

163
2ej.



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

Aspectos Particulares sobre la Organización y Regulación
del Gene que Codifica para la Enzima Penicilino Acilasa
de E. coli

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

p r e s e n t a

Félix Recillas Targa

Director: Dr. Francisco Bolívar Zapata

México, D. F.

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE GENERAL

Resumen	4
Introducción	5
Objetivos	12
Antecedentes	14
Material y Métodos	
Material	36
I- Reactivos	36
II- Medios de cultivo	36
III- Cepas bacterianas y plásmidos	37
IV- Condiciones para la digestión de DNA con endonucleasas de restricción	37
Métodos	
I- Transformación de cepas de <u>Escherichia coli</u>	38
II- Purificación de DNA de plásmido	39
III- Micro-ensayo de DNA de plásmido (screening)	40
IV- Electroforesis de DNA en geles de agarosa o de acrilamida	40
V- Aislamiento de fragmentos de DNA de un gel de agarosa	41
VI- Extracción de DNA con fenol saturado	42
VII- Bioensayo para la medición de actividad de la PA	42
VIII- Manejo de secuencias por computadora	43

Resultados

I- Análisis de la proteína en su extremo	
NH ₂ terminal	44
II- Análisis de la región reguladora	46
III- Clonación de la región de regulación	
del gene <i>pac</i> que lleva los tres	
operadores putativos	47
IV- Medición de la actividad de la enzima PA	49
V- Estudio sobre operadores	51
A- Recopilación de algunas secuencias	
reportadas como operadores	52
B- Localización y tamaño de los	
operadores citados	52
C- Abundancia de Purinas y Pirimidinas	
en operadores	56
D- Similitud entre las tres secuencias	
palindrómicas de la región de regulación	
del gene <i>pac</i>	57

Discusión y conclusiones

I- Procesamiento de la enzima PA	59
II- Estudio de la región de regulación	
del gene <i>pac</i>	60
III- Discusión de los resultados	
derivados de las clonaciones	62
IV- Estudio sobre operadores	63

A- Compilación de algunas secuencias reportadas como operadores	63
B- Localización y tamaño de los posibles operadores del gene <i>lac</i>	65
C- Abundancia de Purinas y Pirimidinas en operadores	67
D- Similitud entre las tres secuencias dpalindromeicas de la región de regulación del gene <i>lac</i>	68
E- Conclusiones sobre las comparaciones ...	69
Perspectivas	72
Bibliografía	75

Resumen

La enzima penicilino acilasa (PA) de Escherichia coli cataliza la hidrólisis de la penicilina G, dando como productos ácido fenilacético y ácido 6-amino-penicilánico (6-APA). El 6-APA forma el núcleo a partir del cual se pueden obtener las penicilinas semi-sintéticas, las cuales tienen una utilidad terapéutica mayor que la penicilina G. Se sabe que la expresión del gene que codifica para la PA (gene pac) está regulada a nivel de transcripción por el tipo de fuente de carbono, esta regulación está mediada por AMP-cíclico. Además la expresión del gene se incrementa si al medio de cultivo se adiciona ácido fenilacético. Otros factores que modifican el nivel de expresión del gene pac son la temperatura y el nivel de oxígeno.

Con el propósito de conocer con mayor detalle los mecanismos que intervienen en la organización y regulación de este gene, se decidió primero hacer un estudio comparativo. Este estudio fue realizado a nivel de secuencia de aminoácidos, de la región de la PA no madura, la cual permite su exportación al espacio periplásmico. La segunda parte se enfocó en definir el posible papel biológico de regiones de DNA localizadas en la vecindad del promotor funcional del gene pac, que tuvieran funciones de posibles "operadores", o regiones de control negativo. Para lo anterior se diseñó una serie de experimentos, mediante técnicas de DNA recombinantes, que aportaron más conocimientos sobre la regulación del gene pac.

Con los resultados obtenidos relacionados con una regulación en base a un posible control negativo, se realizó un estudio partiendo de antecedentes bibliográficos, intentando comprender la estructura de los operadores y su interacción con moléculas reguladoras.

Finalmente los resultados obtenidos permiten proponer una serie de modelos de regulación a nivel transcripcional para el gene pac.

INTRODUCCION

Durante los últimos 30 años, los biólogos moleculares han alcanzado grandes logros en la comprensión del proceso hereditario. Con la descripción de la estructura del DNA hecha por James Watson y Francis Crick, los científicos han podido comprender como esa información es duplicada y transferida de generación en generación. Teniendo estas bases consolidadas, descubrimientos recientes han permitido la manipulación de la información genética. En la actualidad resulta posible aislar fragmentos de DNA de un organismo que posteriormente pueden ser incorporados en otro organismo. Esta posibilidad de manipular y transferir información genética de un organismo a otro, es conocida como "Ingeniería Genética" o metodología de DNA recombinante. La ingeniería genética como una nueva metodología dentro de la Biología Molecular, posee una amplia gama de aplicaciones para la resolución de problemas básicos y prácticos relacionados con aspectos naturales. Es importante tener en cuenta que se tiene con esta nueva disciplina una metodología capaz de resolver problemas de varios tipos mediante el diseño de organismos capaces de sobreproducir una serie de compuestos y consecuentemente brindar múltiples beneficios a la humanidad.

Las técnicas de DNA recombinante permiten el aislamiento y propagación de genes específicos, el estudio de su estructura y función, la transferencia a varias especies y algo muy importante, la expresión heteróloga para lograr la síntesis de sus productos. Tal capacidad nos ofrece beneficios reales y potenciales tanto en el área

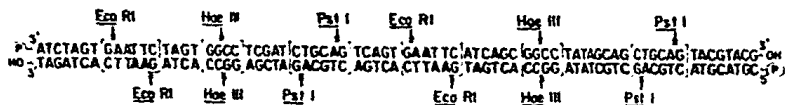
de la investigación básica, como en lo aplicado. Además, aporta herramientas para un mejor entendimiento de la biología básica de organismos superiores e inferiores y promueve grandes avances en la medicina, en la producción de fármacos, en la producción de alimentos y en forma general empieza a revolucionar procesos industriales a través de la biotecnología.

Las técnicas de DNA recombinante fueron desarrolladas a los inicios de los años 70's. Dada la importancia de las técnicas de DNA recombinante y de la necesidad de su empleo para la realización del presente trabajo, a continuación se presentará una breve explicación de éstas.

Con el descubrimiento del DNA como molécula portadora de los caracteres hereditarios, por Avery y sus colaboradores (1), fué cuando se inició la manipulación del DNA in vitro. Avery logró la transferencia de material genético de una cepa virulenta de Streptococcus a otra que no lo era, aislando in vitro el DNA de la primera y poniéndolo en contacto con la segunda. Este tipo de manejo del DNA, al igual que otros con los que se contaban hasta antes de la ingeniería genética, permitía la transmisión de material genético entre bacterias de la misma especie, pero tenía varias limitaciones. Una fué que no era posible seleccionar la región del DNA del organismo donante e introducir en la bacteria receptora, por lo que era necesario buscar entre toda la población de bacterias, aquellas que contenían los marcadores genéticos que se deseaban, lo cual no siempre se podía hacer con relativa facilidad. Además estos primeros intentos estaban limitados a la transferencia de DNA entre organismos de la misma especie.

Fué hasta después de una serie de descubrimientos dentro del área de

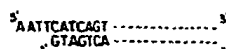
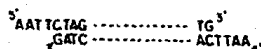
la biología molecular, que se contó con las herramientas necesarias para la manipulación del DNA in vitro en una forma fina y reproducible. Uno de estos descubrimientos, fué el de las enzimas de restricción, las cuales fueron descubiertas gracias a los estudios de interacciones bacteriófago-bacteria por Luria y Human (27). Posteriormente, estas enzimas fueron caracterizadas y purificadas, lo cual permitió su uso como herramienta esencial para la modificación del DNA in vitro. Las enzimas de restricción se dividen en tres clases en base a su estructura y modo de acción. Las enzimas de la clase II son las más utilizadas en experimentos de ingeniería genética, su utilidad radica principalmente, en que reconocen y cortan el DNA en sitios específicos. La enzima reconoce estas secuencias específicas e hidrolizan las uniones fosfodiéster entre dos de sus bases, en cada hélice del DNA, generando fragmentos de DNA. El sitio de reconocimiento es una secuencia que puede ser de 4 o más pares de bases, este sitio tiene la característica de ser en la mayoría de los casos un palíndromo. Una región de DNA es considerada como un palíndromo, cuando su secuencia es idéntica al leerse en las dos cadenas de DNA en dirección 5' a 3'. Algunas enzimas cortan el DNA al mismo nivel en las dos cadenas, otras lo hacen a distintos niveles generándose de esa forma extremos que contienen regiones de cadena sencilla, las cuales son complementarias entre si. Algunos sitios de reconocimiento y tipos de cortes generados se muestran en la figura 1. Las enzimas de restricción permiten la disección de fragmentos grandes de DNA en otros más pequeños. El uso de estas enzimas ha hecho posible el estudio detallado del genoma de organismos procaríotes y eucaríotes y el aislamiento de genes individuales para su estudio posterior



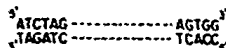
Digestión con *Eco RI*



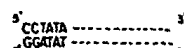
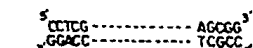
Extremos cohesivos hélice sencilla 5'



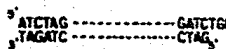
Digestión con *Hae III*



Extremos ranurados



Digestión con *Pst I*



Extremos cohesivos hélice sencilla 3'

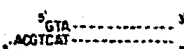
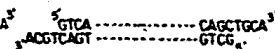


Figura 1. Sitios de reconocimiento y corte para las enzimas de restricción *ECORI*, *HaeIII* y *PstI*. Las flechas indican los sitios de corte de cada una de las enzimas en el fragmento de DNA de doble cadena. En la parte inferior se muestran los fragmentos resultantes de la acción de cada una de las enzimas, así como los extremos generados (14).

(37,38). Los fragmentos generados por la acción de una enzima de restricción, pueden ser estudiados directamente o pueden ser introducidos a una bacteria dónde serán mantenidos.

Sin embargo generalmente un fragmento de DNA no se puede mantener dentro de una bacteria si carece de regiones de replicación específicas. Este problema se ha resuelto con la construcción de vehículos moleculares de clonación. Estos son moléculas de DNA pequeñas, los cuales tienen la propiedad de ser replicadas y transcritas por la maquinaria enzimática de la bacteria huésped. En general el vehículo molecular que se desea usar, es digerido con la misma enzima de restricción que se utilizó para el aislamiento del fragmento de DNA, o con una enzima que deje extremos compatibles para la unión. Sólo es posible la unión covalente, si se utiliza la enzima ligasa, la cual forma enlaces fosfodiéster en cada uno de los extremos.

Una vez que se tiene la molécula de DNA recombinante, es necesario introducirla a una bacteria donde pueda ser mantenida por replicación. Esto se logra por medio del proceso de transformación. Este consiste en la adquisición de DNA del medio externo por una bacteria, el cual es integrado en el cromosoma bacteriano o es mantenido como plásmido. En Escherichia coli la transformación no ocurre en forma natural, sin embargo existen métodos para lograr la transformación de Escherichia coli artificialmente. Estos consisten en la modificación de las membranas celulares con sustancias químicas, las cuales la hacen más permeable a la entrada del DNA. Una vez que el vehículo molecular entra a la bacteria, es replicado, y junto con él, el DNA que le fue ligado (10,29). En la figura 2 se muestra un esquema general de clonación de DNA. De esta forma es posible obtener cantidades

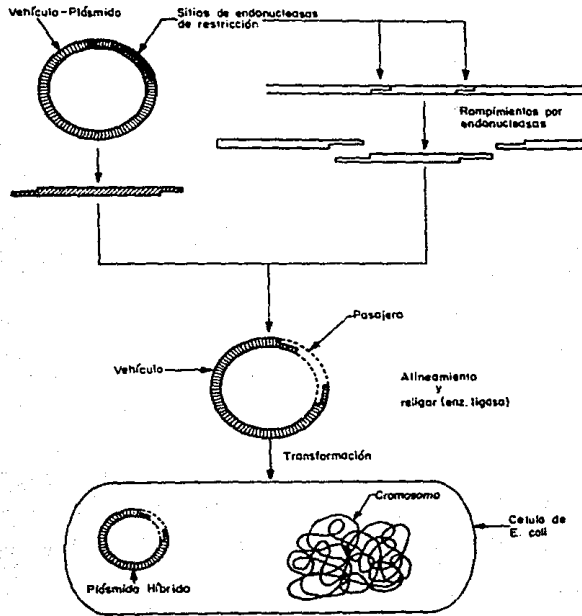


Figura 2. Esquema de los procedimientos utilizados en un experimento de DNA recombinante. El vehículo, en este caso un plásmido, y el DNA heterólogo que se desea clonar, son digeridos con una endonucleasa de restricción específica. Esta digestión genera moléculas de DNA con extremos idénticos que, en presencia de la enzima ligasa de DNA, se unen covalentemente. La molécula híbrida o recombinante puede introducirse en la bacteria *E. coli* por el mecanismo de transformación.

importantes del fragmento de DNA que se introdujo en el vehículo, lo cual permite su caracterización física.

El propósito principal que lleva a los científicos al empleo de estas técnicas de DNA recombinante, es el estudio de la estructura del gene y su función. En base a lo anterior los productos de los genes pueden ser recuperados con una mayor pureza o en cantidades elevadas. Dado lo fascinante de este campo es evidente el incremento de la literatura describiendo nuevos aspectos de la regulación genómica, de la organización del genoma procarionte y eucarionte, así como la síntesis de proteínas vía bacteriana.

Objetivos

En nuestro laboratorio se ha venido trabajando con el gene que codifica para la enzima acilasa penicilánica (PA) de Escherichia coli ATCC11105. Esta enzima cataliza la hidrólisis de la penicilina G, dando como productos ácido fenilacético y ácido 6-amino-penicilánico (conocido como 6-APA) (Fig.3). El 6-APA forma el núcleo a partir del cual se pueden obtener las penicilinas semi-sintéticas, entre ellas la ampicilina, las cuales tienen ventajas terapéuticas sobre su precursor, la penicilina G (26). Aunque el 6-APA puede ser producido mediante métodos químicos, la obtención de ampicilina vía la hidrólisis de la penicilina G resulta más económica si se emplea el método enzimático (46).

En el laboratorio se ha aislado y secuenciado este gene. Así mismo se han definido las regiones de regulación del gene localizadas en la región 5'.

El objetivo principal de esta tesis fue aportar mayor información relacionada con la regulación de la expresión de este gene.

Por ello, se decidió enfocar el esfuerzo en definir el posible papel biológico de regiones de DNA localizadas en la vecindad del promotor funcional del gene pac, que tuvieran funciones de posibles "operadores", o regiones de control negativo. La evidencia para proponer esta hipótesis, se basa en los trabajos de Mayer, et al. donde se postula una regulación negativa mediada por el ácido fenilacético, y en los datos experimentales del laboratorio del Dr. Bolivar, que muestran estar de acuerdo con esta hipótesis. Así mismo, parte del esfuerzo se canalizó para hacer un estudio de comparación, a nivel de secuencias de aminoácidos, de la región de la

PA no madura, que permite su exportación al espacio periplásmico, con otros péptidos de exportación de otras proteínas.

