



7
24

Universidad Nacional Autónoma de México

Unidad Académica de los Ciclos Profesionales
y de Posgrado del C.C.H.

MUTACIONES QUE AFECTAN LAS SECUENCIAS
SHINE-DALGARNO DEL OPERON
gltBDF DE Escherichia coli

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A :
LAURA EUGENIA VELAZQUEZ MEDINA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

I. INTRODUCCION	1
1) Bioquímica de la glutamato sintasa (GOGAT).	4
2) Localización física de los genes que codifican para las subunidades de la enzima GOGAT.	5
3) Fisiología de la expresión de GOGAT y GDH.	8
4) Mutaciones que afectan la síntesis de GOGAT.	9
II. OBJETIVOS	13
III. RESULTADOS	14
1) Construcción de una fusión <u>gltB::lacZ</u> en plásmido.	14
2) Obtención de mutantes del plásmido pLLT1 con EMS.	19
3) Caracterización de las mutantes del plásmido pLLT1.	20
3.1) Fenotipo.	20
3.2) Actividades enzimáticas de las mutantes.	22
4) Subclonación y secuenciación de las mutantes del plásmido pLLT1.	25
4.1) Subclonación	25
4.2) Secuenciación	31
IV. DISCUSION	37
V. MATERIALES Y METODOS	44
VI. BIBLIOGRAFIA	68

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos aquellos que han hecho agradable todo mi tiempo dedicado a la ciencia.

En primer lugar, y muy especialmente a Laura, por ser mi compañera, amiga y maestra sin cuyo apoyo y ayuda no hubiera podido realizar este trabajo (gracias por la computadora!).

A mis compañeros de laboratorio: Auro, Lúgía, Claudia, Imelda et al., nuestro nuevo miembro José Luís, por haberme aguantado todo este tiempo y a Julia por su invaluable ayuda.

A Tere, en especial, por su constante ayuda y amistad.

Al Dr. Bastarrachea, por haberme dejado formar parte de su grupo todo este tiempo.

A los integrantes del laboratorio del Dr. Laclette.

A mis amigos de Fisiología Celular porque hicieron agradable mi Licenciatura.

A mi primer tutor, Dr. Ruy Pérez Montfort, porque creyó y sigue creyendo en mí.

A mis amigos de afuera (los cercanos y los lejanos) por ser una parte importantísima en mi vida.

A mi amiga Pollo, por todas las cosas que compartimos; esta tesis es una más.

Y a tí, que de cualquier forma, eres el mismo.

INTRODUCCION

En todos los sistemas biológicos, la asimilación de nitrógeno en macromoléculas es esencial para el crecimiento. La mayoría de los organismos vivos usan como fuente de nitrógeno, una variedad de compuestos nitrogenados que van desde el amonio, nitrato, nitritos hasta macromoléculas orgánicas complejas como la histidina, prolina, arginina, etc.

Todo el nitrógeno celular necesario para la síntesis de macromoléculas proviene de la incorporación directa del amonio, del grupo amido de la glutamina o del grupo amino del glutamato. Estos 2 últimos, son los intermediarios celulares claves en la biosíntesis de compuestos nitrogenados. El glutamato provee el nitrógeno para la síntesis de la mayoría de los aminoácidos, mientras que la glutamina lo dona para la síntesis de purinas, pirimidinas, aminoazúcares, histidina, triptofano, asparagina, NAD, y p-aminobenzoato (1).

Algunos microorganismos como E. coli y otras enterobacterias son capaces de crecer en un medio mínimo con glucosa y amonio como única fuente de carbono y nitrógeno respectivamente, ya que poseen un mecanismo para sintetizar aminoácidos y otros metabolitos nitrogenados a partir de amonio. Cuando la concentración de este ion es suficientemente alta (mayor de 1mM), el amonio puede ser incorporado directamente en glutamato gracias a la presencia de la enzima Glutamato Deshidrogenasa (GDH), cuya reacción es la siguiente :

GDH

 H_2O

Sin embargo, cuando el amonio se encuentra en una concentración menor de 0.1mM, éste es incorporado en glutamato por medio de un proceso que comprende 2 pasos, el primero involucra la amidación del glutamato endógeno en glutamina por la enzima Glutamina Sintetasa (GS); el segundo paso consiste en la transferencia del grupo amido de la glutamina al carbono α del α -cetoglutarato, lo que produce una síntesis de 2 moléculas de glutamato. Esta última reacción es llevada a cabo por la enzima Glutamato Sintasa (GOGAT) (2,3,4,5).

Las reacciones son las siguientes :

GS



GOGAT

 $\text{NADP} + \text{H}$

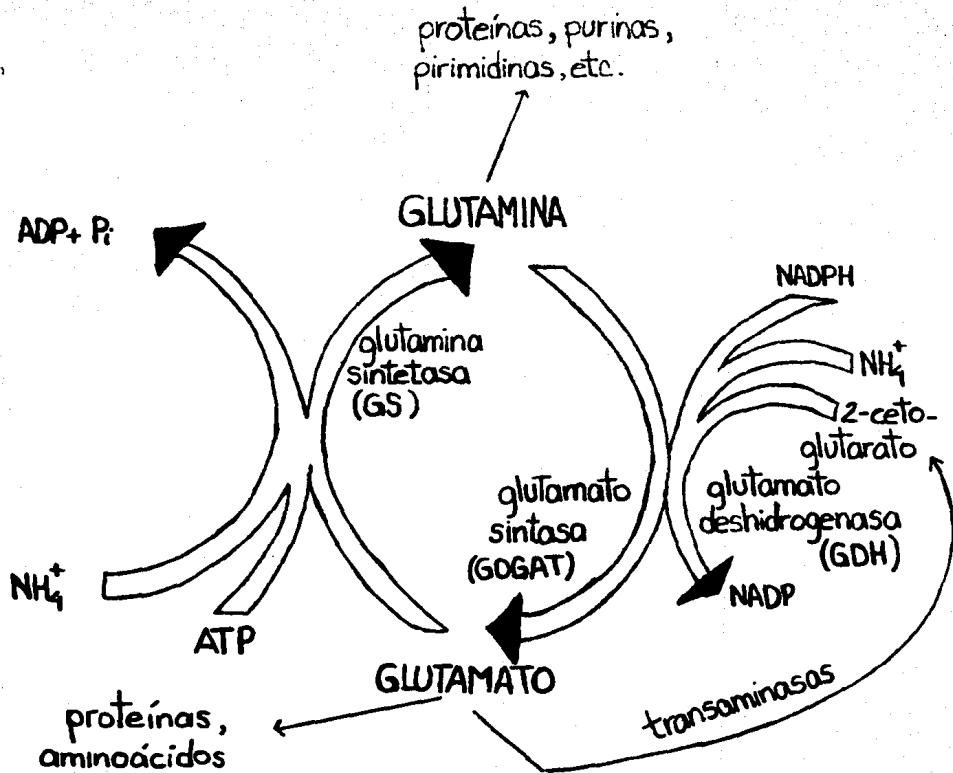


Figura 1. Ciclo de asimilación del amoníaco.

