al fenotipo de las mutaciones en glnB que poseen una proteína P_{II} incapaz de ser reconocida por la uridil-

transferasa, puesto que glnD es el gene estructural para dicha enzima. Por lo tanto, en las cepas con mutaciones en glnD, la proteína P_{II} se encuentra siempre en la forma P_{IIA} y la GS altamente adenilada. Al igual que en mutantes en glnB los niveles de GS son muy bajos, y poseen el fenotipo Ntr⁻. Los niveles tan bajos de GS adenilada provocan que estas cepas sean auxótrofas de glutamina (Gln⁻) (21, 22). Estos bajos niveles de GS son debidos a la regulación de la expresión de glnA por la proteína P_{II}, discutida arriba.

glnE:

La localización de este gene en el mapa de ligamiento es desconocida hasta la fecha. El gene glnE es el gene estructural para la adeniltransferasa (ATasa). Mutaciones en glnE, que ocasionan la pérdida de actividad de la ATasa, poseen regulación normal de los niveles de GS, aunque la enzima no esté adenilada. Al introducir a estas mutantes una mutación adicional en glnB que produce una proteína P_{II} alterada los niveles de GS bajan de igual forma que en las cepas con ATasa (glnE⁺) y la misma mutación en glnB, lo que indica que el papel regulador de la proteína P_{II} sobre la expresión de glnA es independiente de la ATasa y de la adenilación de la GS (23).

operón glnALG:

Este operón se localiza en el minuto 86 del mapa de ligamiento de E. coli. El gene glnA es el gene estructural para la GS, y por lo tanto mutaciones en dicho gene provocan auxotrofia por glutamina, así como el fenotipo Ntr⁻. Además se han aislado dentro del gene glnA mutacio-

nes en punto que provocan la síntesis de un antígeno de GS enzimáticamente inactivo que se expresa de manera constitutiva, y que tienen el fenotipo NtrC.

El gene glnL es contiguo al gene glnA, y mutaciones en dicho gene pueden producir varios fenotipos diferentes. Las mutaciones en glnL aisladas como supresoras de mutaciones en glnB o glnD poseen el fenotipo GlnC NtrC -- (21). Las deleciones del gene glnL presentan regulación normal de los niveles de GS, aunque existe un poco más de la enzima en condiciones de represión, sin llegar a ser completamente constitutivas (fenotipo Gln^+/C), y además son Ntr⁺ (24). Las mutaciones por inserción dentro del gene glnL resultan en un fenotipo constitutivo bajo para GS (GlnR) y además son Ntr⁻ (25, 26, 27).

El gene glnG se descubrió al encontrar mutaciones ligadas a glnA que suprimían el fenotipo Gln⁻ provocado por mutaciones en el gene glnF (16, 17), las cuales poseen un fenotipo constitutivo bajo para la GS (GlnR), y son Ntr⁻. Estas mutaciones supresoras conservan el mismo fenotipo aunque se restituya un gene glnF funcional. El mismo fenotipo GlnR Ntr⁻ resulta de la inactivación del gene glnG por una inserción (16, 17, 28). También se han descrito mutaciones en el gene glnG que provocan un fenotipo Gln⁻ (27, 29).

Al producto del gene glnG (pG), se le ha asignado un papel dual en la regulación, ya que es necesario tanto para la activación del gene glnA como para su represión -- (16, 25). Esto se deduce de la incapacidad de inducir los niveles de GS en ausencia de pG, aún en presencia de un -

gene glnF silvestre, lo que indica que es necesario para la activación; además el hecho de que en ausencia de un gene glnF funcional no se pueda expresar glnA, y que esta incapacidad sea suprimida por mutaciones que eliminan a - pG indican que en ausencia de activador (producto de glnF + producto de glnG), pG funciona como un represor. Esto - último es apoyado por mutaciones aisladas en el gene glnG que producen el fenotipo Gln^- y que aparentemente poseen un pG alterado de tal forma que únicamente funciona como un represor y nunca como un activador.

La región del operón glnALG ha sido clonada y sometida a un análisis físico detallado (30, 31, 32), y los productos de los genes han sido identificados (25). El producto del gene glnL es un polipéptido pequeño de 36,000 - daltones de peso molecular que se expresa siempre en concentraciones bajas. El producto del gene glnG es un polipéptido de 50,000 daltones de peso molecular, y que se expresa en niveles más elevados que el producto de glnL -- (Rocha, M. y Covarrubias, A. no publicado).

La orientación de estos genes ha sido determinada -- con respecto al cromosoma de E. coli, y se ha encontrado que la transcripción va de glnA hacia glnG y es en el sentido contrario a las manecillas del reloj (18, 26, 32). Aunque la posición y dirección de transcripción de los genes indican que se pudiera tratar de un operón sencillo, con la transcripción comenzando en glnA y procediendo hasta glnG, existen evidencias que indican que el operón es bastante complejo. Por ejemplo, cepas merodiploides con inserciones en los genes glnA y glnG en posición trans --

muestran niveles normales de GS (16, 17), lo que indica que los dos genes se encuentran en unidades transcripcionales diferentes; lo mismo ocurre cuando una cepa con una delección en glnA que elimina al promotor y a la región correspondiente al extremo NH₂-terminal de la GS es complementada con una inserción en glnG en trans (33). Sin embargo estas cepas merodiploides son Ntr⁻, lo cual es consistente con que ambos genes estén formando parte de un operón, es decir de una misma unidad transcripcional. Estas diferencias han sido explicadas postulando que la existencia de un solo operón con dos promotores, uno de ellos responsable de la transcripción de los tres genes, y que se encuentra al inicio de glnA (glnAp), y otro que se encuentra al inicio del gene glnL (glnLp), y que por lo tanto solo funcionaría para la transcripción de glnL y glnG, y postulando también que la transcripción que proviene desde glnAp puede proveer a la célula de pG suficiente para activar Ntr, pero que la transcripción a partir de glnLp produce niveles de pG que no son suficientes para activar Ntr, pero sí para activar glnA (26). Esto ha sido apoyado por el estudio de cepas que contienen fusiones del gene lacZ con el gene glnG, de manera que los niveles de β -galactosidasa reflejan la expresión de glnG. Estos estudios han demostrado que efectivamente la transcripción iniciada en glnAp puede proceder hasta glnG, y que pG es tanto un represor como un activador. Además se demostró la existencia de otro promotor (presumiblemente glnLp), a partir del cual se expresan glnL y glnG; la transcripción a partir de este promotor está sujeta a re-

presión por pG, lo que implica una autorregulación de pG (26). Por lo tanto en células limitadas de nitrógeno existirán niveles altos de pG, ya que la transcripción proviene de glnAp, mientras que en condiciones de exceso de nitrógeno los niveles de pG serán bajos ya que la transcripción proviene de glnIp. Estos niveles bajos de pG son suficientes para reprimir glnA, pero insuficientes para activar Ntr, lo cual requiere de niveles altos de pG, así como de un gene glnF funcional (2).

ANTECEDENTES.

Debido a que el trabajo experimental que se presenta en esta tesis es continuación de un trabajo previamente realizado (33), se mencionan en esta sección, de una forma muy somera, los resultados con que se contaba previamente al inicio de esta segunda etapa de la investigación.

Inicialmente se habían logrado aislar varias cepas mutantes de Escherichia coli K12 afectadas en el metabolismo de nitrógeno, y particularmente en la expresión de la enzima glutamina sintetasa (GS). Estas cepas mutantes fueron aisladas a partir de una cepa construida por S. -- Brom (34), la cual posee un bacteriófago λ kan2 (35) insertado cerca de la región del gene glnA. Dicho fago posee la mutación ci857, la cual provoca termosensibilidad de la cepa lisogénica, puesto que a 42°C el represor codificado por el gene ci es inactivo y se induce la lisis, -- mientras que a 30°C el represor es activo y se mantiene la lisogenia. A partir de esta cepa se aislaron cepas ter morresistentes, las cuales hubieran perdido al fago, buscando mediante dos ciclos de enriquecimiento con penicilina aquellas posibles escisiones aberrantes del fago que hubieran ocasionado deleciones en la región del gene glnA. Se aislaron de esta manera varias cepas mutantes, las cuales se pudieron acomodar claramente en dos grupos diferentes, de acuerdo a sus características fenotípicas.

Primer grupo: cepas MX850, MX851 y MX852.

Estas tres cepas manifiestan un fenotipo Gln^- (auxotrofia por glutamina), y Ntr^- . Las tres cepas carecen de

actividad detectable de GS, por lo que la mutación debe - afectar al gene estructural glnA. Son incapaces de rever- tir al fenotipo Gln^+ , lo que indica que las mutaciones -- que tienen son muy estables, y que probablemente se trate de mutaciones que no son puntuales, sino posiblemente de- lecciones. Al introducir a dichas cepas el plásmido F'14, el cual contiene la región cromosómica entre ilv y rha -- (que incluye a la región del gene glnA) se complementan - las mutaciones y las cepas se vuelven Gln^+ . Al realizar - cruzas por transducción entre dichas cepas es imposible - obtener recombinantes silvestres, lo cual demuestra que - efectivamente no son mutaciones puntuales, sino posible- mente deleciones. Esto se trató de comprobar complementan- do con un F'14, el cual posee una inserción del transpo- són Tn5 en el gene glnG, para ver si este gene, que tam- bién forma parte del mismo operón de glnA (operón glnALG) también está afectado, sabiendo de antemano que la caren- cia de un gene glnG funcional provoca sensibilidad a la - L-metionina-D,L-sulfoximina (MS), así como el fenotipo -- GlnR (28). Al analizar el fenotipo Ntr de estas tres ce- pas complementadas con F'14glnG74::Tn5 se observó que las cepas MX851 y MX852 poseen aún un gene glnG funcional en el cromosoma, puesto que complementan la sensibilidad a - MS y el fenotipo GlnR (constitutividad baja) que presenta el plásmido; la cepa MX850, por el contrario, sigue pre- sentando sensibilidad a MS y una GS constitutiva no indu- cible, lo cual indica que esta cepa carece del producto - del gene glnG, y ésto pudiera deberse a que presenta una deleción que llega a eliminar dicho gene.

La inserción del fago λ kan2 había sido originalmente mapeada entre los genes polA y glnG (34), pero el hecho de que dos de las mutantes (MX850 y MX852) sean Rha^- , a pesar de que este fenotipo no fue seleccionado implica -- que probablemente el fago se encontraba del otro lado del gene glnA y que el operón rha quedó entre glnA y la inserción del fago, (de ser ésto cierto la cepa MX851 no debería ser una deleción, ya que es Rha^+). Otra evidencia de que λ kan2 no está entre polA y glnA es el hecho de que solo una de las mutantes (MX850) es glnG⁻, ya que si estuviera ahí todas las mutantes que afectaran a glnA deberían ser glnG⁻.

Segundo grupo: cepas MX853, MX854, MX855 y MX856.