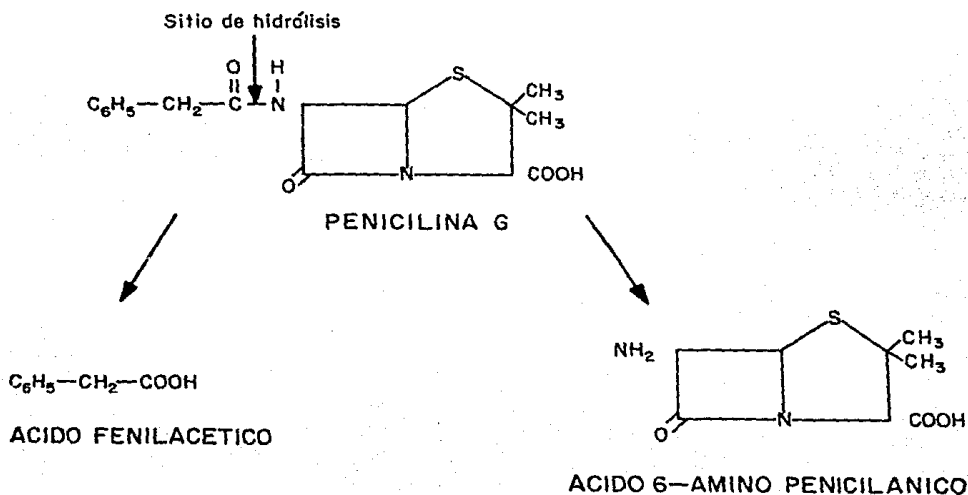


Figura 3. Hidrólisis de la penicilina G por la acción de la enzima penicilino acilasa. La flecha indica el sitio de corte por parte de la enzima. Los productos de la reacción son el ácido fenilacético y el ácido 6-amino penicilánico, este último es el que forma el núcleo a partir del cual se producen las penicilinas semisintéticas a nivel industrial.

ANTECEDENTES

La bioconversión de antibióticos por vía microbiana puede ser variable ya que se pueden obtener desde reacciones indeseables, hasta reacciones bien definidas y controlables. Muchas de estas bioconversiones tienen como resultado la inactivación o degradación de antibióticos. Sin embargo, también se logran obtener compuestos de utilidad, los cuales pueden ser utilizados para la producción de antibióticos semi-sintéticos o nuevos antibióticos análogos.

La bioconversión de penicilinas en ácido 6-amino-penicilánico (6-APA) es un ejemplo claro de la importancia de estos procesos, ya que el 6-APA es el compuesto inicial para la producción a nivel industrial de penicilinas semi-sintéticas, las cuales poseen una mayor efectividad clínica comparada con la penicilina natural. La importancia comercial del 6-APA para la producción de penicilinas semi-sintéticas ha llevado al estudio más detallado y aplicado de la PA. Hoy en día el 6-APA se produce químicamente o por vía enzimática por medio de la hidrólisis de las penicilinas G o V. Existen publicaciones en las que se reporta actividad de la enzima PA en varios tipos de bacterias, de actinomicetos y algunas levaduras (9).

Dadas estas perspectivas, resulta de gran interés el realizar estudios más detallados sobre la PA de Escherichia coli. Los estudios hechos hasta ahora se han enfocado en la regulación de la producción de esta enzima.

En relación con la enzima PA, los estudios realizados por otros grupos han demostrado, entre otras cosas, que la enzima madura se localiza en espacio periplásmico en Escherichia coli. Para alcanzar su forma madura es necesario una serie de cortes proteolíticos. La enzima PA es procesada a partir de un péptido precursor de 97.5-KD el cual sufre una serie de cortes proteolíticos que implican la formación de dos subunidades de 20.5 y 69-KD respectivamente (3,4,40). Para ciertas enzimas y hormonas de organismos eucariontes uno o más cortes proteolíticos son necesarios para obtener la actividad final. Al parecer, este tipo de procesamiento de la PA de Escherichia coli ATCC11105 corresponde al único caso descrito hasta el momento en algún organismo procarionte (3,4,33).

El polipéptido precursor lleva consigo un pequeño péptido, conocido como péptido señal (26 residuos), en su extremo amino-terminal. Este péptido señal debe estar presente en proteínas donde el péptido precursor necesita ser reconocido como un péptido de excreción y así poder transportar el péptido completo a la membrana. En Escherichia coli se han descrito dos enzimas capaces de remover al péptido señal, conocidas como SPAsaI y SPAsaII (32). La primera se encarga de procesar al péptido señal de la mayoría de las proteínas de excreción, mientras que la SPAsaII remueve al péptido señal de las lipoproteínas. Por lo general los péptidos señal no son muy grandes, comprenden de 15 a 30 amino ácidos. En ciertos casos se ha dicho que estos péptidos señal (ausentes usualmente en la proteína madura), son característicos de precursores de proteínas periplásmicas (19).

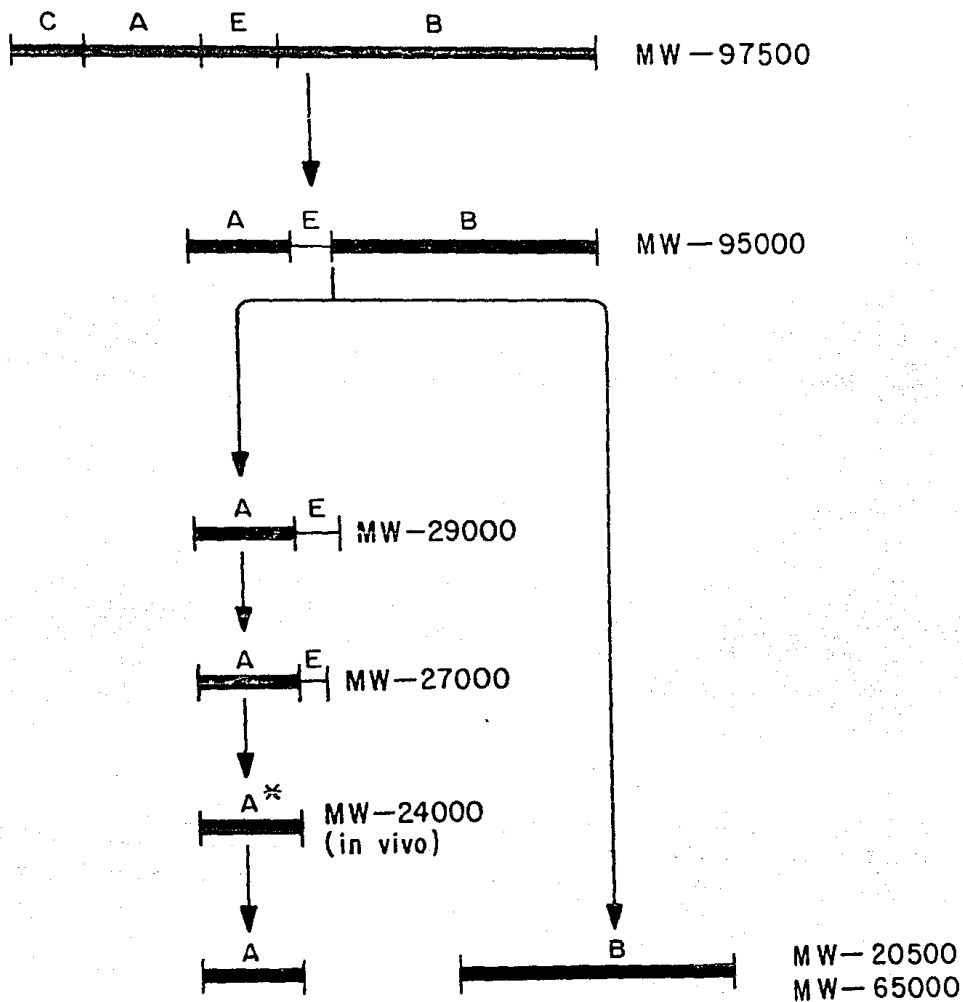


Figura 4. Ruta de procesamiento del péptido precursor de la penicilino acilasa. A y B representan a la subunidad pequeña y grande de la enzima, mientras que E corresponde al péptido espaciador. S representa al péptido señal.

En estos péptidos se distinguen tres zonas:

- Una región (cercana al amino terminal) con amino ácidos de tipo básico.
- Una segunda región que presenta amino ácidos hidrófobos.
- Una tercera región formada por amino ácidos no cargados flanqueando la región hidrófoba.

Además en el sitio de corte o en su vecindad es usual la presencia de residuos de alanina (19).

El resto del procesamiento se lleva a cabo mediante dos cortes proteolíticos adicionales necesarios para que se procese el péptido precursor y se tengan las dos subunidades, correspondientes a las subunidades de 20.5 y 69-KD respectivamente. Se ha reportado que en la vecindad al sitio de corte que produce a la subunidad B se localiza la secuencia: Leu-Ala-Gli, identificada como necesaria para que la enzima SPAsaII procese a las lipoproteínas (32). Por otra parte, se ha observado la presencia de un péptido involucrado en el procesamiento de la subunidad pequeña. Este péptido, conocido como péptido espaciador o conector está situado entre las dos subunidades y al parecer es removido post-traduccionalmente sugiriendo un segundo corte proteolítico originando a la subunidad de 20.5-KD (fig.4).

Estos estudios han arrojado una serie de datos que nos muestran la complejidad de la organización y regulación del gene que codifica para esta enzima (el gene pac).

Existen una serie de factores que intervienen en la regulación del gene pac a nivel transcripcional (13).

Antecedentes sobre la regulación del gene pac sugieren que son varios los factores que intervienen en esta regulación.

Algunos de estos factores son :

- a) regulación a través de molécula(s) represora(s).
- b) regulación a través del complejo CRP-AMP cíclico.
- c) regulación a través del ácido fenilacético.
- d) temperatura.
- e) niveles de oxígeno.
- f) fases de crecimiento.
- g) composición del medio.

Dentro de los factores que regulan la expresión del gene *pac*, vemos que el ácido fenilacético ha sido identificado como el inductor del gene de la PA (46,48). Cuando se añade al medio de cultivo, el ácido fenilacético ocasiona un incremento de 4 a 5 veces de la síntesis de la enzima. Estos niveles se alcanzan cuando el ácido fenilacético se encuentra en una concentración de 0.1%. A concentraciones mayores este ácido resulta ser inhibitorio para el crecimiento de las bacterias. Además, es importante comentar que en *Escherichia coli* la presencia de glucosa reprime totalmente la producción de PA (41,43). Este tipo de represión catabólica que sufre el gene *pac*, en *Escherichia coli* está sustancialmente dirigida por el AMP cíclico (cAMP) y ocurre a nivel transcripcional (13).

En cuanto a la temperatura podemos decir que la producción óptima de la enzima oscila entre 25 y 30 °C, no siendo esta temperatura, la óptima para el crecimiento del microorganismo. En el caso específico de *Escherichia coli* su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C en la cual se produce menor cantidad de enzima. Con respecto a la cantidad de oxígeno necesario para la producción de la PA, podemos

decir que ésta se sintetiza en condiciones de aereación moderada. También se ha observado que cuando la fermentación se lleva a cabo en condiciones de baja aereación, la producción de enzima es mayor. En relación con lo anterior se ha reportado (48) que para Escherichia coli la síntesis de la enzima puede ser totalmente reprimida por el incremento en la concentración de oxígeno disuelto (26).

Se han hecho intentos por modificar a la cepa productora de PA, con el fin de aumentar su capacidad productora. La estrategia que ha dado mejores resultados ha sido la clonación molecular del gene de PA.

Una vez presentada en términos generales, como se lleva a cabo la regulación de este gene es importante adentrarnos en los antecedentes relacionados con el estudio detallado de la región reguladora del gene pac.

Por una parte, la clonación del gene que codifica para la enzima acilasa penicilánica ha permitido caracterizar con detalle este gene. Además en el laboratorio del Dr. Bolivar se determinó parcialmente la secuencia nucleotídica (47), y recientemente se ha publicado la secuencia completa (41). La figura 5 muestra la secuencia nucleotídica correspondiente a dicha región donde se han podido identificar toda una serie de elementos de control que nos hacen pensar en diversas formas de regulación para la expresión del gene pac (46).

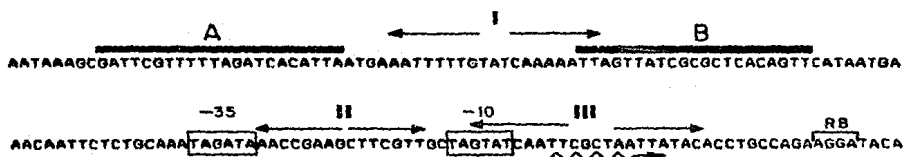
En relación con los trabajos de clonación, se ha demostrado que la región codificadora del gene pac se localiza entre los sitios de restricción HindIII y SmaI en el plásmido pPA2. (fig.6).

Aislado el gene y conociendo la secuencia nucleotídica, se determinó el sitio de inicio de la transcripción del gene pac por medio de un

GGGTTACGCAGGGAGGATGTGAGTGAACATATGGCGCCGTGTTGC AAAATGCTGCCTGTCTG

GATTCGAAAATTGCTACAAAATCCAACCATAAAAGTCBTTTACAACATATTTTTCTGATTTACATACAGATAATGACCTG

AGCTGTCTCTCTGGGGTTCATCATCTATGCTCCGGGGATCTGTCCAAAAAGGAATAGAAAACAAAATCATCAGCGGTG



ATG AAA AAT AGA AAT CGT ATG ATC GTG AAC TGT GTT ACT GCT TCC CTG ATG TAT TAT TGG
Met Lys Asn Arg Asn Arg Met Ile Val Asn Cys Val Thr Ala Ser Leu Met Tyr Tyr Trp

Figura 5. Secuencia nucleotídica de la región de regulación del gene *pac* (14). Se presentan 381 pares de bases anteriores al codón de inicio ATG de la región de control del gene *pac*. Las dos líneas gruesas sobrepuestas en la secuencia (A y B) indican dos sitios putativos de unión a CRP. La línea punteada indica la zona en la cual el oligonucleótido hibridizó en el experimento de extensión de primer. Las flechas con los números romanos muestran secuencias palindrómicas. Indicados están, el promotor funcional, el sitio identificado de inicio de la transcripción (~~~~~) y el posible sitio de unión a ribosoma (RB).