Las reacciones catalizadas por la GS, GOGAT, y la GDH, forman un ciclo de asimilación de amonio (Fig. 1). Este ciclo permite la asimilación neta de amonio en glutamina vía la GS y el reabastecimiento y mantenimiento de un nivel intracelular adecuado de glutamato vía la GOGAT y la GDH.

A pesar de la importancia central que las enzimas biosintéticas de glutamato y glutamina tienen en la asimilación y metabolismo del nitrógeno, hay poca información referente a su regulación. Mucho del trabajo fisiológico y genético hecho se ha centrado en la enzima biosintética de glutamina (GS), más que en las enzimas biosintéticas de glutamato (GOGAT y GDH). Las enzimas de glutamato tienen características que hacen particularmente interesante su estudio.

BIOQUÍMICA DE LA GLUTAMATO SINTASA (GOGAT).

La GOGAT ha sido purificada de E. coli W y K. aerogenes. La enzima tiene 2 subunidades de diferente PM en cantidades equimolares. En E. coli, las subunidades tienen un peso molecular de 135,000 d (subunidad pesada) y 53,000 d (subunidad ligera). En K. aerogenes, las subunidades tienen un PM de 175,000 d y 51,500 d (6,7).

La enzima purificada de E. coli, es una flavoproteína de hierro y azufre (8), cuyo PM nativo es de 800,000 d, lo que indica que probablemente la enzima activa está compuesta por 4 dímeros.

La enzima tiene una alta afinidad y especificidad por sus sustratos, las K_m aparentes son 5 μ M para α -cetoglutarato y 230-300 μ M para glutamina y NADPH (8).

A partir de datos cinéticos, fisicoquímicos y enzimológicos, se ha propuesto que la reacción completa de la GOGAT sea de la siguiente manera: el NADPH se pega a la subunidad ligera y transfiere los electrones a la subunidad pesada, lo cual reduce a la flavina. El α -cetoglutarato se une a la subunidad ligera, mientras que la glutamina se une a la subunidad pesada. El grupo amido de la glutamina es transferido al α -cetoglutarato y la flavina reducida reduce un intermediario propuesto, el iminoglutarato, a glutamato (9,10,11,12).

En base a este esquema, es claro que la pérdida de cualquiera de las 2 subunidades por mutación resulta en la incapacidad de catalizar la reacción.

Por lo que respecta a la GDH, esta enzima tiene un PM de 250,000 d compuesta por 5 subunidades iguales (13).

LOCALIZACION FISICA DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LAS SUBUNIDADES DE LA ENZIMA GOGAT.

Las mutaciones que resultan en la pérdida de Glutamato Sintasa, han sido localizadas en 3 especies de enterobacterias en el min 69 con respecto al cromosoma de E.coli (14,15,16).

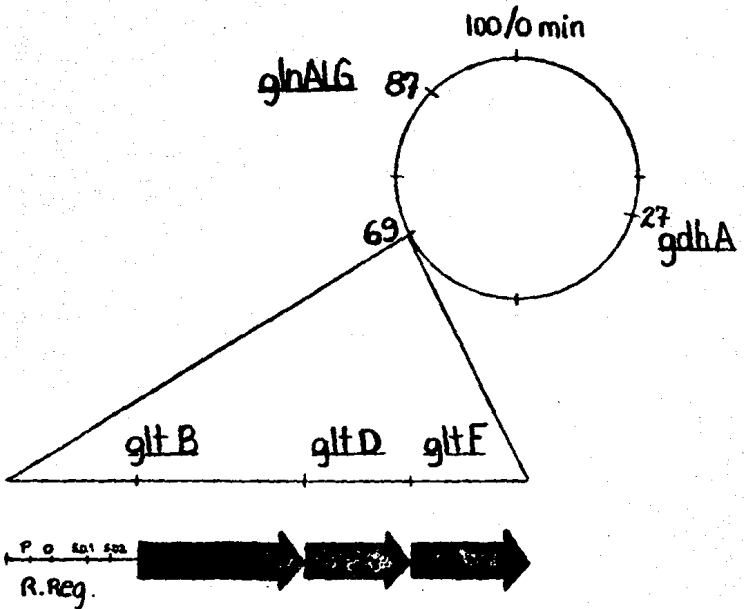


Figura 2. Localización del operón *gltBDF* de *E.coli*.

El gen estructural de la GDH (gdhA) está situado en el min 27 del cromosoma.

Los genes que codifican tanto para la GDH como para la GOGAT de E.coli ya han sido clonados (17). En el caso de GOGAT, se sabe que están contenidos en un fragmento de DNA cromosomal de 8.55 Kb (18) que codifica para cada una de las 2 subunidades, por lo que ambos genes estructurales se encuentran ligados en el cromosoma. Los 2 genes de GOGAT de E.coli han sido subclonados por separado y se ha descrito su organización física (19). El locus para GOGAT ha sido designado gltB para la subunidad pesada y gltD para la subunidad ligera (20).

Recientemente Castaño et al.(21), describieron la existencia de un tercer gene, denominado gltF, como parte del operón gltBDF de GOGAT de E.coli, al cual se le atribuye actividad regulatoria. Por medio de experimentos de hibridación DNA-RNA, se vió que estos 3 genes son parte de una unidad de transcripción que va de gltB . gltD hacia gltF, constituyendo de esta manera el operón gltBDF de (18,19,20,21).

Hace poco Bolivar et al.(22), reportaron la secuencia nucleotídica completa de la región regulatoria del operón y de los genes gltBD de E. coli K-12. Basados en la secuencia y en experimentos de extensión de primero, identificaron el posible promotor del operón, así como una secuencia palindrómica a la derecha del mismo sugestiva de una estructura similar a un operador y 2 posibles sitios de unión a ribosomas ó secuencias Shine-Dalgarno. Aunque estos sitios son importantes para el inicio de la traducción, aún no se ha reportado ningún operon en E.coli que tenga 2 secuencias Shine-Dalgarno funcionales.

FISIOLOGIA DE LA EXPRESION DE GOGAT Y GDH.

Un aspecto interesante de la síntesis de glutamato es que tanto GDH como GOGAT pueden sintetizar glutamato de manera independiente. Trabajos preliminares con mutantes de K.aerogenes y E.coli carentes de 1 de las 2 enzimas sugirieron que tanto GDH como GOGAT pueden funcionar mientras haya suficiente amonio en el medio (23,24,25).