Se obtuvieron otras cuatro cepas con el fenotipo -- Gln^- , incapaces de utilizar amonio como fuente de nitrógeno, y que por lo tanto se aislaron junto con las cepas -- afectadas en glnA, ya que éste fue el único fenotipo seleccionado durante el aislamiento. Sin embargo estas cepas no tienen las mismas características de las cepas con mutaciones en glnA, ya que sí poseen actividad de GS, aunque los niveles de la enzima son bastante más bajos que los de una cepa silvestre (33). Además de ser incapaces de utilizar amonio como fuente de nitrógeno, estas cepas son incapaces de utilizar aspartato y glutamato como fuentes de nitrógeno, y utilizan arginina, aunque mucho más lentamente que una cepa silvestre, por lo que se pueden considerar como Ntr^- . Al tratar de observar si estas mutaciones se encuentran en la región de glnA, se observó que son capaces de recombinar con la cepa MX850 para dar lu--

gar a recombinantes silvestres, lo que indica que no se encuentran en esta región del cromosoma. Además, se obtuvieron resultados negativos al tratar de complementar las mutaciones con el plásmido F'14, lo que implica que no se encuentran en la región comprendida entre ilv y rha. Por lo tanto era muy probable que estas cepas tuvieran mutaciones espontáneas en algún gene que afectara la utilización del ión amonio como fuente de nitrógeno. Una posibilidad que se investigó fue la capacidad de estas cepas de transportar al amonio al interior de las células, empleando el ensayo descrito por Stevenson y Silver (ver la sección de Material y Métodos). Dicho ensayo utiliza metilamonio marcado radioactivamente con ^{14}C (10). Este ensayo reveló que, a diferencia de una cepa silvestre, las cepas MX853, MX854, MX855 y MX856 no presentan niveles significativos de transporte de metilamonio. Por lo tanto, ya -- que no se sabía en qué gene se encontraban las mutaciones de estas cepas, se pensó que era posible que se encontraran en algún gene estructural para el sistema de transporte de amonio, o bien que se encontraban en algún gene regulador que era necesario para la síntesis de dicho sistema. Independientemente de cual de estas dos opciones era la correcta, se hacía necesario mapear las mutaciones en el cromosoma de E. coli para ver si pertenecían a un gene nuevo, o si se trataba de un gene ya conocido.

El objetivo del presente trabajo fue, por lo tanto, continuar con el estudio de los dos grupos de cepas mutantes aisladas, para llevar a cabo una caracterización com-

pleta de las mismas.

De esta manera se pensó obtener información útil que ayudara a comprender un poco mejor el complejo sistema de la asimilación del ión amonio como fuente de nitrógeno para los compuestos nitrogenados celulares.

El estudio de los dos grupos de mutantes nos permite analizar el sistema a nivel de las enzimas que asimilan - al ión amonio y su regulación, así como a nivel del transporte del ión.

M A T E R I A L Y M E T O D O S .

Cepas bacterianas.-

Todas las cepas utilizadas en este trabajo son derivadas de Escherichia coli K12. La descripción de las cepas se encuentra en la tabla #1.

Condiciones de cultivo.-

Las cepas se mantuvieron en tubos de agar inclinado ("slants") con medio mínimo o medio rico, los cuales fueron resembrados a intervalos de un mes.

Para el crecimiento de los cultivos en líquido se -- utilizaron los siguientes medios:

Medio rico. Se utilizó el caldo Luria (36), al cual se le adicionó glutamina a una concentración final de 1mg/ml para mutantes auxótrofas de este aminoácido. Para los experimentos que requerían propagación o titulación del bacteriófago Plvira el medio Luria fue adicionado de CaCl_2 -- 25mM, timina 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y glucosa 0.2% (medio LRTG).

Medio mínimo. El medio mínimo que se utilizó a lo largo de este trabajo fue el medio NN, el cual contiene, en gramos por litro: KH_2PO_4 13.6, K_2SO_4 2.61, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, CaCl_2 0.01 y FeSO_4 0.0005, ajustado a pH 7.4 con KOH. Este medio se esterilizó en autoclave y posteriormente se agregaron las fuentes de carbono y nitrógeno, así como -- los requerimientos nutricionales previamente esterilizados por filtración. La fuente de carbono utilizada en todos los casos fue glucosa 0.2%. Las diferentes fuentes de nitrógeno fueron NH_4Cl 15mM ó 0.5mM, glutamina 1mg/ml o bien diferentes aminoácidos como arginina o glutamato a --

Tabla #1.

Cepas utilizadas.

Cepa	Genotipo
MX614	F ⁻ , <u>thi</u> , Δ (<u>pro-lac</u>), <u>ilv680</u>
MX615	derivada Δ (<u>gal-pgl-attλ-bio</u>) de MX614
MX752	derivada <u>zih::λkan2</u> de MX615
MX850	derivada Δ (<u>glnALG-rha</u>) de MX752
MX851	derivada <u>glnA⁻</u> de MX752
MX852	derivada Δ (<u>glnA-rha</u>) de MX752
MX853	derivada <u>glnD⁻</u> de MX752
MX854	derivada <u>glnD⁻</u> de MX752
MX855	derivada <u>glnD⁻</u> de MX752
MX856	derivada <u>glnD⁻</u> de MX752
MX902	derivada <u>glnG74::Tn5</u> de MX614
RR1	F ⁻ , <u>thi1</u> , <u>proA2</u> , <u>leuB6</u> , <u>rpL20</u>
P10	Hfr J4
CSH60	Hfr Ha-2
CSH62	HfrH, <u>thi</u>
MX1000	derivada Lac ⁺ Pro ⁺ Str ^R de MX853
MX890	revertante Gln ⁺ de MX854 (espontánea)
MX891	revertante Gln ⁺ de MX854 (espontánea)
MX892	revertante Gln ⁺ de MX854 (espontánea)
MX893	revertante Gln ⁺ de MX855 (espontánea)
MX894	revertante Gln ⁺ de MX856 (espontánea)
MX895	revertante Gln ⁺ de MX856 (espontánea)
MX705	derivada <u>glnA70</u> de RR1
MX727	derivada <u>glnA71::Tn5</u> de MX615
MX960	derivada <u>glnL82::Tn5</u> de MX614
MX1019	derivada <u>glnL83</u> de MX614
MX1029	derivada <u>glnG85^c</u> de MX960
MX848	derivada <u>glnF73::Tn5</u> de MX614
MX988	derivada <u>gltB31</u> de MX614

concentraciones finales de 0.2%.

Todos los crecimientos en líquido se hicieron a 37°C con agitación, inoculando a partir de un precultivo proveniente del mismo medio.

Para crecimientos en medio sólido se utilizaron los mismos medios adicionados de agar al 1.5%.

Preparación de lisados de PlvirA.-

Para experimentos de mapeo por transducción generalizada se utilizó el bacteriófago PlvirA. Para obtener los lisados en las cepas donadoras, se crecieron éstas en medio Luria líquido hasta 40 unidades Klett (uK). Se infectaron las células a una multiplicidad de infección de un fago/cincuenta bacterias (0.02) y se vaciaron con ayuda de Luria y agar suave licuado sobre cajas de Petri con medio LCTG. Las cajas se incubaron a 37°C durante 12 horas o hasta observar confluencia de placas. Posteriormente se recogió el agar con ayuda de una espátula y se agregaron 3 ml de medio Luria. Después de agregar 1/20 de volumen de cloroformo y de agitar durante un minuto en vórtex se centrifugó y el sobrenadante se decantó sobre un tubo limpio, volviéndose a añadir la misma proporción de cloroformo.

Los lisados se titularon sobre la cepa AB1157 en cajas de Petri con medio LCTG.

Transducciones.-

La cepa receptora se creció en medio Luria hasta 40 uK, se centrifugó y se resuspendió en 1/10 del volumen de bactotripton 1% (Difco). Se mezclaron fagos y bacte--

rias a una multiplicidad de infección de un fago/veinte - bacterias (0.05) y en presencia de CaCl_2 5mM y MgSO_4 10mM. Se incluyó un control con todo lo anterior pero sin fagos. La mezcla se incubó durante 20 minutos a 37°C , sin agitación, y posteriormente se centrifugó y se lavó dos veces con el mismo volumen de NM. Las células infectadas se plaquearon sobre cajas de Petri con el medio selectivo de manera que 5 ml del cultivo inicial (aprox. 5×10^8 células) fuera la cantidad de bacterias por caja.

Conjugaciones.-

Se crecieron las cepas donadora y receptora en medio Luria hasta 40 uK. Posteriormente se mezclaron a una multiplicidad de una donadora/diez receptoras (0.1) para --- transferencia de plásmidos y de 1/50 ó 1/100 para conjugaciones interrumpidas. Para transferencia de plásmidos se incubó durante 2 horas la mezcla de donadoras y receptoras, posteriormente se lavó y centrifugó dos veces con -- NM, y se plaquearon las diluciones adecuadas en cajas de Petri con el medio selectivo. Para conjugaciones interrumpidas se tomaron alícuotas cada dos minutos a partir del momento de mezclar donadoras y receptoras. Las alícuotas se agitaron inmediatamente durante un minuto en vórtex y enseguida se plaquearon sobre el medio selectivo. Se incluyeron controles por separado de las cepas donadora y receptora, y posteriormente se graficó el número de recombinantes/ml vs. tiempo de conjugación.

Transformación por plásmidos híbridos.-

Se crecieron 10 ml de la cepa receptora en medio Lu-

ria hasta 30 uK. Las células se centrifugaron en frío -- (4°C) y se lavaron con 5 ml de NaCl 10mM. Posteriormente se resuspendieron en 5 ml de CaCl₂ 30mM y se mantuvieron en hielo durante media hora. Las células se volvieron a centrifugar en frío y se resuspendieron en 1 ml de CaCl₂ 30mM. A 0.2 ml de estas células tratadas se adicionaron 1 ó 2 µg de plásmido puro resuspendido en CaCl₂ 30mM y se mantuvieron en hielo durante una hora. Posteriormente se pasaron durante 70 segundos a un baño de agua a 42°C y se regresaron durante 10 minutos a hielo. Enseguida se adicionaron 3 ml de medio Luria y se incubó a 37°C con agitación hasta observar reanudación del crecimiento. Para seleccionar las células transformadas se plaquearon en cajas de Petri con medio selectivo las diluciones adecuadas.

Obtención de mutantes resistentes a estreptomycinina.-

Para obtener derivadas resistentes a estreptomycinina a partir de cepas sensibles se crecieron 10 ml de cada cepa en medio rico hasta fase estacionaria. Las células se centrifugaron y la pastilla de células concentradas se plaqueó sobre cajas de Petri con medio rico adicionado de estreptomycinina a una concentración final de 100µg/ml. Las pocas colonias que crecieron se purificaron estriando sobre el mismo medio.

Hibridización DNA-DNA tipo Southern.-

Para el mapeo físico de las cepas MX850, MX851 y MX852 se realizaron experimentos de hibridización DNA-DNA tipo Southern utilizando filtros de nitrocelulosa (37).

Los DNAs cromosómicos de estas tres cepas y de la cepa -- silvestre de la cual provienen, la cepa MX615, fueron purificados primeramente de acuerdo al método de Marmur -- (38). Se realizaron dos experimentos diferentes; en el -- primero se digirieron 4µg de DNA cromosómico de las cepas MX615 y MX851 y se digirieron con la enzima de restric--- ción PstI. Los DNAs digeridos se sometieron a electrofore sis en un gel de agarosa ultrapura al 1%. En el segundo -- experimento se digirieron 4 µg de DNA cromosómico de las cepas MX615, MX850 y MX852 con la enzima de restricción -- HinfI y se sometieron a electroforesis en un gel de poli-- acrilamida al 7.5%. Para el primer caso se utilizaron co-- mo marcadores de peso molecular las bandas obtenidas en -- el mismo gel resultantes de digerir DNA del fago lambda -- con la enzima de restricción EcoRI, y para el segundo ca-- so se utilizó DNA del fago PE2 digerido con la enzima -- HindIII. El plásmido usado como sonda o probador fue el -- pACR2, el cual contiene toda la región de los genes glnA, glnI y glnG, el cual se marcó radioactivamente con un -- equipo de "nick translation" adquirido de New England Nu-- clear Co., usando como isótopo α -(³²P)-CTP.