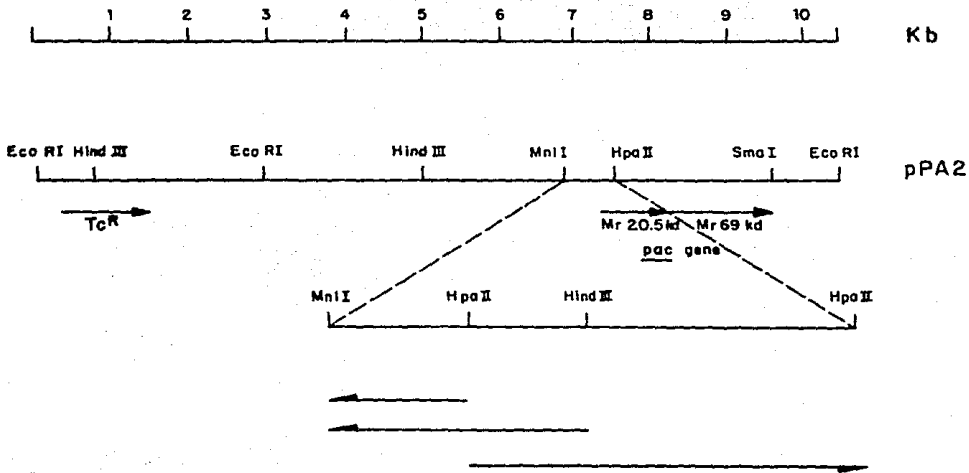
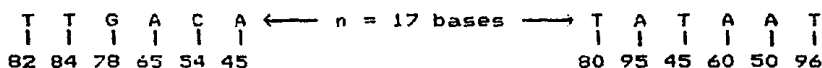


Figura 6. Estrategia de subclonación y de secuenciación de la región de regulación del gene *pac*. También se muestra un mapa de restricción parcial del plásmido pPA2, donde se aprecian los sitios relevantes del gene *pac*, el tamaño y orientación, la resistencia a tetraciclina y la región que abarca el gene *pac* (47).

experimento de extensión de primer, sintetizando un oligonucleótido de 21 bases, siguiendo el método de fosfodiéster sobre fase sólida. La secuencia fué escogida tomando en cuenta una región del RNA mensajero que se encontrará entre 100 y 200 bases a partir del probable inicio de la transcripción. Una vez hibridizado, la enzima transcriptasa reversa actúa, sintetizando el DNA complementario al RNA mensajero. El RNA fué aislado de *Escherichia coli* ATCC11105 llevando consigo al plásmido pPA2 crecido en 0.1% de ácido fenilacético. En la figura 5 se muestra la región alrededor de dónde se determinó el inicio de la transcripción.

Ahora bien, por lo general los genes que intervienen en una determinada vía metabólica, están agrupados en operones o en unidades transcripcionales. Cada operón tiene por lo menos un promotor, permitiendo el inicio de la transcripción en forma coordinada de todos los genes que lo conforman. En algunos casos se han localizado promotores dentro de las unidades de transcripción, los cuales permiten la expresión diferencial de ciertos genes que la constituyen. Un promotor es una región en el DNA que abarca aproximadamente 40 pares de bases, correspondientes a una región de DNA involucrada en el pegado o en la unión de la RNA polimerasa para el inicio de la transcripción. A partir de la secuencia de 168 promotores, se ha determinado una secuencia consenso, tomando en cuenta las bases que se conservan con mayor frecuencia. Se sabe que esta secuencia consenso es la que tiene la mayor afinidad por la RNA polimerasa.

La secuencia consenso es:



dónde los valores, representan el porcentaje de aparición en los promotores analizados. Estas secuencias se localizan aproximadamente a 35 y a 10 pares de bases antes del inicio de la transcripción, respectivamente (25).

En los genes que responden a una regulación por niveles de AMP cíclico, sujetos a un control positivo, se ha reportado la presencia de uno o más sitios de unión para la molécula CRP ("Catabolite Repressor Protein"). Esta proteína funciona como activador de la transcripción en varios genes de Escherichia coli, facilitando la unión de la RNA polimerasa al DNA. Cuando hay glucosa disponible o alguno de sus derivados, la concentración de AMP cíclico no es suficientemente elevada como para saturar a la molécula de CRP. Por sí misma, la molécula de CRP no es capaz de jugar un papel activador. Sólo cuando toda la glucosa del medio ha sido depletada entonces los niveles de AMP cíclico se elevan formando el complejo CRP-AMP cíclico el cual se une al DNA en una región específica y fomenta el inicio de la transcripción. La secuencia consenso para el sitio de unión a CRP es:



Los sitios de unión para CRP es posible localizarlos en las dos cadenas del DNA. La distancia de estos sitios al inicio de la

transcripción ha sido reportada desde 107 hasta 36 pares de bases. En algunos genes, pueden estar presentes dos sitios de unión a la molécula de CRP. Normalmente uno de los dos posee menor afinidad ya que no se acerca tanto a la secuencia consenso. Se piensa que el sitio secundario tiene la función de agrupar a la proteína CRP con el fin de lograr una mayor concentración de la misma en la vecindad del sitio funcional de unión a CRP. En algunos casos CRP puede funcionar como represor, cuando al interaccionar con el DNA, bloquea la unión de la RNA polimerasa, como es el caso del gene de galactosa (21,36).

Otro dato importante que se ha obtenido del estudio de genes regulados por CRP es el siguiente: la región -35 de los promotores de estos genes, se aleja de la secuencia consenso, y además, en algunos casos la región -10 es poco parecida a su correspondiente consenso. Esto se explica tomando en cuenta que la función de CRP es la de estimular la transcripción, por lo tanto no tendría sentido que un promotor fuerte tuviera un sitio de unión a CRP, ya que la función de este último como activador de la transcripción no sería significativa (11,25).

La represión catabólica ofrece a la célula la posibilidad de utilizar glucosa preferentemente, pero también le otorga la facilidad de adaptarse rápidamente a la ausencia de ella.

A falta de glucosa la célula comenzará a sintetizar enzimas específicas que son capaces de aprovechar otros compuestos energéticos en el momento en que éstos estén presentes en el medio. Esta síntesis de enzimas se hará dependiendo de la accesibilidad de estos compuestos inductores en el medio. Este mecanismo resulta ser muy versátil dado que la célula puede escoger en función del mejor inductor presente en ese momento en el medio, para así tener la inducción del operón catabólico.

Dentro del genoma bacteriano se han podido observar distintos niveles de regulación. Enfocándonos en la región de control o región reguladora, nos encontramos con un grupo de secuencias nucleotídicas que pudieran tener relación con moléculas específicas, como pudieran ser los represores. Estas secuencias nucleotídicas son específicas y se denominan operadores.

Como se dijo anteriormente, en base al análisis de la región de control y del posible modelo de regulación del gene *lac*, surge el interés en avocarnos a un estudio un poco más detallado sobre operadores en general, tomando ejemplos de operadores funcionales ya reportados, como pudieran ser los operadores de los operones *lac* y *gal* entre otros. Con este estudio se piensan obtener criterios generales sobre operadores y poder confrontarlos con los tres posibles operadores del gene *lac* (ver resultados) para finalmente tratar de deducir el o los operadores funcionales.

Un operador se define como aquella región del DNA que es reconocida por una molécula denominada represora cuya función principal es la de impedir la transcripción. El bloqueo de la transcripción se debe a que el represor posicionado sobre el operador impide estéricamente que la RNA polimerasa reconozca a su promotor como se muestra en la figura 7, o bien impide, aun cuando la RNA polimerasa haya iniciado la transcripción, que se complete la transcripción del gene. Este complejo operador-represor se dice que ejerce un control negativo sobre la expresión del gene ya que reprime su transcripción. Por otro lado resulta claramente distinto al sistema de control positivo o de represión catabólica antes mencionado. A continuación se darán una serie de datos generales relacionados tanto con operadores como con

CONTROL NEGATIVO

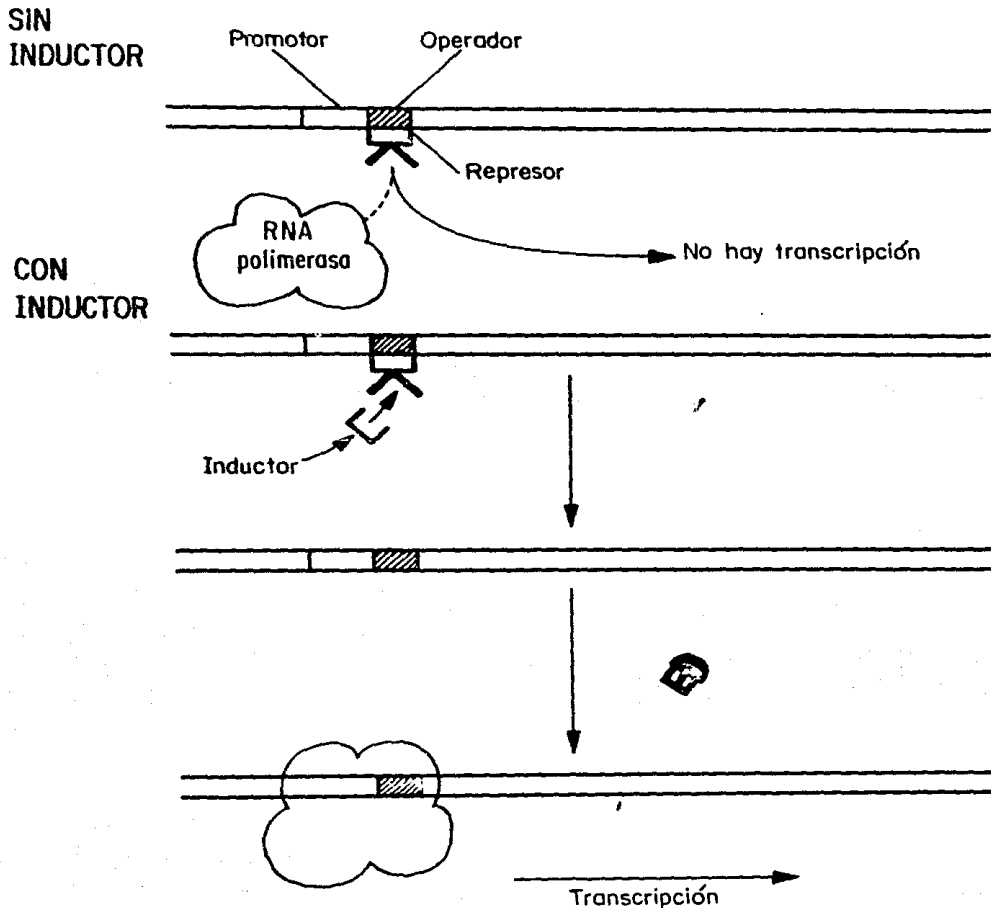


Figura 7. Dos tipos de efectores intervienen en este tipo de regulación: el inductor y el represor. Algunas proteínas represoras se unen al DNA en su forma nativa. Sin el inductor, el represor se pega a su respectivo operador. Lo cual impide el acceso de la RNA polimerasa a la región del promotor y la síntesis de RNA mensajero no puede llevarse al cabo. Cuando un inductor está presente (ácido fenilacético para el caso del gene *lac*), se forma un complejo inductor-represor, que implica un cambio conformacional en el represor impidiendo su unión al DNA. Como consecuencia, el represor no es funcional y la región del promotor se vuelve accesible para la RNA polimerasa.

moléculas represoras, para después citar ejemplos de sistemas donde interviene el complejo operador-represor en la regulación.

Para que un represor o una molécula represora ejerza su papel en la regulación se necesitan varios eventos:

- i) El sitio de reconocimiento (operador) debe estar posicionado adecuadamente.
- ii) Que sea accesible conformacionalmente al represor.
- iii) La interacción entre represor-operador sea lo suficientemente fuerte para impedir el inicio de la transcripción.
- iv) Que la molécula represora no haya tenido ningún cambio conformacional por medio del pegado de molécula(s) inductora(s).

Dadas las características antes mencionadas para el funcionamiento de un represor, expondremos ahora generalidades de los operadores.

Los operadores generalmente se localizan en regiones muy cercanas al sitio de inicio de la transcripción. Un operador tiene una longitud (entendiendo longitud como el número de bases dentro de la secuencia del DNA) de 10 a 12 bases, siendo esta cifra variable como veremos más adelante. Esta secuencia es la responsable de la interacción con el represor. Los operadores pueden localizarse en otros sitios, como regiones estructurales por ejemplo. La secuencia del operador es muy específica pero hay casos en los que secuencias más largas repercuten en un pegado más fuerte por parte del represor. El operador posee una característica única para el reconocimiento : la secuencia nucleotídica correspondiente al operador conforma una simetría conocida como secuencia palindrómica. Se trata de una secuencia de DNA que leída de 5' a 3', en una de las dos cadenas, resulta ser igual a la complementaria; consiste en lo que se conoce con el nombre de

secuencias repetidas invertidas. En ciertos casos se ha visto que la simetría no es perfecta y la interpretación que se da de este fenómeno es que no todas las bases de un lado del palíndromo interactúan con el represor. Estudios hechos en base a mutantes han demostrado que el represor se pega en regiones del DNA tanto simétricas, como no simétricas, considerando estas últimas como palíndromos imperfectos (15,25).

Retomando un poco los sitios de unión del complejo represor-operador, éstos resultan ser específicos y portadores de dos componentes básicos: el primero tiene que ver con interacciones electroestáticas con los esqueletos de fosfato del DNA. El segundo se refiere a la interacción sitio específico resultante de la matriz de donadores y aceptores de puentes de hidrógeno localizados en porciones definidas de la doble hélice del DNA. Así, esta matriz interactúa con un conjunto de donadores y aceptores de puentes de hidrógeno complementario a la superficie de la proteína represora y específico para cada represor (42).

Teniendo como base las generalidades antes mencionadas pasaremos a la presentación de un conjunto de ejemplos que pretenden ampliar un poco más la visión del complejo represor - operador tratando de enfatizar en este último.

El ejemplo más citado en la literatura relacionado con la interacción represor - operador es el del operon lac de Escherichia coli. En esta bacteria como en todo procarionte parte de la regulación genética se lleva a cabo a nivel transcripcional, por lo que los primeros estudios sobre mecanismos de control, se avocaron a la purificación y caracterización de la proteína represora lac.

El operon lac está regulado por control negativo. El operador lac presenta una secuencia palindrómica cuyo eje de simetría central está representado por un par G - C. Se ha demostrado experimentalmente que una de las mitades del palíndrome reconoce a una de las dos subunidades del represor lac. Además la simetría del operador con un par G - C central se acentúa a través de dos secuencias: 5' G - T - G 3' y 3' C - A - C 5' localizadas dentro del palíndrome a una distancia de 34 Å. Por otra parte, se ha visto que en los residuos 16 y 25 del represor hay formación de una estructura α - Hélice, la cual al parecer interactúa con la secuencia nucleotídica del operador en la región correspondiente a un surco mayor. Retomando la secuencia palindrómica, se ha podido comprobar que para la cepa silvestre de E. coli la secuencia correspondiente al operador resulta ser un palíndrome imperfecto. Estudios recientes han mostrado que el operón lac de E. coli posee dos sitios más de pegado a represor (44). El "segundo operador" está situado al inicio del primer gene estructural lacZ mientras que el "tercer operador" se localiza al final del gene represor lac justo adelante del locus del promotor lac. Estos dos "pseudo-operadores" se sitúan 370 y 85 pares de bases, respectivamente, después del operador primario y el pagado por parte del represor lac, disminuye o resulta ser menos eficiente de 10 a 100 veces en relación con el operador primario. Experimentos in vitro mostraron que el segundo operador tiene un pequeño efecto estimulador en el pegado al operador primario por parte del represor (12,43,44). Retomando un poco el concepto de regulación, recordamos en general que las moléculas represoras actúan exclusivamente en la prevención del inicio de la transcripción. También se piensa que los operadores se

localizan en regiones del DNA que sobreponen en muchas ocasiones al promotor (es decir, entre las posiciones -10 y -35 en relación con el inicio de la transcripción).