Mutantes en GOGAT pueden crecer en medios con alta concentración de amonio, en tanto que no crecen en condiciones limitantes de amonio (1mM) (24). Estos resultados sugieren que la GOGAT es funcional en cualquier concentración de amonio pero se requiere para la asimilación de bajas concentraciones de amonio ya que la GDH sólo funciona cuando la concentración de amonio es alta.

Consistente con esto, es que la actividad de GDH en K.aerogenes es baja en cultivos crecidos en condiciones limitantes de nitrógeno (3,4,24).

Para el caso de E.coli, se ha observado que la actividad de GDH es 2 a 4 veces más alta cuando se crece en exceso de nitrógeno que en condiciones de limitación (28). Sin embargo, otros autores no han sido capaces de observar actividades altas en medios con alto amonio (4,21).

Otro aspecto curioso de la producción de glutamato, es que a pesar de que la GOGAT puede funcionar principalmente durante el crecimiento en medios con bajo amonio, se han observado actividades altas en medios con alto amonio (24,26).

Si se crece un cultivo en medio con ácido glutámico como fuente de nitrógeno, la actividad de GOGAT es nula (26).

Parecería que GOGAT puede ser regulada en respuesta a la existencia de glutamato, esto es que una forma primaria de regulación parece ser represión por glutamato y activación por depleción del mismo. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual esto ocurre.

MUTACIONES QUE AFECTAN LA SINTESIS DE GOGAT.

Cepas carentes de GDH no tienen un fenotipo detectable, pero una deficiencia de GOGAT da como resultado la incapacidad de crecer en medios con bajo amonio o con otras fuentes limitantes de nitrógeno (fenotipo Ntr-). Estas observaciones fueron hechas primero en K.aerogenes, en donde se les denominó Asm-(24,25). Estas mutantes presentaban menos del 10% de la actividad de GOGAT de la cepa silvestre.

Después se aislaron mutantes similares en S.typhimurium(27) las cuales tenían actividades de GOGAT de un 40% de la cepa silvestre.

Posteriormente, se reportó el aislamiento de mutantes con actividad de GOGAT termosensible y fenotipo Ntr-; a estas mutaciones se les denominó gltB-(14). Estudios más finos a base de mutaciones puntuales sin sentido, deleciones e inserciones de Mud1 fueron hechos más adelante en el gene gltB de S.typhimurium (20).

En el caso de E.coli, la primera mutación reportada que afectaba la síntesis de GOGAT, se le denominó gltB31(16,23).

La cepa que lleva esta mutación, la CB100, no presenta actividad detectable ni de GOGAT ni de GDH (debido a la mutación gdh51) y tiene fenotipo Ntr-.

Se ha reportado que las mutaciones gltB31 en E.coli se encuentran muy ligadas a argG (44% cotransducción con P1) y de hecho es idéntico al locus previamente denominado aspB (16). Además en varias mutantes Asm- independientes de E.coli (16) y K.aerogenes (15) la pérdida de GOGAT se debe a mutaciones ligadas a argC.

En el caso de S.typhimurium se encontró que las mutaciones que afectan la actividad de GOGAT no están ligadas a argC, aunque sí cotransducen con glnF (7%) y cod (36%) (14,20,27).

Un fenotipo interesante que presentan las cepas gltB-, además de ser Ntr-, es la incapacidad de elevar su nivel de GS en glutamina (fenotipo Gsd-) (1,5). Una posible explicación es que la pérdida de GOGAT hace imposible a la célula bajar la concentración intracelular de glutamina lo suficiente como para activar la transcripción de glnA. Se ha observado que este fenotipo puede ser suprimido por mutaciones en glnL, resultando en una síntesis constitutiva alta de GS (fenotipo GlnC) (5,16). Sin embargo, las dobles mutantes gltBglnL son incapaces de utilizar compuestos cuya degradación da amonio.

Estos datos sugieren que existe una relación entre los sistemas de control de GS y de GOGAT de E.coli aunque esta no se observe claramente en la síntesis coordinada de ambas enzimas en las diferentes condiciones probadas hasta ahora.

El plásmido híbrido que lleva los genes estructurales de GOGAT de E.coli (pRSP20) es capaz de complementar a la cepa CB100. Esta presenta ahora actividad de GOGAT y fenotipo Ntr+ (18). Esto indica que la mutación gltB31 es pleiotrópica.

Ahora se sabe que esta mutación es una deleción del operón glbDE; mediante experimentos de hibridización DNA-DNA tipo Southern de la cepa PA340 (derivada de la cepa CB100 y que lleva las mutaciones glbB1 y gdh51) con el plásmido pRSP20 como monitor, se determinó que esta cepa carece del operón glbDE.

Existen datos que apoyan la hipótesis de que la cepa PA340 tiene una tercera mutación de tipo regulatorio que también confiere el fenotipo Ntr- y que cotransduce con argQ. Al complementar esta cepa con el plásmido pRSP20, presenta una actividad de GOGAT solo 2 a 2.5 veces mayor que la cepa silvestre. Sin embargo, la cepa silvestre complementada con el mismo plásmido presenta de 8.5 a 10 veces más actividad enzimática que ella misma sin plásmido. Esto podría deberse a que en la silvestre se observa un efecto multicopia que no se aprecia en la PA340 debido a la mutación regulatoria.

Actualmente existe también otra mutación que afecta la síntesis de GOGAT, denominada glb::Ω; ésta es una inserción de un cassette Ω en el gene glb (21).

Las cepas que contienen esta mutación, no presentan niveles detectables de GOGAT y tienen fenotipo Gsd- y Ntr-. Sin embargo, todos estos efectos se revierten al complementarlas con el pRSP20.

Recientemente se observó que al complementar la mutación glb::Ω con el plásmido pGOP3 (que codifica para la subunidad pesada), ésta presentaba actividad de GOGAT muy similar a la silvestre, aunque seguía siendo Ntr-. Esto podía implicar la existencia de un tercer gene hacia abajo de glbD que interviniera en la inducción de los sistemas Ntr, de tal manera que la inserción Ω en glb fuera polar sobre la transcripción de este tercer gene.

Recientemente, se le ha atribuido al nuevo gene descrito del operón de GOGAT de E.coli.gltF, un papel central en la actividad del sistema Ntr. (21). Esto ha sido sugerido por varias evidencias :

a) experimentos de hibridización RNA-DNA tipo Northern de la cepa silvestre con el plásmido pRSP21 (derivado del pRSP20 con resistencia a cloranfenicol) como monitor, muestran un transcrito 1.5kb mayor que el esperado para los genes gltBD, por lo que existe suficiente RNA para sintetizar un polipeptido pequeño, producto de gltF.

b) los plásmidos pGOG1 y pGOG3 (ambos contienen gltF) complementan la mutación gltB225::Q para Ntr-, pero no para Gsd-. En estas mutantes la complementación de Ntr+ se lleva a cabo en la ausencia de GOGAT, lo que sugiere que la activación de Ntr ocurre, ya sea directa o indirectamente, por el producto de gltF.