Determinación de actividades enzimáticas de GS.-

El método empleado para determinar actividades enzi-- máticas de GS fue el descrito por Bender et al. (39) y mo-- dificado por Covarrubias et al. (30). Dependiendo del ti-- po se experimento se midió ya sea la actividad total de -- la enzima, mediante el ensayo de γ -glutamil transferasa, -- o bien la actividad biosintética de la misma. El ensayo --

de γ -glutamyl transferasa se utilizó para medir los niveles totales de la enzima, ya que tanto las subunidades no adeniladas como las adeniladas son capaces de llevar a cabo esta reacción in vitro, siendo el pH de isoactividad de ambos tipos de subunidades de 7.33 en E. coli. Para determinar qué proporción de las subunidades se encuentran adeniladas se utiliza el mismo ensayo de actividad de γ -glutamyl transferasa, pero en presencia de Mg^{2+} , que inhibe únicamente a las subunidades adeniladas.

Los extractos se prepararon creciendo 10 ml de cultivo en medio mínimo con las fuentes de nitrógeno adecuadas hasta una turbidez de 100 ± 20 uK. Enseguida se adicionó un mililitro de CTAB (bromuro de cetil, trimetilamonio) a una concentración de 1mg/ml, y se agitó durante 3 minutos en las mismas condiciones de crecimiento. Se enfrió inmediatamente en hielo, y las células se centrifugaron a $4^{\circ}C$ y se lavaron una vez en KCl al 1%. Se concentraron las células resuspendiéndolas en 1 ml del mismo KCl al 1%, y se mantuvieron en hielo hasta el momento de la determinación.

La mezcla de reacción se preparó de la siguiente forma:

	-Mg	+Mg
H ₂ O desionizada	14ml	14ml
Imidazole 1M, pH 7.33	4.5ml	4.5ml
NH ₂ OH·HCl 0.8M	0.74ml	0.74ml
MnCl ₂ 0.1M	0.09ml	0.09ml
Arseniato de Na 0.28M, pH 7.33	3ml	3ml
ADP sódico 20mM, pH 7.33	0.6ml	0.6ml
CTAB 1mg/ml	3ml	3ml
MgCl ₂ 3M	----	0.66ml
L-glutamina 0.2M	4.125ml	4.125ml

Posteriormente se ajustó el pH a 7.33 con NaOH y se aforó a 33ml. La mezcla se vació en tubos (0.4ml por tubo) y se colocaron en un baño a 37°C. A cada tubo se le agregó -- 0.1ml de extracto y se incubó a 37°C. Para cada determinación se utilizaron tres tubos; el primero se utilizó como blanco, deteniendo la reacción con reactivo de parar --- ("stop mix"), antes de agregar el extracto, y los otros - dos se incubaron con el extracto durante 5 minutos y durante 10 minutos antes de detener la reacción. El reactivo de parar contiene 55g/l de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20g/l de ácido tricloraacético y 21ml/l de HCl. Los tubos se centrifugaron y se midió la absorbancia del sobrenadante en espectrofotómetro a 540nm. El factor de conversión utilizado fue 0.532, que es la absorbancia de 1 μ mol de γ -glutamilhidroxamato. Las actividades específicas se reportan como μ moles de γ -glutamilhidroxamato producidas por minuto y por miligramo de proteína. El grado de adenilación de la enzima se obtuvo aplicando la fórmula:

$$N = 12 - 12 (a/b)$$

donde N=número de subunidades adeniladas por dodecámero 'de la enzima

a=actividad obtenida en presencia de MgCl_2 60mM

b=actividad obtenida en ausencia de MgCl_2 60mM

Para determinar la actividad biosintética de la enzi

ma se hizo la siguiente mezcla:

H ₂ O desionizada	5ml
Imidazole 1M, pH 7.33	2ml .
NH ₂ OH·HCl 0.8M	1.25ml
MgCl ₂ 3M	0.4ml
L-glutamato 0.85M, pH 7.6	4.2ml
CTAB 1mg/ml	2ml

Se ajustó el pH final a 7.6, y se vaciaron 0.4ml de la mezcla de reacción en cada tubo, así como 40µl de extracto. La reacción se inició adicionando a cada tubo 60µl de ATP 0.2M, pH=7.6. Al terminar la reacción con reactivo de parar se agitó en vórtex. Todo el tratamiento posterior -- fue igual que para la actividad de γ -glutamyl transferasa.

Determinación de entrada de metilamonio.-

El método utilizado para determinar la entrada de metilamonio a las células fue esencialmente el descrito por Stevenson y Silver (10), con algunas modificaciones. El medio mínimo fue NN con glucosa al 0.2% como fuente de -- carbono, y con las fuentes de nitrógeno consideradas en -- cada experimento. Las células se crecieron hasta una turbidez de 100 uK y enseguida se pasaron a hielo. Se centrifugaron a 4°C y se lavaron dos veces con medio NN sin -- fuentes de carbono y nitrógeno, y posteriormente se resuspendieron en un buffer consistente de Tris-HCl 50mM, -- NaCl 72mM y glucosa 0.2%, pH=7.0, concentrando el cultivo cinco veces. Se colocaron 0.5ml de células concentradas -- en un baño a 37°C durante 5 minutos y posteriormente se -- adicionó $^{14}\text{CH}_3\text{NH}_3^+$ (4.8mCi/mmol) a una concentración final de 6µM, y se continuó incubando durante 20 minutos, -- pasados los cuales se adicionaron 5 ml de buffer NN e inmediatamente se filtraron las células a través de filtros Millipore (0.47µm de diámetro), los cuales se lavaron después con 10ml de NN. La radioactividad contenida en las -- células detenidas en los filtros se contó colocando los -- filtros en viales de centelleo con 10ml de líquido de --

Bray (40), por cada filtro. La radioactividad se contó en un contador de centelleo Packard Tri-Carb.

Determinación de proteína.-

Las determinaciones de proteína para calcular actividades específicas se realizaron utilizando el método descrito por Lowry et al. (41).

RESULTADOS.

Caracterización física de las cepas MX850, MX851 y MX852.

Como se mencionó anteriormente, se contaba al iniciar este trabajo con tres cepas que acarrean mutaciones en el gene glnA, de acuerdo a su fenotipo. Debido al tipo de aislamiento, se pensaba que estas cepas pudieran tener deleciones en la región del gene glnA, que hubieran eliminado a éste, y posiblemente también a otros genes contiguos. Para tratar de caracterizar más precisamente las mutaciones de estas tres cepas, se decidió realizar un mapeo físico mediante una prueba de hibridización entre el DNA cromosómico de éstas y un plásmido híbrido que contuviera la región del gene glnA en su totalidad; específicamente se empleó al plásmido pACR2 (13.8Kb), el cual contiene en su totalidad a los genes glnA, glnL y glnG, así como a un gene contiguo que codifica una proteína de 70Kd de peso molecular, todo esto contenido en un fragmento de 10.5Kb, tal y como se muestra en la figura #3. Se contaba con evidencias que indicaban que probablemente no en las tres cepas se presentaban deleciones, sino solamente en dos de ellas, puesto que las cepas MX850 y MX852 -- presentan el fenotipo Rha⁻, el cual no había sido seleccionado, mientras que la cepa MX851 es Rha⁺. Por lo tanto era probable que la cepa MX851 no contuviera una deleción de esta región. Como se puede observar en la figura #4, - al hibridizar el DNA de MX851, digerido con PstI, contra el plásmido pACR2 se observa que la banda de 4.4Md presen

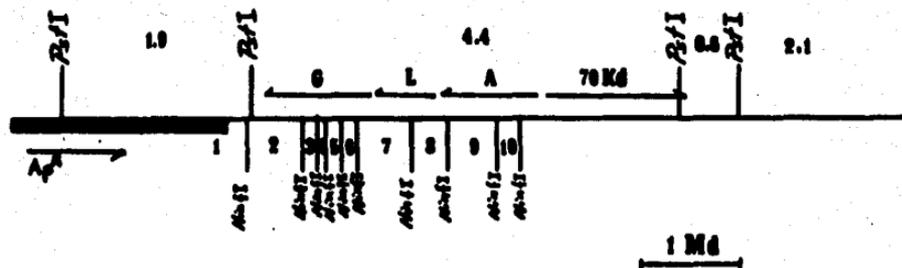


Figura #3.- Mapa del plásmido pACR2. Los números entre los fragmentos de PstI indican el peso de los mismos (en Md). Los números entre los fragmentos de Hinfi corresponden a los mismos números en la figura #5. A=glnA, L=glnL, G=glnG.

(No están representados todos los sitios de Hinfi del plásmido)

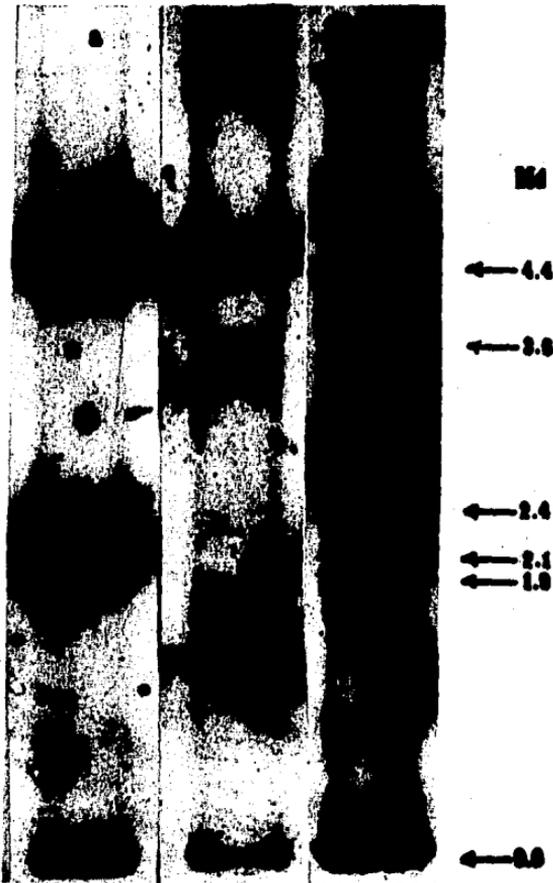


Figura #4.- Hibridación de DNA cromosómico purificado de las cepas MI615 y MI651 con DNA de pACR2. Carril a) pACR2 vs. pACR2, carril b) MI615 vs. pACR2, carril c) MI651 vs. pACR2.

te en la cepa silvestre MX615, y la cual contiene al gene glnA, ya no se encuentra presente; en su lugar se encuentran ahora dos bandas nuevas, de 2.4Md y 3.6Md de peso molecular. Esto implica que en esta cepa no hubo pérdida de DNA en la región del gene glnA, sino ganancia de DNA, ya que el peso de las dos bandas nuevas ($2.4 + 3.6 = 6.0$ Md) es mayor en 1.6Md al peso de la banda silvestre (4.4 Md). Es decir que, en lugar de una deleción, ocurrió una inserción de material genético dentro del gene glnA, la cual está provocando una mutación al interrumpir el gene. Este material genético que se insertó contiene además un sitio para la enzima de restricción PstI, y por ésto se originan dos bandas nuevas, en lugar de una banda más grande. Debido a ésto no se puede saber si el elemento que se insertó mide únicamente 1.6 Md o si es mayor, ya que pudiera contener más de un sitio de PstI y solamente se detectan los extremos, los cuales quedan fusionados al DNA del gene glnA que sí hibridiza con pACR2, mientras que los fragmentos internos del elemento no hibridizarían. En el caso del elemento que se insertó posea solamente un sitio para la enzima de restricción PstI, el tamaño del elemento sería de 1.6 Md, lo cual sugeriría que se trata posiblemente de una secuencia de inserción, aunque su origen no ha sido determinado.