Sin embargo, dentro de las generalidades antes mencionadas existen excepciones. Tanto para el operón de *lac*, como para el de *gal* se han identificado secuencias adicionales correspondientes a posibles operadores. Experimentos recientes han demostrado efectivamente que el pegado del represor *lac* al operador interfiere eficientemente en el inicio de la transcripción. Pero el punto importante se presenta con los datos que demuestran que el complejo represor - operador de *lac*, localizado distalmente a la secuencia del promotor puede directamente interferir en la expresión del gene a través de un eficiente evento de terminación de la transcripción (12). Lo anterior nos hace pensar en las posibles funciones de los operadores localizados fuera de la región de regulación primaria. Finalmente se puede decir que estas propiedades pueden jugar un papel muy importante en el contexto de tener una regulación mucho más fina de la expresión genética a nivel transcripcional y pudiera considerarse como un cierto tipo de atenuación. Lo anterior resulta interesante ya que abre un nuevo horizonte en el estudio de genes que poseen más de una secuencia palindrómica correspondiente a un posible operador en regiones comprendidas entre el +50 y +400 (12,44).

Un modelo distinto pero que también tiene un interés especial es el que presenta el operón *gal*. Mediante estudios a nivel genético y a nivel de secuencia nucleotídica mediante mutaciones cis-dominantes, se pudo mostrar la existencia de dos operadores necesarios para la represión de *gal* en el operón *gal* de *E. coli*. El primero, O_E , se

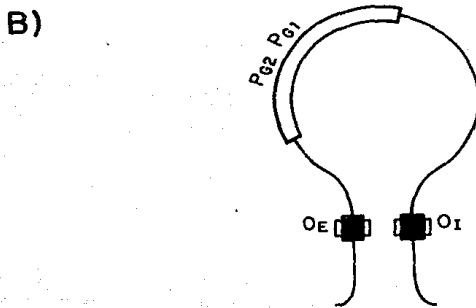
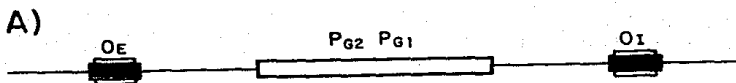
localiza inmediatamente después de los dos promotores de gal, alrededor del -60 en relación con el inicio de la transcripción para el promotor P. El segundo operador, O₁, se encuentra dentro del primer gene estructural. Haciendo una comparación entre las dos regiones O_E y O₁ a nivel de secuencia se puede observar que de 15 pares de bases que conforman a cada operador, 12 son idénticas. Lo cual implica una alta homología a nivel de secuencia nucleotídica entre ambos operadores. Cada operador posee una simetría en cuyo centro aparece el par G - C. El palíndromo correspondiente a O_E es mejor al de O₁. Dado que el represor activo de gal forma un dímero, resulta plausible que los palíndromos reconozcan esta forma dimérica de la proteína represora (21,28).

Dados los antecedentes anteriores, para que se dé un control negativo, el operón gal requiere que la molécula represora se pegue a ambos operadores, O_E y O₁, separados por más de 90 pares de bases. En base a la presencia de estos dos operadores surge la pregunta en el sentido de cual pudiera ser la función de un segundo operador. Adhya y Majumdar (28) en investigaciones recientes proponen tres posibles modelos:

i) Enmascaramiento Estérico: En este modelo sólo uno de los dos sitios resulta ser el operador funcional. De esta forma el represor oculta estéricamente el sitio de pegado de la RNA polimerasa. Por su proximidad con los promotores de gal, el operador O_E extragenético resulta ser el candidato más atractivo para fungir como operador (esquema A).

ii) Cambios conformacionales del DNA: Se forma un complejo entre el represor y el operador O_E y a su vez entre el represor y el operador O₁.

Estas interacciones inducen a la formación de un doblamiento en el DNA que además incluye la región de los promotores. En este modelo, el cambio conformacional que sufre el DNA provoca un cambio en la región del DNA correspondiente a los promotores impidiendo así el acceso a la RNA polimerasa (esquema B).



iii) Sitio de entrada de la RNA polimerasa: El sitio de entrada de la RNA polimerasa para los promotores *gal* se localiza fuera del segmento de DNA correspondiente a $O_E - O_I$. Sin embargo, en este modelo la

ocupación de ambos sitios O_E y O_I , los cuales no se superponen con los promotores, a través del represor se bloquea rápidamente el acceso de la RNA polimerasa (28).

Los modelos anteriores pretenden evidenciar que no existe un modelo universal de regulación y que los elementos de regulación de un gene u operón de un organismo procarionte, pueden ser variados. Lo cual implica la posibilidad de tener distintos niveles y tipos de regulación.

Por último, otra región identificada y de importancia en la organización del genoma bacteriano es la del sitio de inicio de la traducción de los RNA mensajeros. Esta región interacciona con el extremo 3' del RNA ribosomal 16S. Su secuencia nucleotídica, así como su distancia del codón de inicio tiende a conservarse en casi todos los genes estudiados en procariontes. La secuencia de las primeras once bases del extremo 3' del RNA ribosomal es la siguiente:

3' A U U C C U C C A C U 5'

Los RNA mensajeros son complementarios con esta secuencia a su extremo 5' en forma parcial generalmente (45).

De esta forma se presentaron los elementos básicos que intervienen en la regulación de un gene de tipo procarionte. Teniendo estas bases se pretende ahora introducir con mayor especificidad el estudio de la regulación del gene *pac*.

El gene que codifica para la PA representa un reto interesante desde el punto de vista de la investigación básica y tecnológica, por lo que se decidió realizar un estudio sobre los posibles elementos que intervienen en la regulación de su expresión a nivel de la transcripción.

El estudio que se presenta en esta tesis, incluye también el análisis de la proteína en su extremo amino terminal. Este estudio se enfocó al análisis de la secuencia de amino ácidos correspondientes a lo que se ha propuesto como el péptido señal de la proteína necesario para la traslocación a espacio periplásmico.

La siguiente parte del estudio contempló el diseño de experimentos que puedan aportar más conocimientos sobre la regulación del gene *pac*. La idea principal, fué la de sub-clonar la región reguladora, en base a técnicas de DNA recombinante y así verificar, una vez en la cepa de Escherichia coli si esta región es capaz de "titular" al represor o al activador del sistema de regulación. Partiendo de esta idea se plantearon 3 posibles hipótesis. La primera intentó demostrar la inducción del gene en cromosoma. La segunda, tiene que ver con la inducción del gene presente en el cromosoma, por la presencia de plásmidos multicopia llevando la región reguladora del gene *pac*. De ser cierta esta hipótesis resultaría probable la presencia de un tipo de control negativo. Finalmente, como tercera hipótesis, si se lograra una expresión constitutiva baja del gene, y si se pudiera incrementar añadiendo en el medio el inductor, es decir al ácido fenilacético, podríamos intuir la presencia de ambos tipos de controles de regulación para el gene *pac*.

En base a los resultados obtenidos en cuanto a que el gene *pac* pudiera regularse en parte por un control negativo, se realizó un estudio de los elementos que pudieran intervenir en este tipo de regulación de este gene. Por último, partiendo de antecedentes bibliográficos, se intentó comprender la estructura de los operadores y su interacción con moléculas reguladoras. Se plantearon un conjunto de criterios que servirán para llevar al cabo un estudio más detallado de los posibles operadores del gene que codifica para la enzima PA.

En la discusión de esta tesis se analizan los resultados obtenidos y se plantea un posible modelo de la regulación a nivel transcripcional de este gene.

Material y Métodos

Materiales

I- Reactivos

Los reactivos y las casas proveedoras fueron los siguientes:

Endonucleasas de restricción: Bethesda Research Laboratory, USA.

Agarosa, resina Dowex 50X-X8, dodecil sulfato de sodio (SDS), y Temed (tetrametiletilendiamida): Bio-rad Laboratories, USA.

Agar bacteriológico, peptona de caseína (casaaminoácidos) peptona de caseína purificada (triptona): Difco, USA.

Íoduro de propidio: Calbiochem Laboratories, USA.

Extracto de levadura, Tris (hidroximetil aminometano), urea: Merk de Mexico

Aceite mineral, bromuro de etidio, cloruro de cesio, RNAasa y lisozima: Sigma de Mexico.

J. T. Baker: los demás reactivos.

II- Medios de Cultivo

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento celular, así como el medio necesario para la realización del bioensayo son los siguientes:

Medio Luria:	Triptona	10 gr.
	Extracto de levadura	5 gr.
	NaCl	10 gr.
	NaOH 2.5 N	1 ml.
	Agua Bidestilada	1 lt.

Medio M9:	Na HPO	6 gr.
	KH PO	3 gr.
	NaCl	0.5 gr.
	NH Cl	1 gr.

Antibiótico	Medio Líquido	Medio Sólido
Tetraciclina	15 µg/ml	30 µg/ml

III- Cepas Bacterianas y plásmidos.

Escherichia coli HB101 K-12 (F⁻, hsdS20 (r⁻, m⁻), recA13, ara-14, proA2, lacY1, gal K2, rps L20, (Sm), xyl-5, mtl-1, supE44, lambda⁻).

Escherichia coli ATCC11105 (PA⁺).

Plásmido pPA2 (33).

IV- Condiciones para la digestión de DNA con Endonucleasas de Restricción.

Las condiciones de reacción de las endonucleasas de resticción, se han estandarizado para usar sólo tres buffers diferentes en lugar de uno distinto para cada enzima. Los buffers son:

	NaCl	Tris pH 7.4	MgSo	DTT
Buffer ALTO	100 mM	50 mM	10 mM	0
Buffer MEDIO	50 mM	10 mM	10 mM	1 mM
Buffer BAJO	0	10 mM	10 mM	1 mM

Por lo general la mayoría de las reacciones se llevan al cabo a 37 °C.

Enzimas utilizadas:

	Buffer ALTO	Buffer BAJO
AsuII		*
BglII	*	
EcoRI	*	

En algunos casos, se pueden hacer digestiones dobles en el mismo buffer aunque se pierda un poco la actividad de la enzima que no se usa en su buffer óptimo.

Ligasa T4. Esta enzima como su nombre lo indica es utilizada para las reacciones en las que se quieren ligar fragmentos de DNA previamente digeridos con alguna enzima de restricción.

Incubar a 4 °C cuando los extremos a ligar son rasurados y a 12 °C cuando son cohesivos, con buffer ligasa durante 12 o más horas.

Métodos

I- Transformación de cepas de *Escherichia coli*.

Inocular 3 ml de medio Luria con la cepa deseada e incubar toda la noche a 37 °C, con agitación constante (200 r.p.m.), a menos que la cepa requiera otra temperatura. Al siguiente día inocular un matraz de 150 ml con 30 ml de medio Luria e incubar con agitación hasta que llegue a una densidad de 0.4 a 595 nm. Centrifugar a 10000 r.p.m. (10 K) durante 5 min. en un tubo estéril. El sobrenadante se decanta y el precipitado se resuspende con 15 ml de NaCl 10 mM frío y estéril. Centrifugar igual que en el caso anterior y resuspender el precipitado suavemente en CaCl 30 mM. Dejar en hielo durante 20 min. y

centrifugar de nuevo durante 10 min. a 5 K. Resuspender en 3 ml de CaCl 30 mM. Tomar 0.2 ml y pasar a un tubo estéril, agregar 0.1 µgr de DNA en 0.1 ml de CaCl 30 mM. Incubar en hielo 1 hora. Dar un pulso a 42 °C durante 70 seg. exactos y pasar las células a hielo 5 minutos más. Agregar 3 ml de medio Luria e incubar con agitación a 37 °C de 1 hora a 1 hora y media. Finalmente, platear 0.2 ml en caja petri con medio sólido con el antibiótico necesario para la selección de las células transformantes. Incubar las cajas a 37 °C durante al menos 16 hrs (23).

II- Purificación de DNA de plásmido.

El método utilizado es el que se denomina de "lisis alcalina", método desarrollado por Maniatis (30). En éste, se contemplan 3 pasos: crecimiento de la bacteria y amplificación del plásmido; lisis de la bacteria; y finalmente purificación del DNA del plásmido.

Se crece la bacteria que lleva al plásmido que se desea purificar, hasta una densidad de 0.4 a 595 nm de D.O. y entonces agregar cloramfenicol 170 µgr/ml e incubar, con agitación durante 16 hrs. Colectar las células por centrifugación y agregar 10 ml de solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris HCl pH 8.0 y 10 mM EDTA) para resuspender. A esto se le añade 5 mgr/ml de lisozima y se le agrega posteriormente 20 ml de solución II (0.2 N NaOH y 1% SDS) y se incuba en hielo 10 min. Se agrega 15 ml de solución III (60 ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de agua). Se centrifuga a 20 K por 20 min. y se colecta el sobrenadante claro del cual se precipita sólo el DNA con isopropanol y se lava con etanol al 70 %. Se resuspende y se le agrega 10 mgr/ml de RNAasa. Se extrae y precipita

de nuevo y se resuspende en 2 ml para colocar en un gradiente de cloruro de cesio. Se colectan por separado las dos bandas que se obtienen de la centrifugación y que corresponden al plásmido roto y al superenrollado y que se pueden notar debido al ioduro de propidio que contiene la solución de CsCl. Estas se pasan por una columna de resina Dowex para quitar el ioduro de propidio y después se dializan con buffer TE (Tris 10 mM pH 8.0 y EDTA 1mM) por lo menos con 2 cambios de 1000 veces el volumen del plásmido. Por último precipitar con etanol y centrifugar. El DNA así obtenido se resuspende en el mínimo volumen de buffer TE.

III- Micro-ensayo de DNA de plásmido (screening).

El método es similar al anterior pero en este caso se crecen solo 3 ml de células. Los pasos son idénticos al anterior hasta obtener el sobrenadante, sólo que en este caso se extrajo con fenol saturado con agua en una relación 1:1. Posteriormente se precipitó el DNA con sal y etanol. Se resuspendió en 10 μ l de agua bidestilada y estéril. El DNA quedó listo para ser digerido por enzimas de restricción (38).

IV- Electroforesis de DNA en geles de Agarosa o de Acrilamida.