OBJETIVOS

De acuerdo a los datos citados anteriormente, aún no es claro el mecanismo de regulación de la síntesis de GOGAT.

Debido a la escasa información sobre la regulación de GOGAT, el trabajo realizado en esta tesis, pretende aclarar algunas preguntas básicas sobre el mecanismo de regulación involucrado en su síntesis.

De esta manera, los objetivos particulares fueron:

- 1) la obtención de mutantes en la región regulatoria del operón glcBDF, mediante la mutagenesis de un plásmido que lleva una fusión glcB::lacZ (cuyo fenotipo Lac facilitó su aislamiento).
- 2) la caracterización de estas mutantes en condiciones de exceso y limitación de nitrógeno para dilucidar algún aspecto sobre la regulación de la síntesis de GOGAT.
- 3) la secuenciación de los plásmidos mutantes y silvestre para localizar exactamente el sitio mutado.

1. CONSTRUCCION DE UNA FUSION gltB::lacZ EN PLASMIDO.

Para obtener una fusión en el gene estructural de GOGAT, gltB, se realizó una mutagénesis dirigida utilizando un plásmido que contiene los genes para GOGAT de E.coli (21).

Como se mencionó anteriormente, el operón de GOGAT se tiene ya clonado en el plásmido pRSP20 (17).

En este trabajo se utilizó un derivado de pRSP20 denominado pRSP21 (Fig.3), en el cual se sustituyó un fragmento SmaI-SmaI de aproximadamente 3kb en el pRSP20 (este fragmento está 2kb hacia abajo del extremo 3' del gene para la subunidad ligera por lo que no se afecta la síntesis de la enzima), por un fragmento de aproximadamente el mismo tamaño que codifica para la resistencia a cloranfenicol. Este nuevo plásmido presenta una ventaja para su manipulación, ya que es posible presionar su mantenimiento en la célula utilizando medios con cloranfenicol.

El pRSP21 se utilizó para hacer una mutagénesis por inserción, para ello se utilizó un fragmento de DNA de 3kb que contiene el gen lacZ sin su región regulatoria, por lo que la β -galactosidasa se expresa gracias al promotor que se sitúe delante de él; además este fragmento está flanqueado por varios sitios de restricción, lo que permite manipularlo como cassette (Fig.3).

La estrategia experimental fue la siguiente y se encuentra en la Fig.3:

El plásmido pRSP21 se digirió con la enzima de restricción BglII, para la cual posee un sitio unico de corte. El sitio de BglII se encuentra dentro del gene para la subunidad pesada de

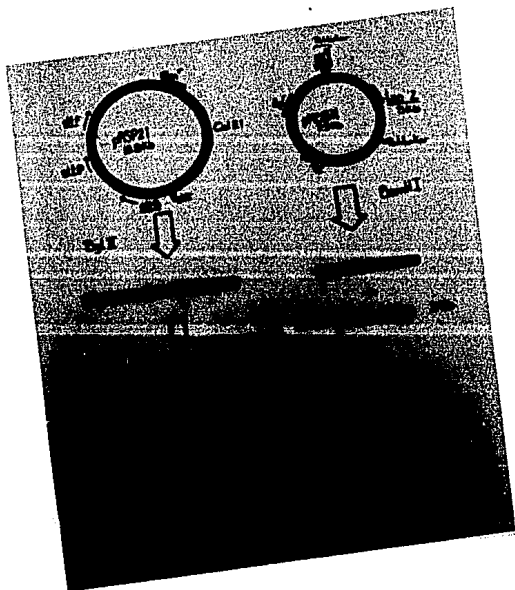


Figura 3. Esquema de la construcción de la fusión glbB::lacZ. Se insertó el cassette lacZ de 3kb en el sitio EglII único del pSP21 que interrumpe glbB.

GOGAT a aproximadamente 1.355kb del extremo 5'. Por otro lado, se digirió el plásmido pMC1871 (29) con la enzima BamHI con lo que se obtuvieron 2 fragmentos de DNA, uno de los cuales lleva el cassette de lac'Z. Este fragmento se purificó de un gel de agarosa de bajo punto de fusión y se ligó con el pRSP21 digerido con BglII sin hacer ninguna manipulación adicional, puesto que ambas enzimas generan extremos compatibles.

El plásmido resultante, pLLT1, se utilizó para transformar la cepa MC1061, seleccionando tanto para la resistencia a cloranfenicol que contiene el pRSP21, como para expresión de β -galactosidasa en medios de McConkey.

Posteriormente, se caracterizó el pLLT1 de las colonias transformantes de 2 maneras:

1) se obtuvo DNA del plásmido y se digirió con la enzima PstI, comprobándose que el cassette lacZ se encontrara insertado dentro de glfB. El plásmido silvestre pRSP21 da 2 bandas: una de ≈ 9 kb. y otra de ≈ 4.8 kb., mientras que el nuevo plásmido pLLT1, da una banda de ≈ 12 kb. y otra de ≈ 4.8 kb. (Fig. 4).

2) se parcharon las colonias transformantes en medios con amonio y glutámico como fuente de nitrógeno y con X-gal (sustrato cromogénico 5-bromo, 4-cloro, 3-indolil- β -galactósido) para ver expresión diferencial de β -galactosidasa según la fuente de nitrógeno.

Hubo una clara diferencia de los parches en los 2 medios, lo que comprueba que en aquellas que dieron colonias rojas en McConkey, la actividad de β -galactosidasa está bajo la expresión del promotor del operón de glfBDF (Fig. 5).

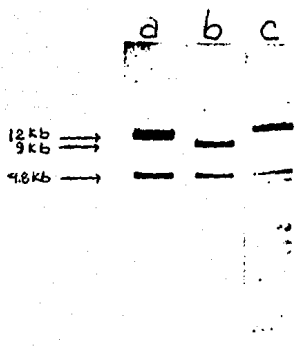


Figura 4. Patrón de restricción del pLLT1. Se digirió tanto el pLLT1 como el pRSP21 con la enzima Pst I.
Carriles: a) pLLT1
b) pRSP21
c) lambda + BstE II

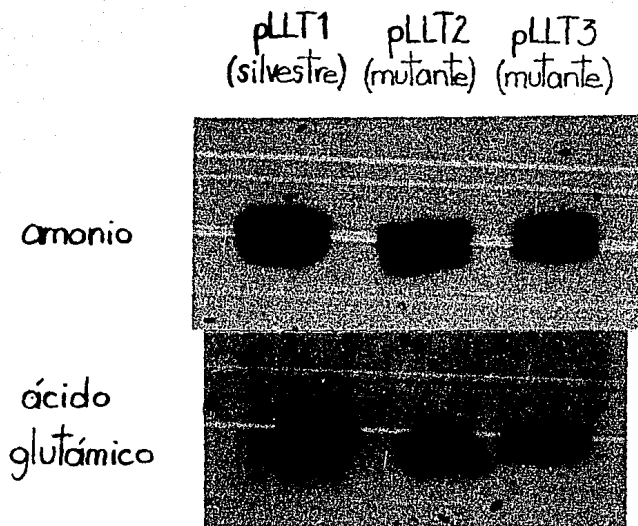


Figura 5. Medición de actividad de β -galactosidasa en caja petri en amonio y glutámico, de los plásmidos pLLT1, pLLT2 y pLLT3.