Para las cepas MX850 y MX852 se siguió otro enfoque al hacer el experimento de hibridización. Se utilizó, para digerir el DNA cromosómico, una enzima que produjera varios fragmentos relativamente pequeños en la región de glnA, de manera que se pudiera determinar con mayor exac-

titud hasta qué parte de esta región penetra la delección de cada cepa, observando cuales son los fragmentos que están presentes en la cepa silvestre, y que ya no se encuentran en estas mutantes. Para ésto se utilizó la enzima de restricción HinfI, la cual proporciona un número adecuado de fragmentos en la región del gene glnA. Los resultados de esta prueba de hibridización se muestran en la figura #5. Se puede observar que la cepa MX850 posee una delección muy grande, la cual abarca completamente a los genes glnA, glnL y glnG. Esto confirma los resultados obtenidos mediante la prueba de complementación realizada con el plásmido F'14glnG74:Tn5, la cual indicaba que esta cepa era glnG⁻, aunque no se sabía si ésto se debía a la pérdida del gene o bien si era un efecto polar por la pérdida del gene glnL. Las dos bandas que aún se encuentran presentes en el cromosoma y que hibridizan con pACR2, corresponden a DNA que está ya afuera del gene glnG, y por lo tanto se puede concluir que esta cepa no posee dicho gene (ver figura #3).

A diferencia de la cepa MX850, que produce solamente dos bandas que hibridizan con pACR2, la cepa MX852 presenta varias bandas más, que indican que la delección de esta cepa es bastante menor a la que posee la cepa MX850; ésto también confirma los resultados obtenidos en las pruebas de complementación con F'14glnG74:Tn5, que indicaban la presencia en esta cepa de un gene glnG funcional. Al analizar el peso molecular de las bandas que están presentes todavía en la cepa MX852, y comparando con el mapa de esta región, se puede observar que corresponden a los genes



Figura #3.- Hibridación de DNA cromosómico purificado de las cepas MX615, MX850 y MX852 con DNA de pACR2. Carril a) pACR2 vs. pACR2, carril b) MX615 vs. pACR2, carril c) MX850 vs. pACR2, carril d) MX852 vs. pACR2. Carril M-DNA de PM2 digerido con *Hind*III. Las flechas corresponden a fragmentos de los siguientes pesos (en Md) 3.14, 1.34, 0.6, 0.31, 0.29, 0.14 y 0.06. (Los números de las bandas corresponden a los fragmentos de *Hinf*I representados en la figura #3)

glnG y glnL, que se encuentran intactos en el cromosoma; sin embargo, es posible observar que no se encuentran presentes todas las bandas que corresponden al gene glnA, sino solamente las que corresponden al extremo 3' del gene, y la región inicial del gene no se encuentra. Es decir que la mutación de esta cepa consiste en la pérdida de la región de control del gene glnA, así como la porción del gene que codifica para el extremo NH₂-terminal de la proteína.

Tanto en la cepa MX850 como en la cepa MX852, también se ha perdido completamente la región que posee al gene que codifica para una proteína de 70Kd, y por lo tanto ninguna de éstas la produce.

Caracterización de las cepas MX850 y MX852 por complementación.

Una vez efectuada la caracterización física, se procedió a efectuar pruebas de complementación con distintos plásmidos híbridos que llevan diferentes porciones de la región del gene glnA, puesto que las delecciones aisladas resultan ideales para este tipo de experimentos. En particular, la cepa MX850 permite observar la expresión de los genes contenidos en plásmidos híbridos sin tener interferencia de los mismos genes presentes en el cromosoma en trans. La cepa MX852 permite observar de qué forma los genes glnL y glnG presentes en el cromosoma, pero en ausencia de un gene glnA en cis, son capaces de influenciar la expresión de un gene glnA en trans.

Los plásmidos utilizados fueron los plásmidos pACR1, pACR23 y pACR5. El plásmido pACR1 posee en su totalidad a los genes glnA, glnL y glnG, así como al gene que codifica la proteína de 70Kd. Los plásmidos pACR23 y pACR5 carecen de los genes glnL y glnG, y poseen únicamente al gene glnA: se diferencian en que el plásmido pACR23 contiene - además del gene glnA al gene de la proteína de 70Kd, el cual no está presente en el plásmido pACR5. Estos plásmidos se ilustran en la figura #6.

Los resultados obtenidos de estas complementaciones, así como las características de algunas cepas mutantes inculcidas como controles se encuentran en la tabla #2.

Como se puede observar, tanto la cepa MX850/pACR1 como la cepa MX852/pACR1 presentan una regulación normal de la síntesis de GS. Aunque el plásmido pACR1 es un plásmido que se encuentra presente en varias copias por célula, ya que el vehículo de clonación es el plásmido ColE1, el efecto "multicopia" no es muy marcado, dado que el aumento en la actividad específica de GS es de aproximadamente tres veces con respecto a la cepa silvestre. Esto se puede explicar si tomamos en cuenta que no solamente el gene estructural de GS (glnA) se encuentra en multicopia, sino que también sus genes reguladores (glnL y glnG). Cuando se complementa con los plásmidos pACR23 y pACR5, los cuales solamente llevan al gene glnA, se observan diferencias muy marcadas en el fenotipo de ambas cepas. La cepa --- MX850/pACR23 (ó MX850/pACR5), es incapaz de regular la cantidad de GS que se expresa a partir del gene glnA en multicopia, puesto que se expresa la misma actividad en -

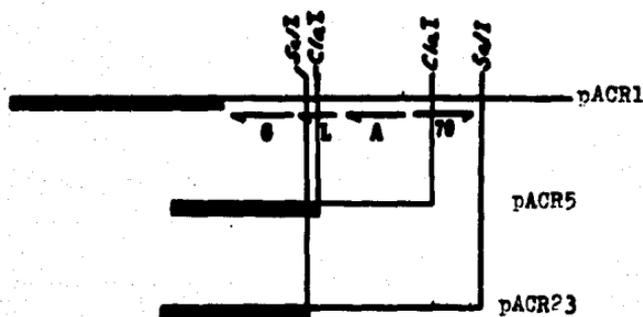


Figura #6.- Mapa de los plásmidos pACR1, pACR5 y pACR23.

A= glnA, L= glnL, G= glnG, 70= gene de la proteína de 70 Kd.

pACR1-10.9 Md.

pACR5- 5.1 Md.

pACR23-6.1 Md.

Tabla #2.

Complementación de las cepas
MX850 y MX852 con plásmidos híbridos.

(Actividades específicas de γ -glutamyl transferasa)

Cepa	N-exceso	N-limitación	Aut	MS (80 μ M)
MX615	0.14	1.24	+	R
MX850/pACR1	0.36	2.43	+	R
MX850/pACR5	1.21	1.58	-	S
MX850/pACR23	1.46	1.76	-	S
MX852/pACR1	0.45	3.28	+	R
MX852/pACR5	1.74	15.60	-	R
MX852/pACR23	1.52	16.65	-	R
MX850 \underline{glnF} :Tn5/ pACR5	n.d.	2.37	-	n.d.
MX852 \underline{glnF} :Tn5/ pACR5	n.d.	1.89	-	n.d.
MX615/pACR5	1.08	17.63	+	R
MX727/pACR5	1.91	14.83	-	R
MX727/pACR23	2.34	14.41	-	R

N-exceso = NH_4^+ 15mM.

N-limitación = glutamina 1 mg/ml ó arginina 0.2%.

Aut = utilización de arginina 0.2% como única fuente de N.

MS = sensibilidad a L-metionina-D,L-sulfoximina.

n.d. = no determinado

un medio con nitrógeno en exceso o en un medio limitado de nitrógeno. Puesto que esta cepa carece de los genes *glnI* y *glnG*, la cantidad de GS que se está sintetizando debe corresponder al fenotipo que expresan las mutantes *glnG*⁻, es decir una actividad baja y constitutiva; sin embargo los niveles son más elevados, puesto que el gene *glnA* se encuentra en multicopia. Para comprobar ésto se introdujo a estas cepas una inserción del transposón *Tn5* en el gene *glnF*. Se puede observar que, al igual que para una cepa *glnG*⁻, la presencia o ausencia de un gene *glnF* funcional no afecta significativamente la expresión de GS a partir de *glnA*.

A diferencia de la cepa MX850, la cepa MX852/pACR5 ó MX852/pACR23 sí es capaz de regular normalmente la síntesis de GS a partir del gene *glnA*, pero ahora que no se encuentran presentes los genes *glnI* y *glnG* en el plásmido, sino únicamente *glnA*, el efecto multicopia es muy marcado. Las actividades tan altas que se presentan pueden deberse a que una sola copia de los genes reguladores *glnF*, *glnG*, y *glnI* no son capaces de reprimir completamente a muchas copias del gene *glnA*, pero sí son suficientes para activarlas. Este mismo efecto se observa en la cepa MX727 complementada con pACR5 ó pACR23, lo cual constituye un caso análogo, puesto que también carece del gene *glnA* cromosómico, con la diferencia de que este se encuentra inactiva do por una inserción de *Tn5*, y no por una delección. Curiosamente lo mismo ocurre cuando se complementa a la cepa silvestre (MX615) con pACR5 ó pACR23. Es válido concluir que estas actividades altas observadas al complementar --

MX615, MX727 y MX852 con pACR5 ó pACR23 se deben a activación por los productos de los genes glnF y glnG, puesto que cuando se introduce la inserción de Tn5 en glnF se provoca ahora la incapacidad de estas cepas de regular sus niveles de GS, y se presenta un caso análogo al de la cepa MX850 (ver Discusión más adelante).

Si se analiza el fenotipo Ntr y la sensibilidad a la MS de las cepas complementadas con los plásmidos híbridos se puede observar lo siguiente. Cuando se complementa a las cepas MX850 y MX852 con el plásmido pACR1 se observa que son Aut^+ y MS^R , lo cual indica que la expresión del gene glnG es normal, puesto que se encuentra en cis con respecto a glnA en el plásmido. La cepa MX850/pACR5 ó MX850/pACR23 es Aut^- y MS^S , lo cual es de esperarse puesto que carece del gene glnG. La cepa MX852/pACR5 ó MX852/pACR23 es Aut^- y MS^R . La incapacidad de utilizar arginina como fuente de nitrógeno puede deberse a que el gene glnG que se encuentra en el cromosoma no se expresa en niveles suficientemente altos como para activar Ntr (Aut), puesto que no tiene a un gene glnA en cis. Sin embargo el nivel de expresión del gene glnG es aparentemente suficiente como para dar resistencia a MS.

Mapeo de las mutaciones de las cepas MX853, MX854, MX855 y MX856.

Como se mencionó anteriormente en la sección de antecedentes, durante el aislamiento de las cepas con delecciones en glnA ya descritas, se aislaron también varias cepas mutantes incapaces de utilizar amonio como fuente de

nitrógeno. Estas cepas son las cepas MX853, MX854, MX855 y MX856. Experimentos previos permitieron caracterizar parcialmente el fenotipo que estas cepas presentan, y el cual también se resume en la sección de antecedentes, -- siendo particularmente interesante el hecho de haber encontrado que estas cepas son incapaces de llevar a cabo el transporte de amonio al interior de las células. Una posibilidad era que esta incapacidad de transportar amonio era la responsable del fenotipo Gln^- que presentan, y además que esta deficiencia en el transporte se debiera a una mutación que afectara estructuralmente a dicho sistema. Debido al método por el que se aislaron estas cepas era probable que se encontraran mutadas en una región cercana a la región del gene glnA, pero intentos de cotransducir dichas mutaciones con glnA, o de complementar con el F'14 que lleva dicha región resultaron infructuosos. Era por lo tanto necesario que se obtuviera la localización de las mutaciones en el mapa de ligamiento de E.coli ya que ésto facilitaría su análisis posterior, así como la posible obtención de más mutaciones en el mismo gene, en caso de tratarse efectivamente de mutaciones en genes estructurales del sistema de transporte de amonio.