La electroforesis de DNA se llevó a cabo en placa conforme a las siguientes condiciones:

Agarosa 1 % disuelta por calentamiento en Tris-boratos-EDTA (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM y EDTA 2.5 mM pH 8.2) con lo cual se llenan las placas y se hace el gel. Las muestras de DNA que se desea analizar se

preparan con cantidad suficiente de DNA para que sean visibles (desde 0.2 a 1 µgr) y se les agregan 5 µl de "Stop Mix" (6 gr. de urea, 1 ml de azul de bromofenol al 0.5 % en agua, 1 ml de xilencianol al 0.5 % en agua, todo para preparar 10 ml) y se aplican las muestras en los carriles del gel. Se corren a 150 V durante una hora en buffer Tris-boratos-EDTA (TBE). Los geles de acrilamida al 7.5 % se preparan de la siguiente manera:

Acrilamida	7.5 ml
TBE 10X	3.0 ml
Agua destilada	19.4 ml
Persulfato de amonio\10 mgr/ml	0.15 ml
TEMED	0.015 ml

Se corren a 200 V por 1 hora o más en buffer TBE.

El DNA se revela por tinción con una solución de bromuro de etidio 0.1 mgr/100 ml y se observa con una lámpara de luz ultravioleta (5).

V- Aislamiento de fragmentos de DNA de un gel de agarosa.

Una vez que se ha cortado la banda deseada del gel de agarosa, se debe machacar esta agarosa conteniendo el fragmento de DNA, para después añadir un volumen igual de fenol saturado con agua 1:1. El siguiente paso es el de agitar con Vortex durante 10 seg. Posteriormente se congela a -70 °C entre 5 y 15 minutos el tubo para centrifugar por 15 minutos más. En un nuevo tubo se recupera el sobrenadante, dónde de encuentra el DNA. Se extrae el sobrenadante con un volumen equivalente de fenol saturado dos veces. Finalmente, se precipita el DNA con etanol y se seca por vacío, para después

resuspender el DNA en agua bidestilada (2).

VI- Extracción de DNA con fenol saturado

Agregar un volumen de fenol saturado con agua 1:1 y agitar. Centrifugar 2 min., tomar la fase superior (acuosa) y pasarlo a otro tubo. Repetir el procedimiento anterior, volver a agitar y volver a centrifugar 1 min. Tomar la fase acuosa y agregar 1/25 del volumen de NaCl 5 M y añadir 2.5 veces el volumen total de etanol a -20°C. Agitar por inversión e incubar en hielo durante 15 minutos. Centrifugar de 5 a 10 minutos y tirar el sobrenadante. Secar el tubo con vacío y resuspender en agua estéril y filtrada o en buffer TE.

VII- Bioensayo para la medición de actividad de la PA

La idea general de este bioensayo es la siguiente: se ha reportado que la actividad del gene de *pac* es mayor a 30°C, por lo tanto se deja creciendo la cepa silvestre de *E. coli* ATCC11105 con y sin plásmido pPA22 a 30°C durante más de 24 Hrs. Las células se dejan creciendo en cajas de petri en medio mínimo M9. En un caso se añadió medio M9 más Glucosa y en otro medio M9 más ácido Fenilacético. Una vez crecidas las células, se añade a las cajas el agar de superficie líquido que lleva Penicilina G y *Serratia marcescens*. Una vez añadido el agar de superficie se incuban las cajas a 37°C durante toda la noche.

El resultado del bioensayo se evidencia a través de la formación de un halo de inhibición alrededor de las células. Cuando una colonia de bacterias presenta un halo de inhibición lo que ocurre es que hubo una cierta producción y excreción al medio de la enzima penicilino

acilasa. Al agregar al medio el agar de superficie con la Penicilina G y la *Serratia marcescences*, la enzima producida a 30°C, hidroliza la penicilina G produciendo por un lado al ácido Fenilacético y por el otro al ácido 6-amino-penicilánico (6-APA). El 6-APA causa inhibición en el crecimiento de la bacteria *Serratia marcescences*, ya que este compuesto rompe la pared celular de la bacteria, ocasionando la muerte a la bacteria, lo cual implica la formación de un halo alrededor de las colonias productoras de la enzima. Resulta evidente el halo de inhibición ya que además donde no hay presencia de halo, la bacteria forma un tapete uniforme color rojo intenso (40).

VIII- Manejo de Secuencias por Computadora.

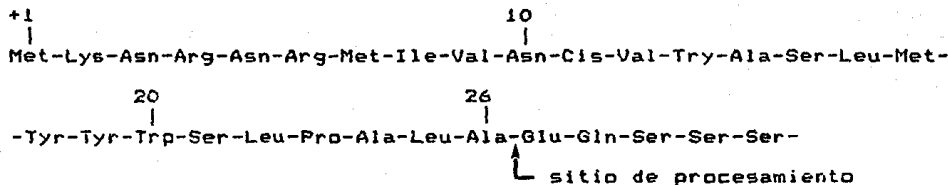
Se utilizó la mini-computadora VAX 11/780, con el sistema operativo VAX/VMS. Se corrió el programa PRPLOT, para graficar el perfil de hidrofobicidad-hidrofilicidad. El programa PRPLOT forma parte del "Protein Sequence Analysis Software" el cual forma, a su vez, parte del sistema "Protein Identification Resource (PIR)".

RESULTADOS

I- Análisis de la Proteína en su extremo NH₂ terminal.

Desde un punto de vista básico resulta de gran interés el estudio de la enzima PA. Un aspecto importante es el procesamiento de su precursor ya que la enzima madura está compuesta por dos subunidades las cuales se originan a partir del mismo péptido precursor (3,4,33). A través del análisis del péptido precursor se ha identificado una secuencia de 26 residuos en el extremo NH₂ terminal que posee las características de un péptido señal encargado de traslocar a la proteína en espacio periplásmico.

Para la PA la secuencia correspondiente al péptido señal es la siguiente :



Junto con esta secuencia se presenta una gráfica (fig. 8) basada en los parámetros de Hoop y Wood (20). Esta gráfica muestra un perfil de hidrofobicidad-hidrofilicidad del fragmento de secuencia en cuestión. Se aprecia claramente una región hidrófoba en este fragmento y con los residuos Ala- Leu-Ala justo antes del sitio de corte.

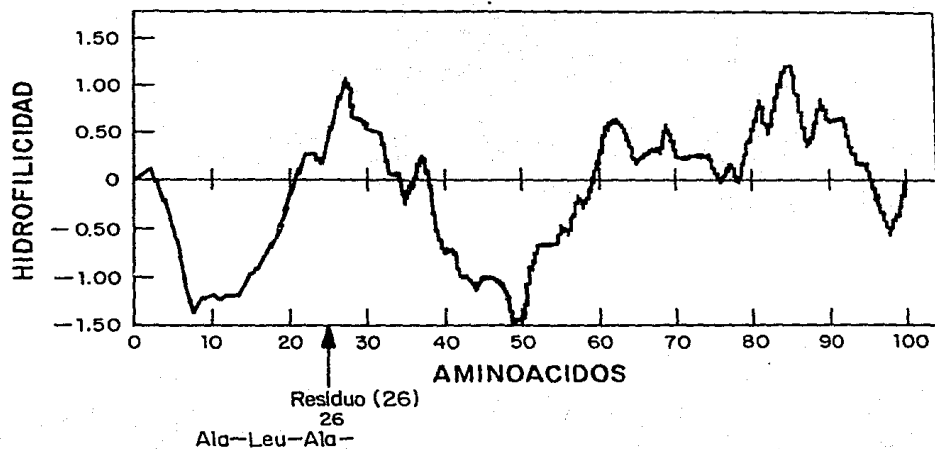


Figura 8. Gráfica del perfil de hidrofiliidad-hidrofobicidad hecho con el algoritmo de Hopp y Woods (20). Perfil realizado con una ventana de 6 y que va desde la metionina inicial en el extremo amino-terminal hasta el residuo 100. La flecha indica el sitio de corte del péptido señal (residuo 26). Los valles en esta gráfica representan zonas hidrofóbicas.

II- Análisis de la región reguladora

La expresión del gene estructural de la PA está regulada por la región de control localizada en el extremo 5' del gene. Son varios los elementos que al parecer intervienen en esta regulación.

Establecido el posible sitio de inicio de la transcripción (16) y analizando cuidadosamente la secuencia nucleotídica se ha propuesto que el promotor de este gene se encuentra alrededor del nucleótido -35 la siguiente secuencia:

5' T A G A T A 3'

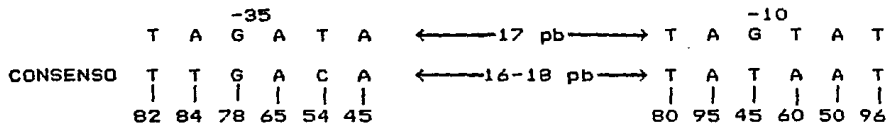
mientras que a una distancia de -10 en relación con el inicio de la transcripción aparece la secuencia:

5' T A G T A T 3'

Además la distancia entre estas dos secuencias es de 17 pares de bases, cuando se ha visto que la distancia común entre el -10 y el -35 varía de 16 a 18 pares de bases (25).

Dentro de esta región reguladora se han localizado dos posibles sitios de unión a la molécula CRP. Ambos sitios se acercan en cuanto a similitud con la secuencia consenso y sus posiciones con respecto al inicio de la transcripción son entre -68/-69 y -109/-110 respectivamente (figura 5 y 11). Finalmente, se ha propuesto, en base al criterio de similitud con la secuencia consenso, un sitio de unión a ribosoma (RB), localizado aproximadamente a 22 pares de bases del inicio de la transcripción.

La secuencia del promotor del gene *pac* fué comparada con la secuencia consenso de la manera siguiente:



Por otra parte, para el mismo gene *pac* se mapearon en la región reguladora tres secuencias palindrómicas imperfectas en las posiciones -86, -19/-20 y +3/+4. Como se puede observar en la figura 5 y 11, el palíndrome más alejado, cercano al extremo 5' se sitúa entre las dos secuencias propuestas para el pegado de la molécula de CRP. La segunda secuencia palindrómica está situada entre el -35 y el -10 correspondientes al promotor. Finalmente el tercer palíndromo imperfecto identificado en esta región de control, sobrepone a la secuencia del -10 del promotor.

III- Clonación de la región de regulación del gene *pac* que lleva los tres operadores putativos.

El plásmido pPA2 es el portador del gene *pac* completo, incluyendo la región de regulación (22). El experimento que se realizó, se fundamentó en la clonación, a partir del plásmido pPA2, de un segmento de DNA que lleva la región de control. El primer paso fué el de deletar, a este plásmido, la región del genoma correspondiente a la región codificadora para la resistencia a cloramfenicol.

La construcción de este nuevo plásmido se detalla en la figura 9. Por

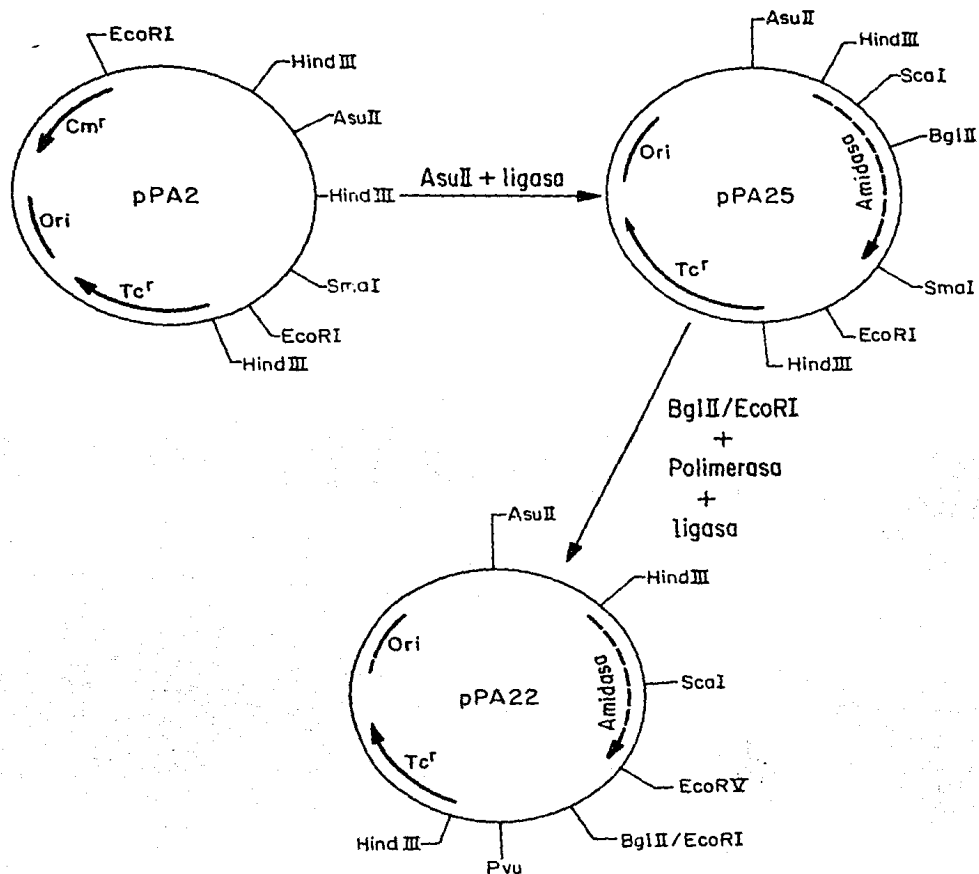


Figura 9. Construcción del plásmido pPA22 portador de la región de regulación del gene *pac*. Este plásmido lleva una deleción que va de BglII a EcoRI. El plásmido pPA25 lleva al gene *pac* completo, es un plásmido derivado del plásmido pPA2, al cual se le deletó la región codificadora para la resistencia a cloramfenicol.

ello, se hizo una digestión con la enzima de restricción *AsuII*. Analizando esta digestión, se obtuvieron dos fragmentos, siendo el de mayor tamaño el portador del gene completo *pac*, la región codificadora para la resistencia a Tetraciclina y el sitio de origen de la replicación. Una vez aislado, este fragmento fué ligado y transformado en la cepa de *Escherichia coli* HB101. Posteriormente se purificó el nuevo plásmido llamado pPA25.

A partir del plásmido pPA25 se construyó el pPA22. Por ello, se le deletó una parte del gene estructural de *pac*. La deleción va desde el sitio de restricción *BglIII* (posición 1620 pb), hasta el sitio de *EcoRI*. La deleción eliminó todo el extremo 3' del gene estructural. El nuevo plásmido, lleva la región de regulación, con las tres secuencias palindrómicas. Finalmente se transformó el pPA22 en la cepa de *Escherichia coli* ATCC11105 para posteriores cuantificaciones de la producción de la enzima PA.

IV- Medición de la actividad de la enzima PA

Una vez que se tuvo el plásmido pPA22 se realizó el experimento que pretendió cuantificar la inducción del gene por medio de la producción final de enzima y así demostrar alguna de las hipótesis planteadas.

En la figura 10 se aprecia que la cepa silvestre de *Escherichia coli* ATCC11105 en medio M9 con glucosa como fuente de carbono no produce enzima PA. La misma cepa en medio M9 con ácido fenilacético como fuente de carbono muestra una clara producción de enzima, evidenciada por el halo de inhibición.

El siguiente caso representa a la misma cepa, en el mismo medio con glucosa pero ahora con la presencia del plásmido pPA22.