2. OBTENCION DE MUTANTES DEL PLASMIDO pLLT1 CON EMS.

Una vez que se obtuvo el plásmido pLLT1, el siguiente paso fue mutagenizarlo con etil-metano sulfonato (EMS).

Para esto, se buscó una cepa para transformarla con el pLLT1 que fuera lacY para que pudiera transportar lactosa, ya que después de mutagenizar se iba a seleccionar en medios con lactosa como fuente de carbono.

Se escogió la cepa CSH3; esta cepa presenta un fenotipo Lac- debido a una mutación puntual en lacZ.

Antes de mutagenizar, se midió su frecuencia de reversión a Lac+, la cual fue de 3.37×10^{-7} y como se esperaba una frecuencia de mutación de 10^{-8} , se decidió usarla.

Ya transformada con el pLLT1, se procedió a mutagenizar la cepa CSH3/pLLT1 con EMS tal y como se describe en materiales y métodos.

Una vez mutagenizado el cultivo, se dejó enriqueciendo a 37°C durante 48hrs en medio de selección con ácido glutámico (como medio represivo del operón gluBDE), lactosa (como medio inductor de lacZ) y cloranfenicol (Cm, como marcador del plásmido pLLT1). Se utilizó este medio porque nos permitiría seleccionar aquellas mutantes que vencieran la represión por glutámico, expresando de esta manera lacZ al utilizar la lactosa como fuente de carbono.

Al cabo de este tiempo, se espatularon diluciones 10^{-5} y 10^{-6} en el mismo medio de selección usando X-gal (como indicador de actividad de β -galactosidasa en caja petri) y se incubaron otras 48hrs.

Las colonias mutantes resultantes se verificaron en medios de amonio Cm X-gal, glutámico Cm X-gal y luria Cm X-gal para averiguar la actividad de β -galactosidasa en diferentes fuentes de nitrógeno.

Se distinguieron 5 tipos distintos de mutantes (Tabla 2) de entre los cuales se escogieron 34 colonias que eran cualitativamente diferentes a la cepa silvestre (CSH3/pLLT1) tanto en medios con amonio como con glutámico.

3. CARACTERIZACION DE LAS MUTANTES DEL PLÁSMIDO pLLT1.

1) FENOTIPO

Lo primero que se probó de las 34 mutantes elegidas, fue que el fenotipo observado fuera causado por el plásmido y no por alguna mutación en el DNA cromosomal de la bacteria. Así que se purificó DNA de plásmido de las 34 mutantes y se verificó que fuera el pLLT1.

Posteriormente, se transformó la cepa silvestre MX614 (cepa tipo utilizada en el laboratorio) con los plásmido pLLT1 mutagenizado y extraído de cada una de las 34 mutantes CSH3.

Las colonias resultantes de cada transformación se parcharon en medios de amonio Cm X-gal y glutámico Cm X-gal para verificar que presentaran la misma actividad de β -galactosidasa en caja que la cepa original de donde se había extraído cada plásmido pLLT1 mutagenizado.

Tabla 2. FENOTIPO DE LAS MUTANTES DE CSH3/pLLT1. OBTENIDAS.

Tipo de mutante	a	b
	GNH ₄ -Xgal	GGLU-Xgal
	-----	-----
c		
A	azul muy fuerte	azul muy fuerte
d		
B	azul muy fuerte	azul muy fuerte
C	azul muy claro	azul muy claro
D	blanco	blanco
E	azul claro	azul claro
CSH3/pLLT1 (cepa silvestre)	azul fuerte	azul claro

a)G= glucosa; NH₄= amonio 15mM ; X-gal usado como indicador en caja petri de actividad de β-galactosidasa.

b)G= glucosa ; Glu= glutámico 11.82 mM ; X-gal como indicador en caja petri de actividad de β-galactosidasa.

c)colonias grandes.

d)colonias chicas.

Se escogió 1 colonia de cada transformación cuyo fenotipo era el mismo que su cepa parental y se purificaron para posteriormente medirles actividad de β -galactosidasa por el metodo cuantitativo.

2)ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LAS MUTANTES.

Una vez que los plásmidos se encontraban en fondo genético MX614, se procedió a determinar la actividad enzimática de β -galactosidasa en las diferentes mutantes seleccionadas, utilizando amonio 15M y ácido glutámico como fuentes de nitrógeno.

De las 34 cepas probadas, solamente 2 de ellas presentaron diferentes actividades de β -galactosidasa con respecto a la cepa silvestre Mx614/pLLT1. Las otras 32 cepas tuvieron una actividad igual a la cepa silvestre. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Como se puede observar, la actividad de β -galactosidasa de la cepa silvestre y de las 2 mutantes, varía según la fuente de nitrógeno (ver Fig.5).

La cepa silvestre presenta una actividad 3 veces mayor en amonio 15M (aproximadamente 6600nmol de ONPG hidrolizado/min/mg de prot.) que en glutámico (aprox. 2200nmol de ONPG hidrolizado/min /mg prot.).

Una de las mutantes, la Mx614/pLLT2, tiene una actividad enzimática 1.5 veces mayor que la de la cepa silvestre tanto en amonio como en glutámico, mientras que la otra mutante, la Mx614/pLLT3, presenta una actividad de 5 a 8 veces menor que la silvestre también en ambos medios.

Tabla 3. ACTIVIDAD ESPECIFICA DE β -GALACTOSIDASA DE CEPAS MX614
CON pLLT1 MUTAGENIZADO.

Cepa	Act esp. β -galactosidasa ^a		Fenotipo (X-gal)	
	GNH	GGLU	GNH	GGLU
MX614/ pLLT1 (silvestre)	6627	2284	azul fuerte	azul claro
MX614/ pLLT2	9542	3448	azul muy fuerte	azul fuerte ±
MX614/ pLLT3	790	460	azul muy claro	azul muy claro

a) actividad específica de β -galactosidasa = nmoles ONPG hidrolizado/min/mg.prot.

G= glucosa ; NH₄= amonio 15 mM ; GLU= glutamico 11.82 mM.

En resumen, se puede decir que tanto la cepa silvestre como las 2 mutantes tienen una característica en común y es que presentan actividades de β -galactosidasa regulables por la fuente de nitrógeno en el ensayo cuantitativo, más no en el cualitativo.