Para efectuar los experimentos de mapeo, era necesario que se obtuvieran cepas derivadas resistentes a estreptomycin. Estas serían utilizadas después como receptoras en conjugaciones interrumpidas con diferentes cepas Hfr con orígenes de transferencia conocidos. Estas derivadas resistentes se obtuvieron seleccionando mutaciones espontáneas, para no tener que utilizar mutágenos que proba

blemente también introducirían otras mutaciones no deseadas. Una vez obtenidas las derivadas espontáneas resistentes a estreptomycin, se hizo una conjugación preliminar con las cepas Hfr P10 y CSH60, las cuales tienen orígenes de transferencia muy cercanos, pero que transfieren el -- cromosoma en direcciones opuestas. Esto permitiría observar, de una manera muy general, en qué "mitad" del cromosoma se encuentran las mutaciones. Los orígenes de transferencia de estas cepas con respecto al cromosoma se encuentran ilustrados en la figura #7. Se puede observar que, al hacer una conjugación con estas dos cepas, e interrumpiendo a los 30 y a los 60 minutos, el número de recombinantes silvestres obtenidas es mucho mayor con la cepa donadora CSH60 que con la cepa P10. Esto indica que las mutaciones se localizan en la "mitad" del cromosoma que transfiere primero esta cepa, la cual es la comprendida entre los minutos 87 y 17. Posteriormente, se realizaron conjugaciones interrumpidas a tiempos cortos con la cepa CSH60 como donadora. Como el marcador silvestre no entraba en las etapas tempranas de la conjugación, se escogió otra cepa Hfr con un origen de transferencia muy cercano al minuto 0, la cual es la cepa CSH62 (HfrH). Con esta cepa se hicieron conjugaciones interrumpidas, y se observó que la entrada del marcador era un poco posterior a la entrada del marcador leu, cuya entrada se midió utilizando como receptora a la cepa RR1. Esto indicaba que las mutaciones se encontraban posiblemente cercanas al operón proAB. Como las cepas mutantes MX853, MX854, MX855 y MX856 provienen de la cepa MX615, la cual tiene una de-

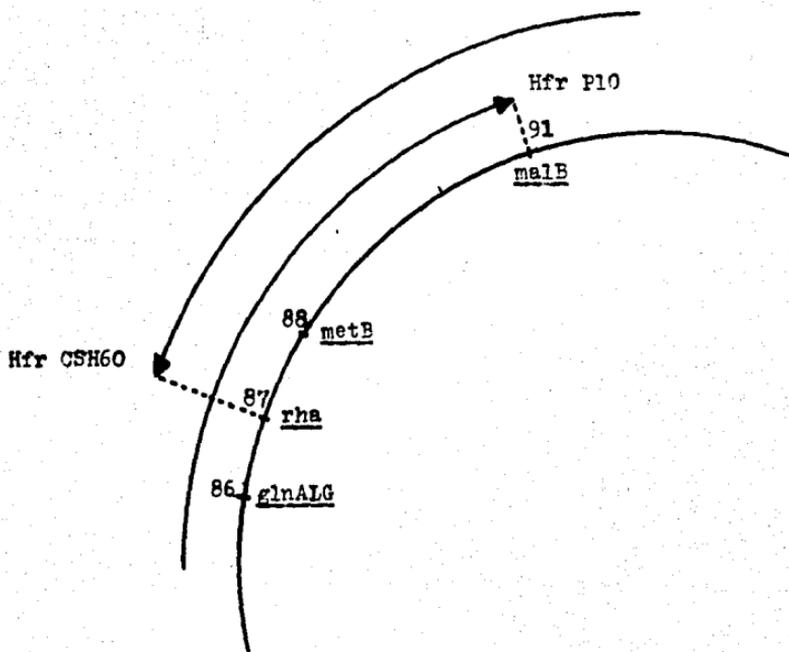


Figura #7.- Origen y sentido de transferencia de las cepas CSH60 y P10.

lección de la región del cromosoma entre proAB y lac, era posible que el mapeo resultara falso, puesto que cepas receptoras con deleciones en el cromosoma no presentan el mismo tipo de curvas de entrada de marcadores durante una conjugación (42). Por lo tanto se tenía que restituir a las cepas la región de pro....lac, sin perder las mutaciones originales, y para ésto se hizo una conjugación, seleccionando recombinantes Pro^+Lac^+ de las cepas MX853 y MX856. Al analizar las recombinantes Pro^+Lac^+ obtenidas se observó que la gran mayoría era ahora Gln^+ , y solamente un 10% aproximadamente seguía conservando la mutación que provocaba el fenotipo Gln^- ; ésto indicaba que efectivamente la mutación que se deseaba mapear se encontraba muy cercana a la región de pro. Se purificaron dos de las recombinantes Lac^+Pro^+ y se las utilizó como receptoras nuevamente en una conjugación interrumpida. Como se puede observar en la figura #8, la entrada del marcador que se quería mapear se da aproximadamente dos minutos antes de pro, lo cual indica que corresponde al minuto 4 del cromosoma.

Al analizar los genes que se encuentran descritos en el mapa de ligamiento de E. coli para el minuto 4 del cromosoma, se observa que ahí se encuentra localizado el gene glnD, el cual codifica para uno de los componentes del sistema que se encarga de la adenilación y desadenilación de la GS, el cual es la enzima uridiltransferasa (43). Luego entonces era posible que las mutaciones que habíamos mapeado fueran precisamente mutaciones en el gene glnD.

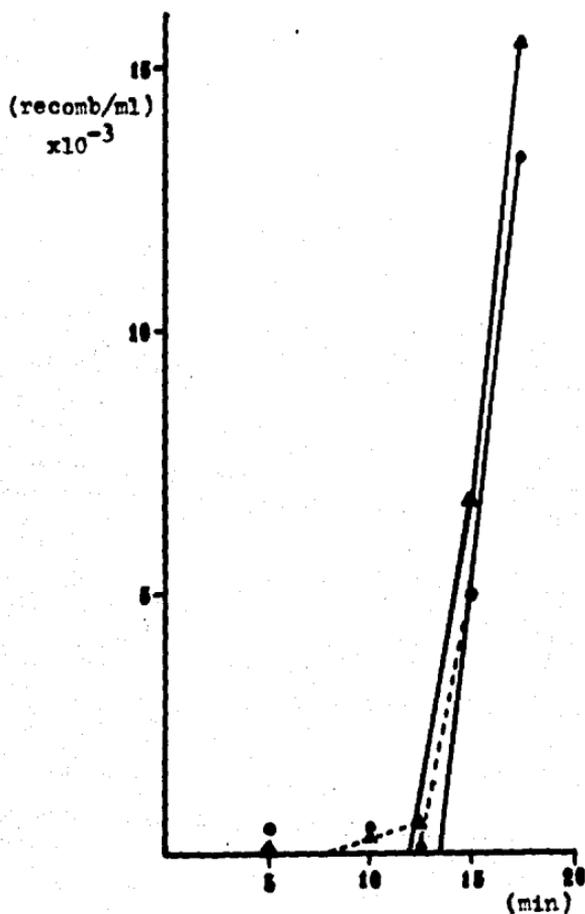


Figura #8.- Conjugaciones interrumpidas entre las siguientes cepas: ▲ HfrH x MX1000, seleccionando crecimiento en aspartato como fuente de N y Str^R; ● HfrH x RR1 seleccionando Pro⁺ y Str^R.

Caracterización de las cepas MX853, MX854, MX855 y MX856.

Como se mencionó anteriormente, éstas cepas poseen - niveles bajos de GS, aún en condiciones limitantes de nitrógeno, como es cuando la fuente de nitrógeno es glutamina. Esto coincide con lo que ha sido reportado para cepas con mutaciones en glnD, las cuales además de poseer niveles bajos de GS presentan dicha enzima muy adenilada en - cualquier condición de crecimiento. Esto se debe a que al carecer de actividad de utidiltransferasa, la proteína reguladora P_{II} se encuentra siempre en la forma P_{IIA} (no uridilada), la cual estimula a la adeniltransferasa para - que mantenga a la GS adenilada.

Para comprobar si efectivamente las cepas MX853, MX-854, MX855 y MX856 poseen mutaciones en el gene glnD se - midió el grado de adenilación de la GS, así como la actividad biosintética de la enzima, y los resultados se encuentran en las tablas #3 y #4. Las actividades de GS revelan que efectivamente la enzima se encuentra completa- mente adenilada, y que la actividad biosintética de la - misma es tan baja que las cepas son incapaces de crecer - en condiciones en que requieren sintetizar glutamina.

Otra manera de comprobar que efectivamente estas mu- taciones han sido mapeadas correctamente, y que se encuen- tran en el gene glnD, es aislar revertantes espontáneas - Gln⁺, y analizar los niveles de GS que presentan, así como el grado de adenilación. Se aislaron varias revertan- tes y se les midió GS y adenilación, como se muestra en - la tabla #5. Es claro que las cepas revierten a varios fe

Tabla #3.

Actividades específicas de γ -glutamyl transferasa y grado de adenilación de GS en las cepas MX853, MX854, MX855 y MX856.

Cepa	gln lmg/ml	gln lmg/ml+NH ₄ ⁺ 15mM
MX615	1.15 (3.3)	0.05 (9.1)
MX853	0.17 (11.6)	0.04 (11.7)
MX854	0.30 (10.6)	0.05 (11.8)
MX855	0.20 (11.4)	0.03 (12.0)
MX856	0.03 (10.6)	0.02 (12.0)

Actividades expresadas en μ moles de γ -glutamyl-hidroxiato formado/min/mg proteína.

Los números entre paréntesis se refieren al número de subunidades adeniladas por molécula de GS.

Tabla #4.

Actividades biosintéticas de GS de las cepas MX853, MX854, MX855 y MX856.

Cepa	gln lmg/ml	gln lmg/ml+NH ₄ ⁺ 15mM
MX615	0.36	0.05
MX853	0.02	0.01
MX854	0.03	<0.01
MX855	0.02	<0.01
MX856	<0.01	<0.01

Actividades expresadas en μ moles de γ -glutamyl-hidroxiato formado/min/mg proteína.

Tabla #5.Actividades específicas de glutamina sintetasa
de revertantes de mutaciones $glnD^-$.

Cepa	NH_4^+ 15mM	gln 1mg/ml
MX615	0.09 (8.7)	1.38 (6.2)
MX890	0.05 (4.1)	0.36 (4.7)
MX891	0.21 (6.9)	0.42 (8.4)
MX892	0.55 (11.6)	0.92 (9.0)
MX893	0.91 (11.6)	1.47 (11.9)
MX894	0.03 (2.2)	0.09 (4.5)
MX895	0.66 (11.8)	0.92 (11.7)

Actividades de γ -glutamyl-transferasa, expresadas en μ moles de γ -glutamyl hidroxamato producidas/min/mg proteína.