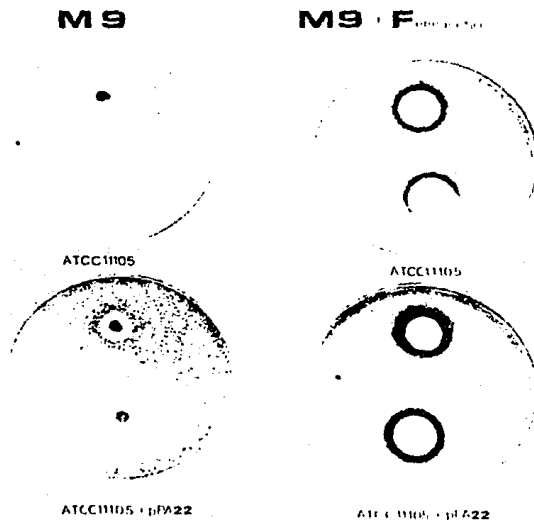


Figura 10. Resultados del bioensayo con la bacteria *Serratia marcescens* en cajas de petri en medio M9 con glucosa y M9 con ácido fenilacético. Las colonias corresponden a la cepa de *Escherichia coli* ATCC11105, con y sin plásmido pPA22. El tapete bacteriano es de color rojo intenso, evidenciando la presencia de la *Serratia m.*

Finalmente, se presenta a la misma cepa, en medio M9 con ácido fenilacético llevando al plásmido pPA22.

Es notoria la presencia de un pequeño halo de inhibición en el caso del medio M9 con glucosa para la cepa con plásmido. Vemos claramente que sin plásmido, la cepa no es capaz de producir la enzima mientras que con el plásmido hay algo de producción.

Los resultados más interesantes se presentan en los dos casos para los cuales las células fueron crecidas en medio M9 con ácido fenilacético como fuente de carbono. El primero de ellos se refiere sólo a la cepa silvestre donde se aprecia la inducción por parte del ácido fenilacético apareciendo claramente un halo de inhibición.

Para la cepa silvestre llevando al plásmido pPA22 se observa con mayor claridad el halo de inhibición y esta claridad está dada con relación al caso anterior puesto que hay una mayor producción de enzima. Para la cepa sin plásmido, la inhibición no resulta ser uniforme mientras que para la misma cepa portadora del plásmido el halo es claro y uniforme como se puede apreciar en la figura 10.

V- Estudio sobre operadore.

Los resultados a los experimentos antes mencionados indican la posible presencia de uno o varios operadores activos que pudieran tener un papel importante en la regulación del gene pac. Por ello, decidimos analizar con más detalle estas secuencias palindrómicas localizadas en la región de control de este gene.

A- Recopilación de algunas secuencias reportadas como Operadores

Las secuencia se muestran en la Tabla I incluyendo al final las tres secuencias palindrónicas correspondientes a los posibles operadores en el gene pac.

B- Localización y tamaño de los operadores citados.

Una vez agrupados estos operadores se realizó un análisis un poco más detallado a nivel de secuencia de nucleótidos y de la región en dónde se localizan dentro de los correspondientes genes u operones. Como resumen de las observaciones se presenta la Tabla II. En esta tabla se muestra el tamaño del operador, tomando en cuenta uno de los lados del palíndrome y el número de nucleótidos que efectivamente resultan ser simétricos. En el caso del gene pac llamaremos palíndrome I a la secuencia que se localiza entre los dos sitios de unión a la molécula CRP, es decir, el que se encuentra más alejado en relación al sitio de inicio de la transcripción. El palíndrome II será el que se localiza entre las regiones -35 y -10 del promotor funcional y finalmente el Palíndrome III será el que sobrepone parcialmente al promotor funcional en la región -10 (Fig.5 y 11).

Retomando el análisis de la Tabla II podemos ver como en ciertos casos fue posible conocer la región en dónde se localizan el o los operadores, pero también como en otros no se reporta la localización en relación con el +1 del inicio de la transcripción.

PALINDROME I

5'-A A T T T T T G T A T C A A A A A T T -3'

PALINDROME II

5'-A A C C G A A G C T T C G T T -3'

PALINDROME III

5'-G T A T C A A T T C G C T A A T T A T A C -3'

GGTTACGCACGGGAGGATGTGAGTGAACCTATGGCGGCGTGTTCGCAAAATGCTGCCTGTCTG

GATTCBAAAATTGCTACAAAATCCAACCATAAAAAGTCGTTTACAACATATTTTTCTGATTTACATACAGATAATGACCTG

AGCTGTCTCTCTGCGGATCATCTATGCGTCCGGGGATCTGTCCAAAAAGGAATAGAAAACAAAATCATCAGCGGTG

AATAAAGCBATTGCTTTTTAGATCACATTAATGAAATTTTTGTATCAAAAATTAGTTATCGCGCTCACAGTTCATAATGA

AACAATTCCTGCAAAATAGATAAACCGAAGCTTCGTTGCTAGTATCAATTCGCTAATTATACACCTGCCAGAGGATACA

ATG AAA AAT AGA AAT CGT ATG ATC GTG AAC TGT GTT ACT GCT TCC CTG ATG TAT TAT TGG
Met Lys Asn Arg Asn Arg Met Ile Val Asn Cys Val Thr Ala Ser Leu Met Tyr Tyr Trp

Figura 11. Secuencias palindrónicas localizadas en la región de regulación del gene *pac*. Los palíndromos han sido numerados del I al III siendo el I el más cercano al extremo 5'. Se precisan algunos sitios de restricción.

Secuencias Nucleotidas de algunas Regiones correspondientes a operadores

Proteína Reguladora	Gene regulado u Operador	Secuencia	Referencias
TrpR	trp operon	ATCGAACTAGT TAACTAGTACGCA	18
	trpR	ATCGTACTCTTTAGCGAGTACAAC	18
	araH	AATGTACTAGAGAACCTAAGTCCATT	18
Biofin	bioA bioB	ATCGACTGTGAAACCAAATTGAAAAGATTTAGGTTACAAGTCTACA	34
LexA	recA	ATACTGTATGACCATACAGTA	18,49
	lexA	TGCTGTATATACTCACAGCA	18,49
	lexA	AACTGTATATACACCCAGGG	18,49
LacI	lac operon	TGTGTGGAATTTGTGAGCGGAATAACAATTTACACA	14
GalR	gal operon - Oe	AATTCCTTGTGTAAACGAT TCCACTAATT	21
	gal operon - Oi	CCAATGTAACCGCTACCACGGG	21
PenI (+)	penP	AAAGTATTACATATGTAAGATT T	18
	penP	CAAATCTTACAAATGTAGTCT T T	18
	penI	AGAGTATTACATTTGTAAGTATA	18
TetR (TniO)	tetO	ACTCTATCATTGATAGAGT	18
	tetO ^L	TCCTATCAGTGATAGAGA	18
Lambda ci Cro	Consenso ^R	TATCACCGCGGTGATA	
	Consenso	AANTGTGANNNNNVCANATT	
CAP	Consenso	AANTGTGANNNNNVCANATT	
PA	pac	AATTTTGTATCAAAAATT	16
		AACCGAAGCTTCGT T	16
		GTATCAATTGCTAA TATAC	16

Tabla I. Secuencias nucleotídicas de algunas regiones reportadas como operadores. Al final de esta lista se añadieron las tres secuencias palindrónicas localizadas en la región de control del gene **pac**.

OPERADORES	TAMAÑO	NUCLEATIDOS SIMÉTRICOS	REGION
lac	17	14	-10 ... +10
aroH	12	9	-50 ... -25
trp	10	9	-20 ... +1
trpR	9	6	-20 ... +10
bioA bioB	20	15	-20 ... +20
lexA1	10	6	-20 ... +1
lexA2	10	5	+2 ... +25
recA	11	10	-35 ... -10
uvrB	9	4	-
Amidasa	9/7-8/10	8/7-8/9	-100-80/-35-20/-10
lambda OR1	5	4	
lambda OR2	7	5	
lambda OR3	8	5	
lambda OL1	5	4	
lambda OL2	7	4	
lambda OL3	7	4	
gal Oe	10	7	-67 ... -52
gal Oi	7	4	+46 ... +60
argF	21	10	-32 ... +7
argI	19	13	-32 ... +7
rgR	8	4	
argR	9	4	-22 ... -5
carAB	9	5	
penP	12	9	+20 ... -10
penP	12	7	-5 ... -33
penI	12	7	-10 ... +1
tetAOL	9	9	
tetROR	9	8	

Tabla II. Compilación de una serie de operadores en función de su tamaño, número de nucleótidos simétricos y región en la que se encuentran. El tamaño está dado por el número de nucleótidos simétricos o no simétricos, tomando en cuenta únicamente la mitad del palíndromo. Los nucleótidos simétricos son aquellos que tienen su base complementaria en el otro lado de simetría del palíndromo.

C- Abundancia de Purinas y Pirimidinas en operadores.

El criterio siguiente consistió en analizar la riqueza de Adenina y Timinas (A+T) y Guaninas y Citosinas (G+C) en distintos operadores. Para esto se consideraron unos cuantos operadores cuya secuencia es conocida. Con estos datos se elaboró la Tabla III.

	A	G	C	T	Total	A + T	G + C
Trp R	6	4	5	7	22	13 (0.59)	9 (0.41)
Hv	5	4	5	9	23	14 (0.6)	9 (0.39)
Aro H	9	6	2	6	23	15 (0.65)	8 (0.35)
Leu	9	3	5	6	23	15 (0.65)	8 (0.35)
Lac	11	9	5	10	35	21 (0.6)	14 (0.4)
Trp	7	4	4	5	20	12 (0.6)	8 (0.4)
bioA bioB	16	7	5	12	40	28 (0.7)	12 (0.3)
lexA	6	3	5	6	20	12 (0.6)	8 (0.4)
recA	8	3	4	7	22	15 (0.68)	7 (0.31)
uvrB	3	2	3	10	18	13 (0.72)	5 (0.28)
gal Oe	7	3	4	7	21	14 (0.66)	7 (0.33)
gal OI	4	2	5	3	14	7 (0.5)	7 (0.5)
PARA AMIDASA							
I	8	1	1	9	19	17 (0.89)	2 (0.1)
II	4	3	4	4	15	8 (0.53)	7 (0.46)
III	7	2	4	8	21	15 (0.71)	6 (0.28)

Tabla III. Frecuencia de utilización de purinas y pirimidinas en varios operadores, los valores de A,G,C y T están tomados en toda la extensión del palíndromo, por lo que el valor total corresponde a ambos lados del palíndromo. Se presenta el número de A / T y de C / G con sus respectivos porcentajes para cada uno. Al final de la tabla están los valores para los tres palíndromes del gene *pac*.

D- Similitud entre las tres secuencias palindrónicas de la región de regulación del gene *pac*.

Como otro criterio, se alinearon las secuencias de DNA correspondientes a los tres posibles palíndromes del gene *pac*. La Tabla V muestra los respectivos alineamientos. El alineamiento fué extendido a los lados y las letras minúsculas representan las bases que no forman parte de las secuencias palindrónicas. Además, los cuadros con líneas punteadas indican las homologías de las bases que tampoco forman parte de los palíndromes.

PALINDROME I

3' - A A T T T T T G T A^{*} T C A A A A A T T - 5'

PALINDROME II

3' - A A C C G A A G^{*} C T T C G T T - 5'

PALINDROME III

3' - G T A T C A A T T C G^{*} C T A A T T A T A C - 5'

ALINEAMIENTOS

III	G	T	-	A	T	-	C	A	A	T	T	-	C	G	C	T	A	A	T	T	A	T	A	C	a	c	
I	t	t	a	a	t	g	a	A	A	T	T	T	T	G	-	T	A	T	C	A	A	A	A	A	A	T	T
III	G	T	A	-	T	C	A	A	-	-	T	T	C	G	C	T	A	A	T	T	A	T	A	C			
II	a	A	A	C	C	G	A	A	G	C	T	T	C	G	T	T	g	c	t	a	g	t	a	t			
I	A	A	T	T	T	T	T	G	T	A	T	C	A	A	A	A	A	T	T								
II	A	A	C	C	G	A	A	G	C	-	T	T	C	G	-	-	-	T	T								

Tabla IV. Secuencias de los posibles operadores y/o pseudo-operadores para la región de control del gene *lac*. Alineamiento de las tres secuencias palindrómicas entre sí. Las letras mayúsculas corresponden a los nucleótidos que están incluidos en las secuencias palindrómicas mientras que las minúsculas son las bases que no forman parte de los palíndromes pero que van flanqueando a los palíndromes. Los cuadros en líneas punteadas incluyen la identidad entre bases que al menos en una de las secuencias no forman parte del palíndromo. El guión entre las bases representa un "gap" que se ha propuesto, para optimizar el alineamiento.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En esta primera parte de la discusión nos enfocamos al estudio del procesamiento de la enzima para posteriormente discutir la organización y regulación del gene estructural de esta proteína. En cuanto al procesamiento de la enzima, resulta inevitable pensar en un análisis de la secuencia primaria de amino ácidos de la PA para poder delucidar funciones, similitudes y posibles homologías con otros sistemas proteicos que nos lleven a un mejor entendimiento del procesamiento de la enzima.

I- Procesamiento de la enzima PA.

Son varios los elementos que intervienen en el procesamiento de la enzima PA. El precursor de esta enzima que permite la unión covalente de las cadenas α y β vía el péptido espaciador o conector tiene características interesantes. Se sugiere que este péptido conector intervenga directamente en el doblamiento de la proteína para llevar al cabo parte de las funciones de procesamiento y/o de traslocación a membrana y de funcionalidad de la enzima.

Recordemos también que la función del péptido señal presente en el precursor, es la de traslocar al péptido precursor al espacio periplásmico. Consecuentemente también es probable que intervenga en esta parte del procesamiento algún tipo de doblamiento necesario para alcanzar el espacio periplásmico. Ya en espacio periplásmico se lleva al cabo el resto del procesamiento.

Es importante resaltar que el péptido señal de la enzima PA, posee un alto grado de similitud con péptidos que intervienen en traslocación de proteínas a membrana e incluso a espacio periplásmico. Recientes publicaciones relacionadas con proteínas que pegan maltosa (Maltose-binding-protein, MBP) muestran un tipo de péptido señal muy relacionado con el de la PA (19). Como se mostró en la sección de resultados, este péptido al igual que el péptido señal correspondiente al precursor de la PA, mantienen la organización con la similitud en tamaño, (26 residuos) y el sitio de corte, ya que tienen en ambos casos el mismo tamaño y la misma secuencia: Ala-Leu-Ala (6). Dependiendo de las posibles relaciones con el resto de la proteína, esta similitud sugiere un comportamiento muy parecido al de una típica proteína que tiene que ser traslocada a espacio periplásmico.

II- Estudio de la región de regulación del gene *pac*

Pasando a la región regulatoria del gene *pac* y retomando la idea de que los sitios que se han analizado en esta región sean posiblemente funcionales, es factible proponer un modelo de regulación. Lo anterior se complementa con datos obtenidos en nuestro laboratorio relacionados con el efecto de ciertas sustancias en la inducción o represión del gene *pac*.