En cuanto a las 32 mutantes restantes, se decidió medir la actividad de GOGAT a las cepas originales, esto es a las CSH3/pLLT1 mutagenizadas. Esto se decidió por 2 razones:

- 1) porque inicialmente al probarlas en caja petri en presencia de X-gal tanto en amonio como en glutámico, presentaban un fenotipo diferente al de la cepa silvestre.
- 2) porque las transformantes de la cepa MX614 con cada uno de los plásmidos provenientes de estas mutantes, tenían actividades de β -galactosidasa iguales a la silvestre.

Por lo tanto, se pensó que en las cepas originales, se había mutado tal vez algún regulador del operón altBDF, de tal manera que presentaban un fenotipo diferente al silvestre y que éste no tenía que ver con el plásmido pLLT1, como se mostraba al transformar a la MX614.

Al igual que la silvestre, ninguna mutante presentó actividad de GOGAT en glutámico, por lo que se concluyó que en las cepas CSH3/pLLT1, no se había mutado ningún gen relacionado con la regulación del operón altBDF.

4. SUBCLONACION Y SECUENCIACION DE LAS MUTANTES DEL PLASMIDO pLLT1.

1) SUBCLONACION

Para comprobar que el fenotipo observado y las actividades de β -galactosidasa de las mutantes MX614/pLLT2 y MX614/pLLT3, se debían a mutación en la región regulatoria y no en lacZ o en el vector, se decidió subclonar un fragmento de 1210pb que contiene las \approx 430pb de la región regulatoria mas \approx 780pb que incluyen los primeros 260 aminoácidos de la subunidad pesada de GOGAT (producto de gltB). La estrategia que se siguió fue la misma para los 2 plásmidos mutantes y el silvestre (Fig.6): el plásmido pLLT1 se digirió con la enzima HincII. Esta digestión da 12 fragmentos de los cuales sólo el de 1210pb se cortó de un gel de acrilamida, se electroeluyó y se utilizó para subclonar.

Por otro lado, se digirió el plásmido pMC1403 con la enzima SmaI, la cual lo linealizó y lo dejó de tal manera que el fragmento de 1210pb entrara en fase con lac'Z y pudiera expresarse β -galactosidasa. Este plásmido se purificó de un gel de acrilamida, se electroeluyó y se ligó con el fragmento de 1210pb del plásmido pLLT1. Esta estrategia se siguió también para las mutantes.

Los plásmidos resultantes, el pLLT4, pLLT5 y pLLT6 se utilizaron para transformar la cepa DK-1 (cepa con alta eficiencia de transformación), seleccionando tanto para la resistencia del vector, ampicilina, como para actividad de β -galactosidasa en caja.

De las transformantes obtenidas, se purificó plásmido y se checo que llevara el fragmento de 1210pb en la orientación correcta, digiriéndolo con las enzimas EcoRI y BamHI (para la presencia del fragmento de 1210pb) y con las enzimas BamHI y HindIII (para la orientación)(Fig.7).

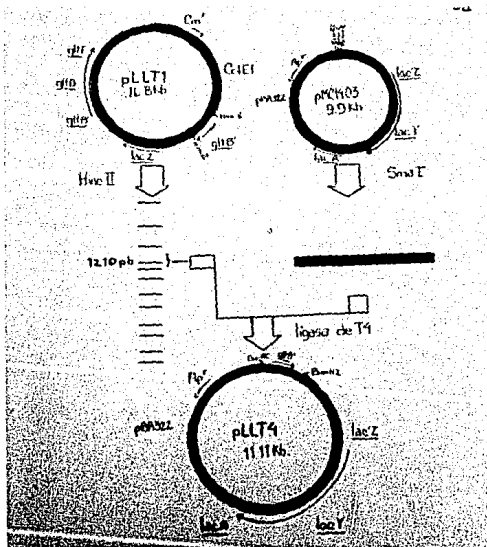


Figura 6. Esquema de la construcción del plásmido pLLT4. Se inserto un fragmento *HincII*-*HincII* de ≈ 1210 pb del pLLT1 en pMC1403. Esto se hizo tanto para el plásmido silvestre como para los mutantes.

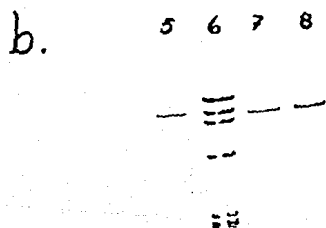
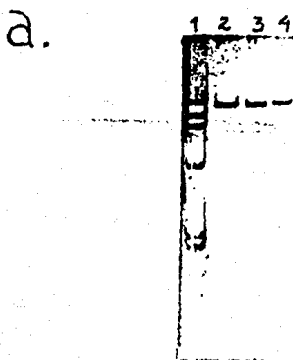


Figura 7. Patrón de restricción del pLLT4, pLLT5 y pLLT6.
 Se digirieron los plásmidos con las enzimas a) BamHI y
 EcoRI o b) HindII y BamHI.
 Carriles: 1) ØX ; 2) pLLT5 ; 3) pLLT6 ; 4) pLLT4 ;
 5) pLLT6 ; 6) ØX ; 7) pLLT5 ; 8) pLLT4.

También se verificó que las transformantes presentaran el mismo fenotipo que el plásmido pLLT1 original (ver Tabla 3) en medios con amonio aspíclina X-gal y con glutámico aspíclina X-gal.

Se escogió una transformante de cada mutante y de la silvestre que presentaban el fenotipo original y cuyo patrón de restricción coincidía con lo esperado (ver Fig.7 y Fig.8).

Como las actividades de β -galactosidasa del plásmido pLLT1 se habían hecho en la cepa silvestre MX614 y para poderlas comparar con la nueva construcción, se decidió transformar esta cepa tanto con el nuevo plásmido silvestre, pLLT4, como con los 2 mutantes, pLLT5 y pLLT6.

A estas nuevas transformantes, MX614/pLLT4, MX614/pLLT5 y MX614/pLLT6, se les verificó tanto que tuvieran el fenotipo como el patrón de restricción original esperado.

Una vez verificadas, se les midió actividad de β -galactosidasa cuantitativamente tanto en amonio como en glutámico. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Como se puede ver, al igual que en el plásmido pLLT1, la silvestre y las 2 mutantes presentan actividades diferentes según la fuente de nitrógeno.

Sólo el plásmido mutante pLLT6, presentó un comportamiento similar al de la construcción original (pLLT3): sus actividades de β -galactosidasa fueron 5 veces menores al de la cepa silvestre en los 2 medios probados. Mientras que el otro plásmido, el pLLT5, tuvo actividades casi iguales a las del silvestre. Las posibles explicaciones de esto, se mencionarán en la discusión.