Los números entre paréntesis representan el número de subunidades adeniladas por molécula de GS.

notipos diferentes. Uno de ellos es aumentando los niveles de GS, y conservando un alto grado de adenilación; otro es recuperando niveles normales de adenilación, o incluso más bajos de lo normal, pero sin un aumento excesivo de la síntesis de GS. Esto es consistente con que las mutaciones se localicen en el gene glnD.

Una última comprobación de que efectivamente las mutaciones aisladas se encuentran en glnD sería lograr la cotransducción de éstas con uno de los marcadores que se sabe cotransducen con glnD, como es el gene dapD, el cual cotransduce un 90%. Sin embargo, al no contar con mutantes en dapD, se decidió complementarlas con el plásmido F'104, el cual posee la región donde se localiza glnD, así como los marcadores laterales leu, thr y pro. Efectivamente, las cepas fueron complementadas por el plásmido F'104, para dar lugar al fenotipo Gln^+ .

Regulación del sistema de transporte de amonio.

Al encontrar que las mutaciones se localizan en el gene glnD, y no directamente en el sistema de transporte de amonio, como se pensaba en un principio, hizo que surgiera la pregunta de porqué las mutaciones en glnD provocan la incapacidad de sintetizar dicho sistema de transporte. Una posibilidad es que dicho sistema pertenezca, al igual que muchos otros sistemas de transporte, al llamado fenotipo Ntr^- , y que en las mutantes glnD no se sintetice debido a que estas cepas son Ntr^- (2). Para demostrar si efectivamente ésto es cierto, se midió la respuesta de una cepa silvestre a diferentes fuentes de nitróge-

no. Ello, para observar si la síntesis del sistema de -- transporte de amonio responde a condiciones de exceso y - limitación de nitrógeno de la misma manera que los otros_ sistemas que pertenecen al fenotipo Ntr. Como se puede ob_ servar en la tabla #6, la síntesis del sistema de trans-- porte de amonio responde efectivamente a la limitación de nitrógeno, encontrándose reprimida en condiciones de exce_ so de nitrógeno, como es una alta concentración de amonio, e inducida en condiciones de limitación de nitrógeno, -- como es una baja concentración de amonio, o glutamina co- mo fuente de nitrógeno. Para confirmar que el sistema se induce en condiciones de limitación de nitrógeno y se re- prime en condiciones de exceso de nitrógeno se realizaron dos experimentos. En el primero (figura #9), se creció a la cepa silvestre MX614 en una concentración alta de amo- nio (15mM), y posteriormente las células se lavaron y se continuó el crecimiento en diferentes medios limitados de nitrógeno y en el mismo medio con amonio 15mM. Asimismo, se incluyeron controles en los que se continuó el creci-- miento en los mismos medios pero en presencia de 34µg/ml_ de cloranfenicol, para impedir la síntesis de proteínas. Como se puede observar, al continuar el crecimiento en el mismo medio no ocurre ningún cambio en los niveles de -- transporte de amonio, mientras que cuando el crecimiento_ se transfiere a medios limitados de nitrógeno los niveles de transporte de amonio se elevan a medida que transcurre el tiempo de permanencia de las células en dichos medios. Esto se debe a la síntesis de novo del sistema, puesto - que en presencia de cloranfenicol no se eleva el transpor

Tabla #6.

Entrada de $6\mu\text{M } ^{14}\text{CH}_3\text{NH}_3^+$ (4.8mCi/nmol)
en la cepa silvestre (EX614) crecida en
diferentes fuentes de nitrógeno.

Fuente de N	Actividad específica
NH_4^+ 15 mM	1
NH_4^+ 0.5 mM	115
Glutamina 1 mg/ml	31
Glutamina 1 mg/ml NH_4^+ 15 mM	2

Actividad específica expresada en nmoles
 de metilamonio incorporado/min/gramo de
 peso seco.

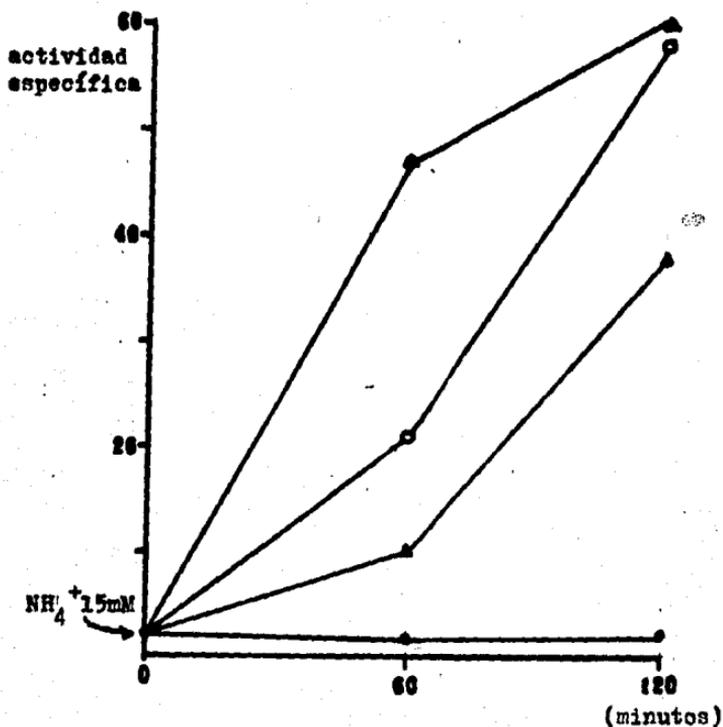


Figura #9.- Inducción del sistema de transporte de amonio en medios limitantes de nitrógeno, después de un crecimiento en medio con amonio en exceso. Actividad específica expresada como nmoles de metilammonio incorporado/min/gramo de peso seco. Δ sin N, \blacktriangle en 1mg/ml , \circ $\text{NH}_4^+ 0.5\text{mM}$, \bullet $\text{NH}_4^+ 15\text{mM}$ o cualquier condición en presencia de cloranfenicol $34\mu\text{g/ml}$.

te, ya que la (o las) proteína(s) encargada(s) del transporte no se está(n) sintetizando. En un segundo experimento (figura #10) se hizo lo inverso; es decir, se creció a la cepa KX614 en un medio limitado de nitrógeno (amonio - 0.5mM) y posteriormente se dividió el cultivo en dos; una mitad se continuó creciendo en el mismo medio, y a la otra mitad se le adicionó una concentración alta de amonio (15mM). Se puede observar que al continuar el crecimiento en el medio limitado de nitrógeno el sistema continúa sintetizándose, mientras que al agregar un exceso de nitrógeno el sistema deja de sintetizarse y los niveles de transporte comienzan a disminuir, aunque lentamente, a partir del momento en que se añade el exceso de amonio.

Una vez que se demostró que efectivamente la síntesis del sistema de transporte de amonio está sometida a regulación por la fuente de nitrógeno, al igual que otros sistemas Ntr, era necesario demostrar que la síntesis del acarreador depende del mismo sistema genético del que dependen glnA y los genes Ntr para su expresión. Para esto se midieron niveles de transporte de amonio a diferentes cepas con mutaciones en genes del sistema regulador del metabolismo de nitrógeno, y los resultados se presentan en la tabla #7. Como se puede observar, todas las cepas que presentan el fenotipo Ntr⁻, también son incapaces de inducir el transporte de amonio. Esto se observa en glutamina como fuente de nitrógeno, en donde este sistema de transporte se encuentra inducido en la cepa silvestre. Esto indica que efectivamente este sistema forma parte del conjunto de sistemas regulados por nitrógeno, o sea -

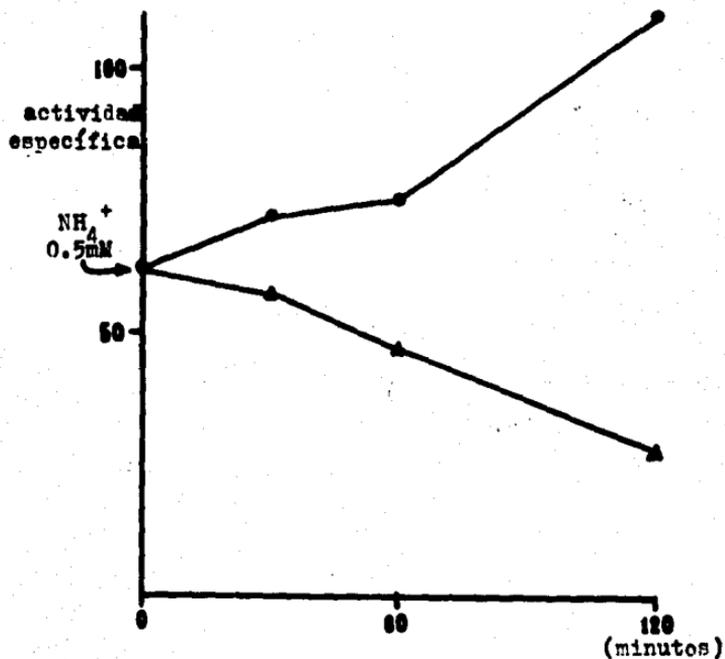


Figura #10.- Represión del sistema de transporte de amonio después de un crecimiento en una baja concentración de amonio (0.5mM) y agregando una alta concentración de amonio (15mM). Actividad específica expresada en nmoles de metilamonio incorporado/min/gramo de peso seco.

● NH_4^+ 0.5mM, ▲ NH_4^+ 15mM.

Tabla #7.

Entrada de $6\mu\text{M } ^{14}\text{CH}_3\text{NH}_3^+$ (4.8mCi/mmol)
en diversas cepas alteradas en el
metabolismo de nitrógeno.

Cepa	Genotipo	Fenotipo	Actividad específica	
			NH_4^+ 15mM	Glutamina mg/ml
MX614	silvestre	Gln^+Ntr^+	1	31
MX705	<u>glnA70</u>	Gln^-Ntr^-	n.c.	1
MX727	<u>glnA71::Tn5</u>	Gln^-Ntr^-	n.c.	1
MX852	<u>glnA</u>	Gln^-Ntr^-	n.c.	1
MX856	<u>glnD84</u>	Gln^-Ntr^-	n.c.	1
MX902	<u>glnG74::Tn5</u>	Gln^+Ntr^-	n.d.	1
MX960	<u>glnL82::Tn5</u>	Gln^+Ntr^-	1	1
MX1019	<u>glnL83</u>	Gln^-Ntr^0	6	16
MX1029	<u>glnL82::Tn5</u> <u>glnG85^c</u>	Gln^-Ntr^0	9	11
MX848	<u>glnF73::Tn5</u>	Gln^-Ntr^-	n.c.	1
MX988	<u>gltB31</u>	Gln^+Ntr^-	n.d.	1

Actividad específica expresada en nmoles de metilamonio incorporado/min/gramo de peso seco.

n.c. = no crece.

n.d. = no determinado.

Ntr. Además se presenta el caso de dos cepas mutantes que poseen un sistema de transporte de amonio cuya síntesis es constitutiva, es decir no se encuentra completamente reprimida en condiciones de exceso de nitrógeno. Tales cepas son la MX1019, la cual tiene una mutación no polar en el gene glnL y presenta niveles de GS también constitutivos. La otra es la cepa MX1029, la cual fue obtenida como una mutación supresora de la polaridad que ejerce una inserción del transposón Tn₅ en el gene glnL, y que probablemente exprese de manera constitutiva al gene glnG. Todo esto confirma que las mutaciones originalmente aisladas en las cepas MX853, MX854, MX855 y MX856 están en el gene glnD, y que el fenotipo que presentan consistente en la incapacidad de transportar amonio al interior de las células se debe a que este sistema se encuentra reprimido (o no inducido), pues son mutantes que presentan el fenotipo Ntr⁻.