En relación al promotor del gene *pac*, se puede decir que la secuencia correspondiente a la región -35 se ve que hay una similitud entre esta secuencia y la consenso de un 50 %. Para el fragmento de secuencia de la caja "Pribnow" o -10, un punto muy importante es que se conserva la Timina final y que hay un cambio de una purina por otra

purina (T por A) en la posición 4. Se puede decir, por lo tanto que el promotor propuesto para el gene *pac* no se acerca estrictamente a la secuencia consenso de promotores pero resulta ser similar. Por lo anterior se puede pensar que se trata de un promotor no muy fuerte que pudiera necesitar de otros elementos de regulación para llevar al cabo eficientemente su función.

Se han identificado dos sitios de unión a la molécula CRP y se sabe que la expresión del gene *pac* está regulada a nivel de la transcripción por el AMP cíclico (13). Por lo tanto se puede suponer que el efecto de la concentración del AMP cíclico sobre la expresión del gene *pac* es debido a que la proteína CRP funciona como activador cuando se llega a cierta concentración de AMP cíclico. Se ha reportado que las distancias de los sitios de unión a CRP varían entre -106/-107 y -36/-37. Podemos entonces proponer que ambos sitios de pegado a CRP pudieran ser funcionales. Aunque resulta difícil predecir cual de estas dos secuencias fuera realmente funcional o si ambas tuvieran que ver con el estímulo en el inicio de la transcripción. Además se ha observado que para lograr una alta producción de enzima, aparte de no usar glucosa o alguna otra fuente de carbono que disminuya los niveles de AMP cíclico, es necesario adicionar al medio de cultivo el inductor que es el ácido fenilacético. La inducción de la expresión del gene por el ácido fenilacético, posiblemente sea controlada por una proteína reguladora, la cual podría ser un represor que funcionara como tal cuando la concentración de ácido fenilacético fuera baja. Esto se propone, tomando en cuenta la presencia de tres regiones palindrómicas las cuales sobreponen parcialmente al posible sitio de unión a CRP y al promotor. Si una proteína reguladora se une a cualquiera de las tres secuencias palindrómicas, no se permitiría la

interacción de CRP o de la RNA polimerasa con sus respectivos sitios de unión en el DNA. Lo anterior ocasionaría que los niveles de la transcripción fueran bajos.

III- Discusión de los resultados derivados de las clonaciones.

Dadas las observaciones anteriores, resulta prometedor el pensar que el ácido fenilacético juega un papel de inductor dentro del sistema de regulación del gene *pac*.

Esto puede explicarse por el efecto de inducción que se presenta al tener plásmido dentro de la célula en multicopia. Un número elevado de copias del operador titula al represor lo cual induciría al gene y consecuentemente se incrementaría la producción de enzima.

Los resultados que muestran la inducción del gene *pac* en la cepa de *Escherichia coli* ATCC11105, variando la fuente de carbono indica por una parte que efectivamente el crecimiento de las células debe hacerse a 30 °C pero sobre todo que el ácido fenilacético juega un papel de inductor para el inicio de la transcripción de gene *pac*. De esta forma se puede proponer un modelo de regulación para este gene *pac* ya que con la presencia de un inductor resulta factible pensar en un tipo de control negativo. Sin embargo, no sería correcto concluir únicamente lo anterior dado que se observa una cierta inducción del gene en cromosoma, inducción que provoca una expresión baja en el caso de la cepa con plásmido pero sin inductor y que pudiera evidenciar un cierto tipo de control positivo.

Finalmente , dado que la expresión del gene del cromosoma se incrementa considerablemente por la presencia del plásmido multicopia que lleva los posibles operadores funcionales y además los dos sitio de pegado a la proteína CRP, podemos proponer que el modelo de regulación debe contemplar ambos tipos de controles, tanto al control negativo como al positivo. A continuación presentaremos un esquema que trata de resumir las posibilidades existentes, resultante del experimento anterior (fig. 12).

IV- Estudio sobre operadores

Los resultados anteriores muestran que el gene pac puede estar sujeto a una regulación negativa.

En cuanto a los resultados derivados del estudios de una serie de operadores con los tres posibles operadores del gene pac, es difícil definir cual o cuales de estas secuencias pudieran considerarse como el operador o los operadores funcionales. Sin embargo, se trató de sistematizar las comparaciones y por ello se realizaron los siguientes análisis:

A- Compilación de algunas secuencias reportadas como Operadores

Con esta agrupación de secuencias se quiso tener un punto de partida para los siguientes estudios además de poder ir conociendo más características en relación con el complejo represor-operador.

Un punto interesante para algunos casos en que la secuencia nucleotídica se conoce es el de poder deducir alguna secuencia consenso. Como puede observarse en la Tabla I el tamaño de los

MODELO DE REGULACION

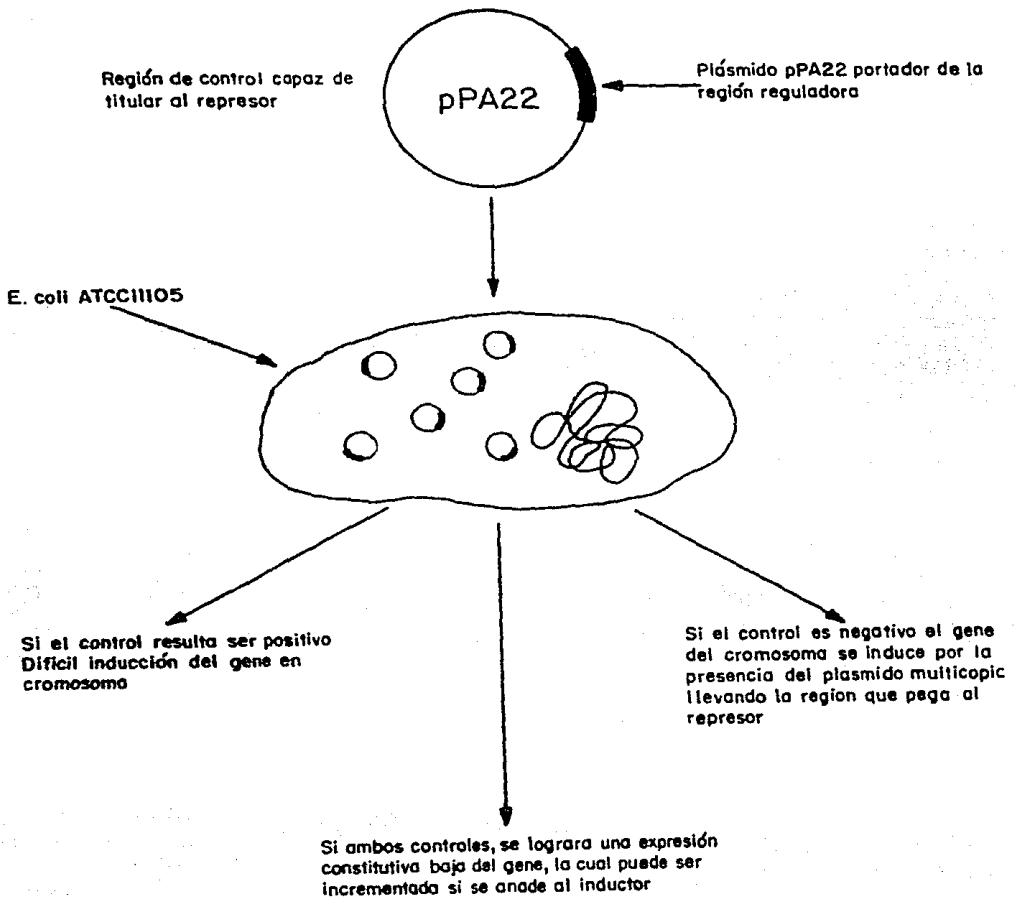


Figura 12. Modelo de regulación en el cual se tiene un DNA circular (plásmido pPA22) portador de la región de control. Por transformación el plásmido pPA22 es introducido en multicopia en la cepa bacteriana de Escherichia coli ATCC11105.

operadores reportados al igual que sus secuencias varían considerablemente. A pesar de lo anterior en ciertos casos, como por ejemplo para el fago Lambda dónde el complejo represor-operador necesita de seis secuencias palindrómicas para llevar al cabo su función regulatoria, el deducir una secuencia consenso resulta útil. El interés en alinear las distintas secuencias nos lleva a evidenciar un cierto número de nucleótidos muy conservados que presumiblemente tengan una relación funcional necesaria en el reconocimiento por parte de la molécula represora. Otro punto es el poder analizar con más detalle la secuencia palindrómica como tal ya que el represor usualmente es una molécula dimérica y el reconocimiento se lleva al cabo en forma simétrica, es decir, que este dímero primero reconoce a una de las mitades del palíndromo para después hacer el contacto completo en la otra mitad de la secuencia simétrica o asimétrica.

B- Localización y tamaño de los posibles operadores del gene *pac*.

Pensando en un valor promedio en relación con el tamaño de estas secuencias se podría intuir que los palíndromes I y el III para el caso del gene *pac* son los que más se acercan a ese valor promedio obtenido a partir del tamaño de los operadores reportados. En cuanto al número de nucleótidos simétricos idénticos, los palíndromes I y III son de nuevo los que mantienen los números más significativos.

Como se puede apreciar en los casos reportados resulta frecuente situar a un buen grupo de operadores en una región comprendida entre el -100 y el +20 en relación con el inicio de la transcripción. Los palíndromes I, II y III del gene *pac* se localizan entre el triplete

codificante inicial y el -100 por lo tanto resulta importante recalcar que estos posibles operadores estan situados en una región dónde en otros genes, operadores funcionales llevan al cabo sus funciones regulatorias.

En relación con lo anterior, se han reportado experimentos con operadores funcionales que evidencian la interacción proteína-DNA. Uno de los resultados muestra que para un grupo de operadores existe un cierta sobreposición de estas secuencias palindrómicas, con la secuencia correspondiente al promotor. Lo anterior ocurre para el palíndrome III del gene *pac* mientras que el II está localizado entre las regiones -35 y -10 del promotor.

Aunque este fenómeno de sobreposición es muy frecuente en otros operadores existen casos en los cuales el operador está alejado de la región del promotor. Cuando el operador sobrepone al promotor resulta lógico pensar en que el complejo que forma la interacción represor-operador, evita que la RNA polimerase se pegue al promotor y así no se inicia la transcripción. Pero resulta ser que éste no es el único mecanismo posible ya que recientes investigaciones han demostrado la existencia de operadores funcionales a más 1 Kilobase de distancia del promotor dentro del mismo gene estructural (12,21,44).

Pero también, fenómenos regulatorios de represión eficiente en procarionte, especialmente en *Escherichia coli*, son los que presentan los operones *gal*, *ara* y *deo*, los cuales requieren de dos operadores separados por 110, 200 y 600 pares de bases respectivamente. La organización de estos elementos reguladores han llevado a los investigadores a proponer un modelo conocido como "DNA loop" o de doblamiento del DNA. De acuerdo con este modelo, que al parecer

resulta ser un mecanismo de regulación eficiente a nivel de la transcripción, el "loop" del DNA hace que haya una concentración local mayor de proteína represora en la región del promotor. De esta manera, se supone que se logra el pegado eficiente de la molécula represora evitando así la interacción RNA polimerasa - promotor. Una de las conclusiones a las que se puede llegar es que no es posible pensar en un sólo mecanismo de regulación para todo tipo de control negativo y que además se aprecia una cierta evolución de una serie de sistemas de control de la expresión génica (34,35).

C- Abundancia de Purinas y Pirimidinas en operadores

Otro tipo de estudio fue el basado en la frecuencia de purinas y pirimidinas. Como se puede apreciar en la tabla IV la frecuencia de (A+T) oscila entre un 60 y un 72%, mientras que las (G+C) oscilan entre un 30 y 40%. Cuando se analiza el caso de los tres palíndromes del gene *pac* vemos como para el palíndromo I y III las frecuencias de (A+T) son de 89% y 71% respectivamente. Mientras que para el palíndromo II el valor es de 53%. Se sabe que el reconocimiento específico de pares de bases en la doble cadena del DNA por parte de una proteína, involucra el reconocimiento de pares específicos de grupos de puentes de hidrógeno, como grupos donadores y aceptores tanto en el surco mayor como en el menor de la doble hélice de DNA (42).

Los pares de A - T o T - A pueden distinguirse de los G - C o C - G por la presencia de un grupo central donador. Los pares A - T o T - A llevan la secuencia a - d - a de donadores y aceptores y además se localiza un grupo metilo. La secuencia de donadores y aceptores para

G - C o C - G es: a - a - d para G - C en el surco mayor y d - a - a para C - G. Es importante hacer notar que los grupos funcionales en el surco mayor están en el lado opuesto de su base correspondiente. Por lo tanto, en general, aunque existen excepciones, las proteínas no pueden estar en contacto con los grupos funcionales en el surco mayor y menor simultáneamente. Las proteínas no sólo reconocen en forma individual pares de donadores, aceptores, sino secuencias de pares de bases, y es esa naturaleza de la posición de aceptores y donadores de puentes de hidrógeno que resulta imprescindible para el reconocimiento e interacción proteína - DNA (42).

D- Similitud entre las tres secuencias palindrómicas de la región de regulación del gene pac.

El siguiente criterio de análisis fué el del alineamiento entre los palíndromes. La similitud entre los palíndromes I y II resulta ser la menos significativa dada la poca similitud que muestra. Para los palíndromes II y III, pudiera decirse que hay un buen alineamiento, pero es importante hacer notar que fué necesario dejar 3 huecos (gaps) en la secuencia palindrómica III para mejorar el alineamiento. Finalmente el alineamiento entre los palíndromes I y III parece ser el más significativo, por varias razones. La primera, como se puede apreciar en la Tabla V, es que el alineamiento requirió de un sólo hueco (gap) en ambas secuencias para mejorar el alineamiento. Por otra parte, las bases idénticas en su mayoría son adeninas y timinas. Finalmente, en la secuencia aledaña hay una similitud alta en (A+T) que pudiera tener importancia en el sentido de que este tipo de secuencias ayudan a la preparación para el reconocimiento y

posicionamiento de la molécula represora (35). Un punto importante que surge de este estudio de similitudes es que se podría pensar en que el palíndromo I funcionara como un pseudo-operador que ayudara al posicionamiento definitivo del represor en la secuencia palindrómica III del gene *pac* a la cual sobrepone al promotor en el -10 , evitando así la unión de la RNA polimerasa.

E- Conclusiones sobre las comparaciones.

Para empezar el criterio de tamaño de los palíndromes no aporta mucha información ya que por lo general el tamaño es variable. La localización de las tres secuencias coincide con la mayoría de los operadores reportados. En cuanto a la riqueza de purinas y pirimidinas, se ve que es mayor en términos generales la abundancia de Purinas (A+T) y en relación con esto el palíndromo I y II son los que tienen mayor abundancia de purinas. El alineamiento entre las tres secuencias palindrómicas entre sí muestra que la secuencias de los palíndromes I/III y II/III son bastante similares. En el primer caso sólo se deja un hueco en cada secuencia para optimizar el alineamiento. Además hay una mayor riqueza de purinas, aunque en los palíndromes II y III sigue siendo buena la similitud entre las dos secuencias.