En lo que respecta al plásmido silvestre, pLLT4, ahora sólo presenta una actividad 1.5 veces mayor en amonio que en glutámico en contraste con la construcción anterior (pLLT1), cuyas actividades eran 3 veces más altas en amonio que en glutámico.

pLLT4 pLLT5 pLLT6
(silvestre) (mutante) (mutante)

amonio

ácido
glutámico

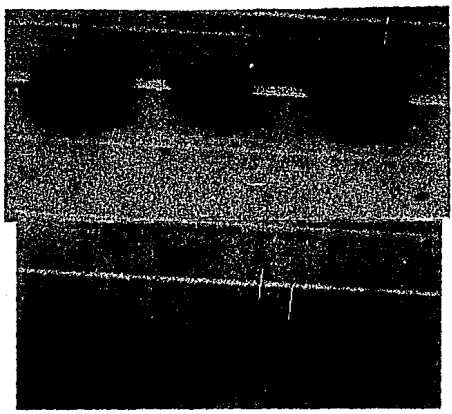


Figura 8. Medición de actividad de β -galactosidasa en caja petri en amonio y glutámico de los plásmidos pLLT4, pLLT5 y pLLT6.

**Tabla 4. ACTIVIDADES DE β -GALACTOSIDASA DE LA CEPA MX614
CONTENIENDO LOS PLASMIDOS pLLT4, pLLT5 ó pLLT6.**

Cepa	Act. esp. β -galactosidasa=		Fenotipo (X-gal)	
	NH ₄	GLU	NH ₄	GLU
MX614/ pLLT4 (silvestre)	1076	808	azul fuerte	azul claro
MX614/ pLLT5	969	674	azul fuerte	azul claro
MX614/ pLLT6	216	188	azul claro	azul muy claro

a) actividad específica de β -galactosidasa = nmoles ONPG hidrolizado/min/mg.prot.

NH₄ = amonio 15mM ; GLU= glutámico 11.82 mM.

En resumen, se puede decir que estas actividades son 3 y 10 veces menores para las mutantes pLLT6 y pLLT5 respectivamente en comparación con los plásmidos pLLT3 y pLLT2, aunque como son construcciones diferentes, no es válido compararlas.

2) SECUENCIACION

Para localizar la mutación responsable de las bajas actividades de β -galactosidasa, se decidió secuenciar el fragmento de ≈ 1210 pb siguiendo la siguiente estrategia (Fig.8):

Primero se digirió tanto el plásmido silvestre pLLT4 como las 2 mutantes pLLT5 y pLLT6, con las enzimas EcoRI y BamHI. Dichas digestiones se pasaron por un gel de acrilamida, del cual se cortó y se electroeluyó el fragmento de ≈ 1210 pb de cada una.

Posteriormente, se digirió el fragmento (el silvestre y los 2 mutantes) con la enzima HinfI, la cual da lugar a 4 fragmentos: ≈ 530 pb, ≈ 400 pb, ≈ 200 pb, ≈ 80 pb.

Esta digestión deja extremos cohesivos incompatibles con cualquiera de los sitios únicos del vector de clonación, por lo que se decidió rellenarla con la enzima DNA polimerasa I de E.coli (fragmento Klenow) para poder clonar los fragmentos en el sitio SmaI del vector de clonación (pTZ18R), ya que se necesita que estos tengan extremos rasos, al igual que el vector.

Por otro lado, se digirió el vector pTZ18R con la enzima SmaI, la cual lo lineariza. Luego se desfosforiló con fosfatasa alcalina de E.coli (BAP) y se purificó por gel de agarosa.

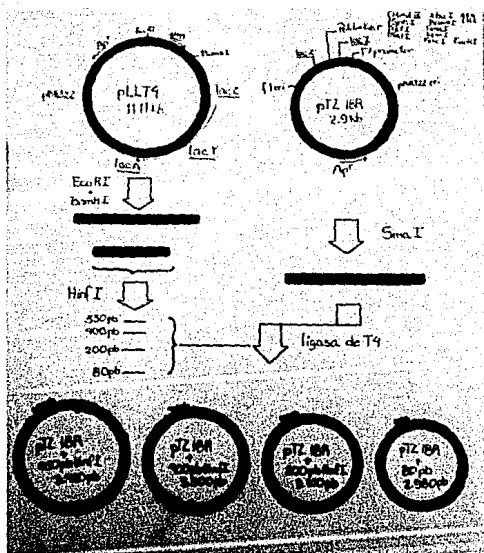


Figura 9. Esquema de la construcción de las subclonas con los fragmentos *HinfI* en pTZ18R.

El vector se ligó con los fragmentos HinfI mencionados anteriormente. Las mezclas de ligasas resultantes, se utilizaron para transformar la cepa JM103, seleccionando tanto para la resistencia del vector, ampicilina, como para el fenotipo Lac- (colonias blancas en X-gal). Esto último debido a que al clonar se interrumpe la expresión de lac'Z.

De las transformantes obtenidas en cada caso, se purificó plásmido y se digirió con las enzimas EcoRI y BamHI para identificar el fragmento HinfI que llevara cada uno.

Una vez que se identificaron los fragmentos, se purificaron las cepas con las diferentes clonas para posteriormente secuenciarlas.

Como el vector pTZ18R utilizado contiene el origen de replicación de f1, es posible obtener cadena sencilla al infectar la cepa JM103(29) con el fago M13K07 (44) y de esta manera secuenciar directamente.

Por lo que se procedió a purificar cadena sencilla de las diferentes clonas, como se menciona en materiales y métodos.

Para secuenciar las diferentes clonas, se utilizó la enzima DNA polimerasa del bacteriofago T7 (SequenaseTM; 54), siguiendo el método de Sanger et al. (43, ver materiales y métodos).

La estrategia seguida se esquematiza en la Fig.10 y las secuencias de las 2 mutantes y la silvestre se encuentran en la Fig.11.

La mutante pLLT6 tiene una sola mutación localizada en una de las secuencias reportada(22) como homóloga a la secuencia consenso de unión a ribosoma(47, bases 380 a 385). Esta mutación es un cambio de una G —| A en la primera base de este "Shine-Dalgarno".