DISCUSION.

En este trabajo se completó la caracterización de cepas con mutaciones en el gene glnA, que debido a su aislamiento debieran presentar deleciones en dicho gene. Los resultados obtenidos de los experimentos de hibridización tipo Southern entre el DNA cromosómico de estas cepas mutantes y el plásmido híbrido pACR2 permitieron complementar el análisis genético previo analizando directamente la región del gene glnA de estas cepas, y observando si las diferencias entre el patrón de hibridización de una cepa silvestre y las mutantes son congruentes con los resultados genéticos previos. A partir del análisis de las bandas, se puede afirmar que el análisis físico de las mutantes corresponde a lo esperado; como se mencionó anteriormente, se tenían evidencias que indicaban que la cepa MX851 no contaba con una deleción en el gene glnA, ya que a diferencia de las cepas MX850 y MX852 posee el fenotipo Rha⁺. Al analizar el patrón de hibridización se puede comprobar que no se trata de una deleción, sino que esta cepa posee una inserción dentro del gene glnA; esta inserción provoca el fenotipo Gln⁻ y la incapacidad de producir GS. El fenotipo Ntr⁻ de esta cepa puede ser explicado si se tiene en cuenta que una inserción de DNA extraño dentro de un operón tiene un efecto polar sobre los genes que se transcriben posteriormente dentro del operón. En este caso los genes glnL y glnG se pueden transcribir a partir del promotor de glnL, pero los niveles de pG producidos no son suficientes como para lograr la activación -

de Ntr, ya que estos niveles altos de pG sólo se alcanzan cuando la transcripción proviene del promotor de glnA. En cuanto a las cepas MX850 y MX852, las cuales se esperaba que tuvieran deleciones en el gene glnA, se puede efectivamente confirmar que tienen una deleción en la región de glnA, aunque esta deleción es de diferentes tamaños en las dos cepas. Se sabía por el análisis genético previo que la cepa MX850 carecía de un gene glnG funcional, mientras que la cepa MX852 sí poseía un gene glnG activo. El hecho de que la cepa MX850 no tuviera un gene glnG funcional no implicaba forzosamente que este gene hubiera sido eliminado por deleción, ya que bastaría con que hubiera sido eliminado el promotor de glnL para que este gene no se expresara, aunque aún permaneciera en el cromosoma. Para la cepa MX852, que sí expresa un gene glnG, era de esperarse que también el gene glnL, incluyendo a su promotor permaneciera intacto en el cromosoma. Como se puede observar a partir de la hibridización del DNA cromosómico de estas dos cepas con el plásmido pACR2, las predicciones eran correctas; es decir, la cepa MX850 carece de los genes glnA, glnL y glnG en su totalidad, mientras que la cepa MX852 no solamente conserva intactos a los genes glnL y glnG, sino que conserva una buena parte del gene glnA. Sin embargo, la cepa MX852 carece del promotor de glnA y de la porción de dicho gene correspondiente a la región amino-terminal de las subunidades de la GS, lo que explica su fenotipo Gln⁻. Nuevamente, el fenotipo Ntr⁻ de esta cepa es explicable por la polaridad que ejerce la falta del promotor de glnA, lo que implica que el gene --

glnG se expresa solamente a partir del promotor de glnL y los niveles de pG son insuficientes para la activación de Ntr.

Tanto la cepa MX850 como la cepa MX852 son cepas que resultan útiles para llevar a cabo experimentos de complementación con diferentes plásmidos. En este caso se utilizaron plásmidos híbridos, ya que se puede analizar el efecto que tiene la delección sobre los genes que existan en el plásmido, sea éste únicamente el estructural o también genes reguladores, y de que manera el efecto multicopia se puede manifestar para la expresión del gene glnA. Al complementar a la cepa MX850 con el plásmido pACR1, el cual posee al operón glnALG completo, se observa que la regulación de la síntesis de GS es normal, y el efecto multicopia es muy reducido, además de manifestarse el fenotipo Ntr⁺. Esto indica que los genes que se encuentran en el plásmido son perfectamente funcionales, y no requieren de la existencia de sus homólogos en el cromosoma. A pesar de que el gene glnA se encuentra en multicopia, el efecto sobre la expresión de la GS, que solo aumenta unas dos o tres veces respecto a una cepa que lo posee en una sola copia, indica que los genes glnL y glnG se están encargando de reprimir a glnA de manera que éste no se exprese en niveles demasiado elevados. Esto pudiera deberse a que los genes glnL y glnG también se encuentran en multicopia de la misma forma que glnA. Por lo tanto se analizó qué pasaría si en lugar de un plásmido que tuviera los tres genes en multicopia se utilizara uno que solamente tuviera en multicopia al gene estructural, como el plásmi

do pACR5 o el plásmido pACR23. Se puede observar que al complementar a la cepa MX850 con cualquiera de estos dos plásmidos se pierde la regulación sobre los niveles de la GS, de manera que se tiene aproximadamente la misma actividad en condiciones de exceso que de limitación de nitrógeno. Se podría explicar este fenómeno asumiendo que cada gene glnA se está expresando de una manera constitutiva - baja (GlnR); pero como hay numerosas copias del gene, observamos niveles de GS mucho más altos (o sea GlnR expresándose en multicopia). Esta observación indica que para el caso de pACR1, el hecho de que los genes reguladores - glnL y glnG estén en multicopia no afecta su capacidad de regular normalmente a glnA, ya que en el momento de ser removidos del plásmido la regulación es eliminada. En cuanto al fenotipo Ntr de la cepa MX850 complementada con pACR1 se ve que es normal (Ntr⁺), mientras que con pACR5 ó pACR23 es anormal (Ntr⁻). En el primer caso, se puede explicar por la presencia de glnG en cis con el promotor de glnA, lo que debe producir niveles de pG suficientes para activar Ntr, mientras que en el segundo caso, simplemente no existe glnG, por lo que Ntr no puede ser activado.

Al complementar a la cepa MX852 con los mismos plásmidos, se observa que no hay diferencias cuando se usa el plásmido pACR1, puesto que la copia extra de glnL y glnG que posee todavía en el cromosoma no ejerce prácticamente ningún efecto. Sin embargo, al complementar a la cepa -- MX852 con pACR5 ó pACR23 la presencia de una copia de los genes glnL y glnG funcionales en el cromosoma es muy im-

portante en cuanto al efecto que tiene sobre la expresión del efecto multicopia de glnA. Los niveles de GS son ahora regulados normalmente de acuerdo a la fuente de nitrógeno, pero a diferencia de cuando existe un gene glnG en multicopia, los niveles de GS, tanto en condiciones de inducción como de represión, se elevan entre 10 y 20 veces más que en una cepa silvestre. El hecho de que estos niveles tan elevados de GS dependen efectivamente de una regulación normal es apoyado por la drástica disminución de estos niveles cuando se elimina al producto del gene activador glnF mediante una inserción de Tn5 en dicho gene. - Esto es además una evidencia de que efectivamente para regular normalmente a glnA, aún cuando está presente en muchas copias por célula, no son limitantes los niveles de pG (ni tampoco de pF). Sin embargo es posible que los niveles del producto del gene glnL sí sean limitantes, ya que este producto es el que aparentemente interviene evitando una activación excesiva de glnA, además de que se sabe que se expresa en poca cantidad. Dicho de otra forma, ya que se sabe que pG no es limitante, puesto que es suficiente para activar todas las copias del plásmido, tampoco debería ser limitante para reprimirlas. Por ello, mas bien el factor limitante es aquel que se encarga de transformar al producto de glnG de activador a represor, muy probablemente el producto del gene glnL. Este, cuando está también en multicopia, sí impide una sobreproducción de la GS. A pesar de los niveles tan elevados de GS, la cepa MX852 complementada con pACH5 ó pACR23 sigue siendo Ntr⁻, puesto que glnG solamente se expresa a partir del -

promotor del gene glnL. Nuevamente, cuando la expresión es a partir del promotor de glnA, como cuando la complementación se efectúa con pACR1, el fenotipo es Ntr⁺.

En el presente trabajo también se logró analizar la localización cromosómica y el fenotipo de las mutantes - MX853, MX854, MX855 y MX856, las cuales habían sido caracterizadas parcialmente con anterioridad, como se menciona en la sección de antecedentes. Había sido mencionado que para poder continuar con la caracterización de estas cepas mutantes se hacía necesario obtener la localización de las mutaciones que portan en el mapa de ligamiento de E. coli. Los resultados del mapeo de estas mutaciones -- indicaron que se encontraban aproximadamente en el minuto 4 del mapa, entre los marcadores leu (minuto 2) y pro (minuto 6). El hecho de que en dicha región del cromosoma se localice el gene glnD sugirió que probablemente las mutaciones de estas cepas no eran mutaciones estructurales - del sistema de transporte de amonio, sino que pudieran ser mutaciones localizadas en el gene glnD, y que la incapacidad de inducir el sistema de transporte de amonio fue ra por un efecto pleiotrópico de dichas mutaciones. Esto sería explicable si el sistema de transporte de amonio - perteneciera al conjunto de sistemas Ntr, cuya expresión no es normal en cepas con mutaciones en glnD (2, 21, 22).

Los sistemas Ntr poseen como característica fundamental el estar regulados por la fuente de nitrógeno, de la misma forma que está regulada la GS. Por lo tanto era necesario comprobar que el sistema de transporte de amonio de una cepa silvestre de E. coli también está regulado -

por la calidad de la fuente de nitrógeno. Los experimentos realizados consistentes en medir los niveles de transporte de amonio en células crecidas en diferentes fuentes de nitrógeno, así como los experimentos de inducción y desinducción al cambiar de fuente nitrogenada demuestran claramente que el sistema de transporte de amonio de la cepa silvestre sí se encuentra regulado por la fuente de nitrógeno. El sistema se encuentra reprimido en condiciones de exceso de nitrógeno, como es el caso de una concentración alta de amonio, mientras que en medios con una concentración baja de amonio o con una fuente de nitrógeno pobre (i.e. glutamina), el sistema se encuentra inducido.

Por lo tanto es muy probable que efectivamente las mutaciones de las cepas MX853, MX854, MX855 y MX856 sean en el gene glnD, y que los genes que codifican el sistema de transporte de amonio se encuentren estructuralmente intactos, pero son incapaces de inducirse en una cepa Ntr^- . Al analizar el grado de adenilación que presentan estas cepas, se encontró que efectivamente el nivel de adenilación de la GS es muy elevado, aún en condiciones en que la enzima no debiera estar adenilada. Además, la actividad biosintética de la enzima es tan baja, que incluso no puede ser detectable con el ensayo. Es posible que esto provoque el fenotipo Gln^- de estas cepas, sin embargo, también es probable que el fenotipo Gln^- sea provocado en parte por la incapacidad de estas cepas de inducir completamente sus niveles de GS. Como ya se ha mencionado, una cepa glnD⁻ carece de actividad de UTasa, y por lo tanto -

la proteína P_{II} se encuentra siempre en la forma P_{IIA} , la cual ha sido implicada directamente en la regulación de los niveles de GS, impidiendo la activación del gene glnA a través de la mediación del producto del gene glnL. Los niveles de GS de estas cepas (MX853, MX854, MX855 y MX856) son congruentes con dicha hipótesis, ya que se encuentran bastante reprimidos aún cuando las cepas son crecidas en un medio limitado de nitrógeno. Las revertantes espontáneas de estas cepas confirman que las mutaciones se encuentran en glnD. Algunas revertantes siguen conservando niveles de GS muy bajos, por lo que deben seguir conservando también la mutación en glnD y un gene glnB funcional, pero que ahora son incapaces de adenilar a la GS en niveles elevados, aún en condiciones de exceso de nitrógeno (MX890, MX894). Por ello, es posible que se trate de mutaciones en el gene glnE, y que carezcan de ATasa. -- Otras revertantes (MX892, MX893, MX895), siguen presentando una adenilación muy elevada en cualquier condición, pero ahora los niveles de GS se encuentran elevados, mostrando diferentes grados de constitutividad. Estas revertantes deben seguir conservando la mutación en glnD y un gene glnB funcional, pero el hecho de que P_{IIA} no reprima los niveles de GS indica que muy probablemente el gene glnL de estas cepas se encuentre mutado, de manera que el producto de glnL ya no interfiera siempre con la activación de glnA por los productos de glnG y glnE. Los diferentes niveles de constitutividad de estas tres cepas pueden deberse a diferentes productos de glnL alterados, o a diferentes grados de polaridad de la mutación que provoca

la reversión sobre el gene glnG. La cepa MX891, que tiene una adenilación intermedia, debe seguir conservando ATasa, pero posiblemente ahora carezca de proteína P_{II} por tener una mutación en glnB. Sin embargo, si la mutación eliminara completamente a P_{II}, se esperarían niveles de GS constitutivos, y esta cepa aunque tiene niveles de GS relativamente elevados, no es completamente constitutiva. Esto último posiblemente se deba a que sigue conservando la mutación en glnD.