Estos resultados no son concluyentes para poder definir cual es el operador funcional, aunque recordemos que existen trabajos experimentales hechos con un plásmido cuya construcción no lleva las secuencias palindrómicas I y II y que su expresión es constitutiva por lo cual pudiera descartar al palíndromo III como el único posible

sitio de pegado de una molécula represora (35). Consecuentemente podría pensarse en el palíndrome II como un candidato sólido para tener las funciones de operador, puesto que además el palíndrome I está alejado del promotor implicando la dificultad para el represor de abarcar suficiente espacio para lograr impedir el acceso a la RNA polimerasa a su promotor. Este modelo de regulación se muestra en la figura 13, tomando en cuenta sólo a uno de los posibles operadores.

Finalmente resulta evidente la variedad de posibilidades tanto en el procesamiento, como en la regulación del gene *gac*. Con este gene y con el estudio de muchos otros reportados podemos concluir que es difícil hablar de un sólo modelo de regulación y que además debemos pensar en procesos de convergencia y divergencia evolutiva a nivel de secuencia nucleotídica para explicar mejor ciertos procesos biológicos.

PERSPECTIVAS

Es indudable que el contar con la secuencia nucleotídica, y consecuentemente la secuencia deducida de amino ácidos abre un horizonte amplio para profundizar en el conocimiento del gene en cuestión y del producto del mismo. En un inicio se contó con la secuencia parcial y ahora se conoce la secuencia completa, del gene que codifica para la enzima PA, lo cual nos lleva a pensar en amplias perspectivas de estudio. Es importante no olvidar que además del conocimiento de la secuencia, existen una serie de antecedentes fisiológicos, bioquímicos y de regulación que pueden complementar futuros estudios. Para el gene *pac* el identificar, cual o cuales podrían ser los operadores funcionales, implica un importante avance en el conocimiento de los mecanismos de regulación de este gene en particular. Mediante técnicas de ADN recombinante y de mutagénesis sería posible identificar este elemento regulatorio para posteriormente pensar en la localización e identificación de la molécula represora que interviene en la regulación del gene *pac*. Al ver en conjunto la información hasta aquí presentada sobre el gene *pac* y en base a los datos reportados, de que el gene está regulado bajo control negativo y presenta represión catabólica (39), se hace evidente que este gene posee la organización típica de un gene involucrado en la utilización de una fuente de carbono según se muestra en la figura 14.

Por otra parte, el estudio de la proteína y de su secuencia primaria de aminoácidos abre grandes perspectivas en el entendimiento del

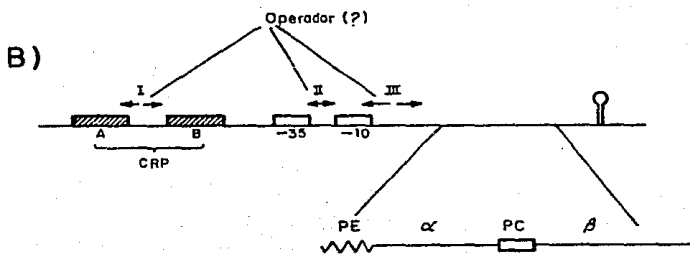
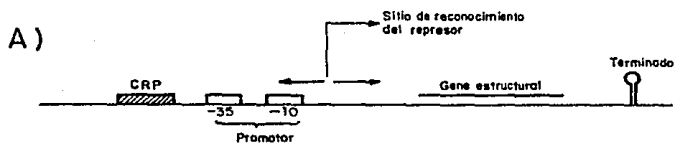


Figura 14. Similitud entre la organización típica de genes involucrados en la asimilación de fuentes de carbono (A) y la organización del gene *pac* (B).

procesamiento de la enzima, su localización a nivel membranal, su modo de acción y un posible origen evolutivo. Un posible enfoque sería mediante un estudio detallado de la secuencia primaria de la proteína a través de alguno de los sistemas de cómputo conocidos. Este estudio tendría como objetivo el tratar de localizar similitudes con otras secuencias de otras proteínas para poder proponer similitudes estructurales y funcionales, a nivel de secuencia y tal vez encontrar alguna relación evolutiva con otras proteínas.

Este tipo de estudio podría llevarnos al planteamiento de algún modelo relacionado con el funcionamiento de la enzima. También podría darnos indicios sobre la posible relación con genes localizados en el genoma de Escherichia coli. Esta posible relación se basa en la hipótesis del fenómeno de doble duplicación sufrida por el genoma de Escherichia coli a lo largo de su evolución (50). Lo anterior serviría para confirmar predicciones hechas a partir del estudio de similitudes entre secuencias primarias de proteínas. En relación con los estudios planteados, convendría también localizar el gene pac en el cromosoma de Escherichia coli para así confirmar o no las predicciones hechas en relación con las analogías en función con otros genes.

Así mismo, convendría demostrar si efectivamente la enzima madura y funcional se localiza en espacio periplásmico y si no interactúa con otro compuesto membranal o alguna otra proteína.

Las perspectivas de estudio son amplias. Un punto de interés adicional se basa en la necesidad que habría de implementar nuevas metodologías. Metodologías que serían de gran utilidad no sólo en el estudio de este sistema si no en el de muchos otros, con diversos objetivos y aplicaciones.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Avery, O.T., MacLeod, C.M. y McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types I. Induction of transformation by deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus types III. J. Exp. Med., Vol. 79, pp. 137-158.
- 2- Benson, Spencer A.. A rapid procedure for isolation of DNA fragments from agarose gels. Biotechniques 66, March/April, 1986.
- 3- Bock, A., Wirth, G. Schmid, G., Schumacher, G., Lang, G. y Buckel, P. (1983a). The penicillin acylase from Escherichia coli ATCC11105 consists of two dissimilar subunit. FEMS Microbiol. Lett. 20, 135-139.
- 4- Bock, A., Wirth, G. Schmid, G., Schumacher, G., Lang, G. y Buckel, P. (1983b). The two subunits of penicillin acylase are processed from a common precursor. FEMS Microbiol. Lett. 20, 141-144.
- 5- Bolivar, F., Rodriguez, L. R., Betlach, M.C. and Boyer, H. W.. Construction and characterization of new cloning vehicles. I: Ampicillin resistant derivatives of the plasmid pMB9. Gene, Vol. 2, pp. 75-93.
- 6- Cover, W. H., Ryan, P. J., Bassford, P. J., Walsh, K. A., Bollinger, J. and Randall, L. L.. Suppression of a signal sequence mutation by an amino acid substitution in the mature portion of the maltose-binding protein. J. Bacteriology, Vol. 169, N 5, pp. 1794-1800, 1987.
- 7- Brent, R. and Ptashne, M.. Mechanism of action of the lexA gene product. oc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 78, N 7, pp. 4204-4208 1981.
- 8- Bruns, W., Hoppe, J., Tsai, H., Bruning, H., Maywald, F., Collins, J. y Mayer, H.. Structure of the penicillin acylase gene from Escherichia coli; a periplasmic enzyme that undergoes multiple proteolytic processing. J. Mol. Appl. Genet. 3 (1985), 36-44.
- 9- Casas, L.. Producción del ácido 6-amino penicilánico por hidrólisis enzimática de la penicilina G. Tesis de Maestría. U.N.A.M. 1981.
- 10- Cohen, S. N., Chang, A.C. y Hsu, L.. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 69, pp. 2110-2114, 1972.

- 11- Crombrugge, B., Busby, S. and Buc, H.. Cyclic AMP receptor protein: Role in transcription activation. *Science*, Vol. 224, 1984.
- 12- Deuschle, V., Gentz R., and Bujard, H.. *lac* repressor blocks transcribing RNA polymerase and terminates transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 83, pp. 4134-4137, 1986.
- 13- Gang, D. M. and Shaighn, K.. Regulation of penicillin acylase in *Escherichia coli* by cyclic AMP. *Biochimica et Biophysica Acta* 425, pp. 110-114. 1976.
- 14- Gilbert, W. and Maxam, A.. The nucleotide sequence of the *lac* operator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Vol. 70, N 12, pp. 3581-3584, 1973.
- 15- Gicquel-Sanzey, B. and Cossart, B.. Homology between different prokaryotic DNA-binding regulatory proteins and between their sites of action. *EMBO Journal*, Vol. 1, N 5, pp. 591-595, 1982.
- 16- Gosset, G.. Aislamiento y secuencia nucleotídica de la región reguladora del gen estructural de la enzima penicilino amidasa de *E. coli*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autonoma de Guadalajara (1986).
- 17- Gunsalus, R. P., and Yanofsky, C.. Nucleotide sequence and expression of *Escherichia coli* *trpR*, the structural gene for the *trp* aporepressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 77, N 12, pp. 7117-7121, 1980.
- 18- Himeno, T., Imanaka, T., and Aika, S.. Nucleotide sequence of the penicillinase repressor gene *penI* of *Bacillus licheniformis* and regulation of *penE* and *penI* by repressor. *J. Bacteriol.* Vol. 168, N 3, pp. 1128-1132, 1986.
- 19- Higgins, C. F. and Ferro-Luzzi, G. A.. Two periplasmic transport proteins which interact with a common membrane receptor show extensive homology: complete nucleotide sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 78, N 10, pp. 6038-6042 (1981).
- 20- Hopp, T. P., and Woods, K. R.. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, pp. 3824-3828, 1981.
- 21- Iranin H. M., Orosz, L. and Adhya, S.. A control element within a structural gene: the *gal* operon of *E. coli*. *Cell*, Vol. 32, pp. 783-788, 1983.
- 22- Kolata, G.. Control element found within structural gene. *Science* Vol. 220, pp. 294, 1984.
- 23- Laks, S.. A mechanisms of DNA uptake by cells. Genetic interactions and gene transfer. *Brookhaven Symposia in Biology*, N 29, pp. 147-159, 1977.

- 24- Leon, P., Romero, D., Garcíarrubio, A., Bastarrachea, F. y Covarrubias, A.. Glutamine Synthetase constitutive mutation affecting the *glnALG* upstream promoter of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, Vol. 164, N 3, 1985.
- 25- Lewin, O. T. *Genes II*. John Willey and Sons. U.S.A., 1984.
- 26- Lowe, D. A., Romancik, G. and Elander, R. P.. Penicillin acylase. A review of existing enzymes and the isolation of a new bacterial penicillin V acylase. *Dev. Ind. Microbiol.* Vol. 22, pp. 163-180, 1981.
- 27- Luria, S. E. and Human, M. L.. A non-hereditary, host induced variation of bacterial viruses. *J. Bacteriol.*, Vol. 64, pp. 557-569.
- 28- Majumdar, A. and Adhya, S.. Demonstration of two operator elements in *gal* : in vitro repressor binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Vol. 81, pp. 6100-6104, 1984.
- 29- Mandel, M. and Higa, A.. A calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, Vol. 53, pp. 159-162.
- 30- Maniatis, T., Fritsh, E. F., and Sambrook, J.. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. 1982.
- 31- Mayer, H., Collins, J. and Wagner, F.. Cloning of the penicillin acylase of *Escherichia coli* ATCC11105 on multicopy plasmids. In Timmis, K. N. and Puhler, A. (Eds), *Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance*. Elsevier, Amsterdam, 1979, pp. 459-470.
- 32- Oliver, D. .Protein secretion in *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Microbiol.* 39 : 615-648, 1985.
- 33- Oliver, G., Valle, F., Rosetti, F., Gomez-Pedrozo, M., Santamaria, P., Gosset, G. and Bolivar, F.. A common precursor for the two subunits of the penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC11105. *Gene* 40, (1985) 9-15.
- 34- Otsuka, A. and Abelson, J.. The regulatory region of the biotin operon in *Escherichia coli*. *Nature*, Vol. 276, pp. 689-694, 1978.
- 35- Ptashne, M.. *A Genetic Switch. Gene control and Phage* . Published by Cell Press & Blackwell Scientific Publications, pp. 16-22.
- 36- Robert, F. Goldberger. *Strategies of genetic regulation in prokaryotes. Biological regulation and development*, Vol. 1, gene expression. Edited by Robert F. Goldberg, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, pp. 1-18.
- 37- Roberts, R.. *The role of restriction endonucleases in Genetic Engineering. Recombinant Molecules: Impact on Science and Society*, Beers R.F. and Basset E.G. Raven Press, New York. 1977.

- 38- Rodriguez, R., Tait, R.. Restriction Endonucleases. Recombinant DNA techniques. Addison-Wesley Publishing Company. Reading, Ma. 1983.
- 39- Savidge, T.A. (1984). Enzymatic conversions used in the production of penicillins and cephalosporins in : Vandame E. J. (ed). Biotechnology of industrial antibiotics. Marcel Dekker, New York, pp. 172-224.
- 40- Schomer, U., Segner, A. and Wagner, F.. Penicillin acylase from the hybrid strain *Escherichia coli* S K (pHM12): enzyme formation and hydrolysis of B-lactamase antibiotics with whole cells. Appl. Environ. Microbiol. 47 (1984) 307-312.
- 41- Schumacher, G., Sizmann, D., Haug, H., Buckel, P. and Bock A. Nucl. Acid. Res., Vol. 14, N 14, pp. 5713-5727, 1986.
- 42- Seeman, N. C., Rosemberg, J.M., and Rich A. (1976). Sequence specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 73, N 3, pp. 804-808.
- 43- Sellitti, A. M., Pavco, A. P., and Steege, A. D.. *lac* repressor blocks in vivo transcription of *lac* control region DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 84, pp. 3199-3203, 1987.
- 44- Simons, A.M., Tils, D., Von Wilcken-Bergmann B. and Muller-Hill B. (1984). Possible ideal *lac* operator: *E. coli lac* operator-like sequence from eukaryotic genome lack the central G.C pair. Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 81, pp. 1624-1628.
- 45- Storno, G., Schneider, T. and Gold, M.. Characterization of translational initiation sites in *Escherichia coli*. Nucl. Acid. Res., Vol. 10, N 9, 1982.
- 46- Szentirmai, A.. Production of penicillin acylase. Applied. Microbiology, Vol. 12, N 3, pp. 185-187, 1964.
- 47- Valle, F., Gosset, G., Tenorio, B., Oliver, G., and Bolivar, F.. Characterization of the regulatory region of the *Escherichia coli* penicillin acylase structural gene. Gene 50, pp. 119-122, 1986.
- 48- Vojtisek, V. and Slezak, J.. Penicillinamidohydrolase in *E. coli* III. Catabolite repression, diauxic effect of cAMP and nature of enzyme induction. Chemical Abstracts Biochemistry sections. Vol. 85, N. 10, 1976.
- 49- Wertman, K. F. and Mount, D. W.. Nucleotide sequence binding specificity of the LexA repressor of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol., Vol. 163, N 1, pp. 376-384, 1985.
- 50- Zipkas, D. and Riley, M.. Proposal concerning mechanism of evolution of the genome of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 72, N 4, pp. 1354-1358, 1975.