Los fenotipos de las revertantes, así como la complementación positiva con el plásmido P'104, evidencian que efectivamente las cepas MX853, MX854, MX855 y MX856 son -mutantes en el gene glnD.

Como se mencionó anteriormente, el sistema de transporte de amonio en E. coli se encuentra regulado por la -fuente de nitrógeno y pertenece al fenotipo Ntr. Por ello se explica que las mutaciones en glnD impidan que este -sistema se exprese. Asimismo se ha observado que el sistema de transporte de amonio se encuentra afectado en otras cepas con mutaciones en el sistema de regulación del metabolismo de nitrógeno (tabla #7).

Hasta la fecha han sido descritos sistemas de transporte de amonio en varios microorganismos, tanto procariontes como eucariotes (44). Aparentemente éstos sistemas se encargan del transporte concentrativo de iones amonio al interior de la célula, lo cual es especialmente importante en condiciones en que hay poco amonio en el medio. Estudios cinéticos del sistema de transporte de amonio en -diferentes bacterias (10, 45, 46, 47) han demostrado que

la cinética del transporte corresponde a la de un sistema específico de alta afinidad para amonio, y que es dependiente de energía, particularmente de la cadena respiratoria en condiciones aeróbicas. El transporte de amonio aparentemente también es dependiente de la existencia de una diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana, y de ahí la dependencia de la cadena respiratoria, - que genera dicha diferencia de potencial mediante la expulsión de protones al exterior de la célula (48). Esta diferencia en la concentración de protones entre el exterior y el interior de la célula es probablemente la fuerza principal que guía al amonio al interior de la célula, y se le conoce como fuerza protón-motriz (47). También han sido reportado casos de bacterias que aparentemente no poseen sistemas de transporte de amonio concentrativos, como es el caso de algunas cepas simbióticas de Rhizobium. Esto ha sido explicado porque este es un organismo que libera amonio para mantener la simbiosis con la planta. Sin embargo, los sistemas de transporte de amonio existen en muchos microorganismos fijadores de N_2 de vida libre, ya que lo pueden utilizar para obtener amonio del medio aún cuando esté en concentraciones bajas. Esto les ayuda a evitar el proceso de fijación de N_2 que consume mucha energía; además, les es útil para la retención del amonio producido por la fijación del N_2 y que puede difundir hacia el exterior de la célula como NH_3 (45).

En varios microorganismos se ha demostrado que la síntesis del acarreador específico de amonio se encuentra regulada por la fuente de nitrógeno, como es el caso de -

Azospirillum (46) y de Klebsiella pneumoniae (47). En el presente trabajo se describe como en Escherichia coli K12 existe una regulación muy similar. Además, se demuestra - que la regulación de este sistema depende del mismo sistema genético que se encarga de regular a la GS y a los sistemas Ntr. Esto fue primeramente evidenciado por la incapacidad de mutantes glnD⁻ de transportar amonio, y después comprobado por el análisis del transporte de este - ión en cepas con mutaciones reguladoras en los genes -- glnA, glnG, glnF, glnL y gltB. Se puede observar que en - estas cepas existe una correspondencia entre la incapacidad de expresar Ntr (Aut), y la capacidad de expresar el sistema de transporte de amonio (Amt). En particular, todas las cepas que son Aut⁻ son también Amt⁻. En el caso - de mutantes que son GlnC, y que deben ser NtrC (aunque ésto no se puede deducir a partir del fenotipo Aut), se presenta también el fenotipo AmtC, con niveles de transporte de amonio elevados aún cuando hay exceso de amonio en el medio y el sistema se encuentra reprimido en una cepa silvestre (aparentemente en estas condiciones una cepa silvestre adquiere su nitrógeno como NH₃ que alcanza a permear libremente la membrana). Es interesante el hecho de contar ahora con la certeza de que el fenotipo Amt forma parte del fenotipo Ntr, ya que permitirá obtener datos - cuantitativos acerca de la expresión de Ntr, lo cual no era posible previamente al analizar solamente el fenotipo Aut.

REFERENCIAS.

- 1.- Tyler, B. 1978. *Ann. Rev. Biochem.* 47:1127-1162.
- 2.- Magasanik, B. 1982. *Ann. Rev. Genet.* 16:135-168.
- 3.- Stadtman, E.R. 1973. en: *The Enzymes of Glutamine Metabolism.* Prusiner, S. y Stadtman, E.R. (eds.) Academic Press, New York. pp 1-8.
- 4.- Ginsburg, A. Stadtman, E.R. en: *The Enzymes of Glutamine Metabolism.* Prusiner, S. y Stadtman, E.R. (eds.) Academic Press, New York. pp 9-44.
- 5.- Woolfolk, C.A., Stadtman, E.R. 1964. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17:313.
- 6.- Wohlhueter, R.M., Schutt, H., Holzer, H. 1973. en: *The Enzymes of Glutamine Metabolism.* Prusiner, S. y Stadtman, E.R. (eds.) Academic Press, New York, pp 45-64.
- 7.- Kustu, S.G., McFarland, N.C., Hui, S.P., Esmon, B., Ames, G.F. 1979. *J. Bacteriol.* 138:218-234.
- 8.- Betteridge, P.R., Ayling, P.D. 1976. *J. Gen. Microbiol.* 95:324-334.
- 9.- Masters, P.S., Hong, J. 1981. *J. Bacteriol.* 147:805-819.
- 10.- Stevenson, R., Silver, S. 1977. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75:1133-1139.
- 11.- Bender, R.A., Magasanik, B. 1977. *J. Bacteriol.* 132:100-105.
- 12.- Bender, R.A., Magasanik, B. 1977. *J. Bacteriol.* 132:106-112.
- 13.- Poor, F., Janssen, K.A., Magasanik, B. 1975. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72:4844-4848.
- 14.- Bancroft, S., Rhee, S.G., Neumann, C., Kustu, S. 1978. *J. Bacteriol.* 134:1046-1055.
- 15.- Garcia, E., Bancroft, S., Rhee, S.G., Kustu, S. 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:1662-1666.

- 16.- Kustu, S., Burton, D., Garcia, E., McCarter, L., McFarland, N. 1979. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 4576-4580.
- 17.- Pahel, G., Tyler, B. 1979. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:4544-4548.
- 18.- Rothstein, D.M., Pahel, G., Tyler, B., Magasanik, B. 1980. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77:7372-7376.
- 19.- Pahel, G., Zelenetz, A.D., Tyler, B. 1978. J. Bacteriol. 133:139-148.
- 20.- Foor, F., Reuveny, Z., Magasanik, B. 1980. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77:2636-2640.
- 21.- Foor, F., Cedergren, R.J., Streicher, S.L., Rhee, S.G., Magasanik, B. 1978. J. Bacteriol. 134:562-568.
- 22.- Bloom, F.R., Levin, M.S., Foor, F., Tyler, B. 1978. J. Bacteriol. 134:569-577.
- 23.- Reuveny, Z., Foor, F., Magasanik, B. 1981. J. Bacteriol. 146:740-745.
- 24.- Chen, Y., Backman, K., Magasanik, B. 1982. J. Bacteriol. 150:214-220.
- 25.- McFarland, N., McCarter, L., Artz, S., Kustu, S. 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78:2135-2139.
- 26.- Pahel, G., Rothstein, D.M., Magasanik, B. 1982. J. Bacteriol. 150:202-213.
- 27.- Rothman, R., Rothstein, D.M., Foor, F., Magasanik, B. 1982. J. Bacteriol. 150:221-230.
- 28.- Osorio, A.V., Servín-González, L., Rocha, M., Covarrubias, A.A., Bastarrachea, F. Mol. Gen. Genet. (en prensa).
- 29.- Wei, G.R., Kustu, S. 1981. Mol. Gen. Genet. 183:392-399.
- 30.- Covarrubias, A.A., Sánchez-Pescador, R., Osorio, A., Bolívar, F., Bastarrachea, F. 1980. Plasmid. 3:150-164.
- 31.- Covarrubias, A.A., Rocha, M., Bolívar, F., Bastarrachea, F. 1980. Gene. 11:239-251.
- 32.- Chen, Y., Backman, K., Magasanik, B. 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78:3743-3747.
- 33.- Servín-González, L. 1981. Tesis (biólogo). Facultad de Ciencias, UNAM.

- 34.- Brom Klaner, S. Tesis. (Lic. en Investigación Biomédica Básica). Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.
- 35.- Berg, D.E., Davies, J., Allet, B., Rochaix, J. 1975. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72:3628-3632.
- 36.- Miller, L. 1972. Experiments in Molecular Genetics. (2a ed). Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- 37.- Southern, E.M. 1975. J. Mol. Biol. 98:503-517.
- 38.- Marmur, J. 1961. J. Mol. Biol. 3:208-218.
- 39.- Bender, R.A., Janssen, K.A., Resnick, A.D., Blumenberg, N., Poor, F., Magasanik, B. 1977. J. Bacteriol. 129:1001-1009.
- 40.- Peng, C.T. 1977. Sample Preparation in Liquid Scintillation Counting. The Radiochemical Centre Ltd, Amersham, Bucks, England.
- 41.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. J. Biol. Chem. 193:265-275.
- 42.- Curtis III, R., Charamella, L.J., Stallions, D.R., Mays, J.A. 1968. Bacteriol. Rev. 32:320-348.
- 43.- Bachmann, B.J., Brooks Low, K. 1980. Microbiol. Rev. 44:1-56.
- 44.- Brown, C.M. 1980. en: Microorganisms and Nitrogen Sources. Payne, J.W. (ed.) John Wiley & Sons.
- 45.- Wiegel, J., Kleiner, D. 1982. FEMS Microbiol. Lett. 15:61-63.
- 46.- Hartmann, A., Kleiner, D. 1982. FEMS Microbiol. Lett. 15:65-67.
- 47.- Kleiner, D. 1982. Biochim. Biophys. Acta. 688:702-708.
- 48.- Leonard, J.E., Lee, C.A., Apperson, A.J., Dills, S.S., Saier Jr, E.H. 1981. en: Organization of Prokaryotic Cell Membranes. Ghosh, B.K. (ed.) CRC Press. Boca Raton, Fla, USA.