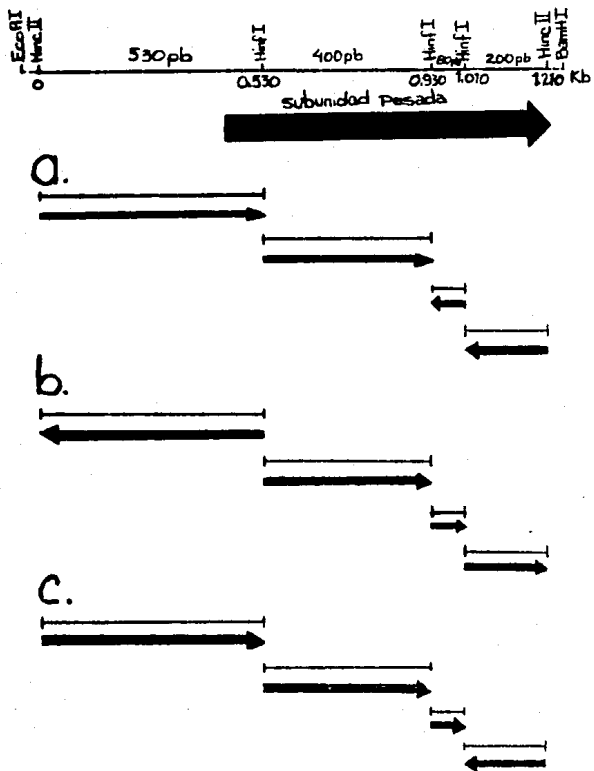


Figura 10. Esquema de la estrategia seguida para la secuenciación de las diferentes clonas. Sólo los sitios de restricción relevantes para la secuenciación se indican. La flecha gruesa indica la región codificadora para la subunidad pesada. Las clonas pTZ18R usadas están representadas por las líneas arriba de las flechas delgadas. Estas flechas muestran la dirección y extensión de las secuencias determinadas. La cola de las flechas indican la localización del primero universal ó M13 reversa utilizado. a)pLLT4 (silvestre) ; b)pLLT5 ; c)pLLT6

SUBUNIDAD PESADA DE GOGAT

1 GTTAACACAC CTTATGACAG TCAGGAATTG ACTGTTTCTC TAACGACTTC CCTTTTAGCC
 61 TTAAGATAA AATCCATTTT AATTTTCAGTC ATTTAATAAA GAATTTTTCGG CTAAGCACA
 121 TTTCTGTACC AATAAGCTTG CCATTTGACC TGTATCAGCT TTCCCGATAA GTTGGAAATC
 181 CGCTGGAAGC TTTCTGGATG AGCAGCCTGC TCATCATATT TATGCAGTAA TTGAGATCCC
 241 CTCTTCACCG TATTAACCGA TCGGAAAAGG ACAACAAGGG GCGAATCGG AGCGCCGCGT
 301 ATGACACGCA AACCCCGTCG CCACGCTCTT TCTGTGCCCC TGCGCAGCGG TTCGGAAGTG
 361 GGGTTCGCC AGAGCCTGGG GGAGGTTAC GATAIGTGT ACGATAAATC CTTGAGAGG
 421 GATAACTGTG TTTCCGCCCTG ATCGCCACACA TAGAAGGCGA ACCTAGCCAC AAGGTAGTGC
 481 GTACTGCAAT ACACGCACTG GCCCGCATGC AGCACCGTGG CGCGATTCTC GCCGATGGTA
 541 AAACCGGCGA CGGTGCGGC TTGCTGTIAC AAAAACCGGA TCGCTTTTTT CGCATCGTTG
 601 CGCAGGAGCG CGGCTGGCGT TIAGCAAAA ACTACGCTGT CGGGATGCTC TTCTGAATA
 661 AAGATCTGA ACTCGCCGCT GCCGCACGCC GCATCGTTGA AGAAGAAGTGC CAACCGGAAA
 721 CCTTGTCGAT TGTGGGCTGG CGTGATGTCC CCACTAACGA AGGCGTGCTG GGTGAAATCG
 781 CCCTCTCCTC TCTGCCACGC ATTGAGCAAA TTTTGTGAA CGCCCGGCA GGCTGGCGTC
 841 CACCGGATAT GGAGCGCGT CTGTTTATCG CCCGCCCGCG CATTGAAAAG CGTCTCGAAG
 901 CCGACAAAGA CTTCTACGTC TGTAGCCTGT CGAATCTGGT GAACATCTAT AAAGGTCTGT
 961 GTATGCCGAC GGATCTGCCG CGCTTTTATC TGGATCTTGC GGACCTGCGT CTGGAATCGG
 1021 CCATTTCGCT GTTCCACCAG CGCTTCTCCA CTAACACCGT ACCGCGCTGG CCGTGGCGCA
 1081 ACCGTTCGCC TATCTGGCCG ATAACGGTGA AATCAACACC ATCACCGGTA ACCGCCAATG
 1141 GCGTGCGCG TACTTATAAA TTCCAGACAC CGCTTATCCC TGACCTGCAC GACCGCGCAC
 1201 CGTTCGTC

Figura 11. Comparación entre las secuencias del plásmido silvestre pLLT4 y los 2 mutantes, pLLT5 y pLLT6. Los cambios encontrados con respecto a la secuencia reportada (22) son: cambios entre las bases 715 y 717 del par GA por CG, y entre las bases 718 y 719 de una C por A; inserciones: de un par GC entre las bases 607 y 608, entre las bases 622 y 623, entre las bases 982 y 983 y entre las bases 818 y 819 de una C y de una T entre las bases 955 y 956. Los cambios encontrados en la región regulatoria de los mutantes se señalan debajo de la secuencia del plásmido silvestre. el cambio en el S.D.1. corresponde al pLLT5 y el cambio en el S.D.2 corresponde al pLLT6.

La otra mutante pLL75, presenta dos mutaciones:
una inversión entre la primera base de la otra secuencia
reportada (22) como homóloga a la secuencia consenso de unión a
ribosoma (44, bases 289-293) y la base contigua 5' a ella.

La secuencia silvestre (proveniente del pRSP21) tiene la misma
secuencia reportada (22), salvo algunos cambios señalados en la
Fig.10.

Las implicaciones de estas mutaciones se discutirán en la
siguiente sección.

Debido a que existe poca información sobre la regulación de la expresión de GOGAT, en este trabajo se trató de responder algunas preguntas básicas sobre el mecanismo de regulación involucrado en su síntesis.

Con el objeto de esclarecer un poco más los mecanismos que controlan la síntesis de GOGAT, se obtuvieron mutantes en la región regulatoria del operón gluBDF.

Para ello se construyó el plásmido pLLT1, en el cual se fusionó el gene lac'Z sin su región regulatoria al gene de la subunidad pesada, gluB, mediante técnicas de ingeniería genética.

La fusión lac facilitó el aislamiento de mutantes, gracias al fenotipo Lac⁺ que confiere, el cual es fácilmente detectable. Además la fusión gluB::lac Z permitió cuantificar de una manera más sencilla, la actividad enzimática del operón gluBDF de la cepa silvestre y de las mutantes en diferentes condiciones de crecimiento.

Como se mostró en la Fig.5, hubo una diferencia marcada del plásmido pLLT1 en los 2 medios probados (amonio y glutámico), lo que comprobaba por un lado, que la actividad de β -galactosidasa estaba bajo la expresión del promotor de gluBDF y por otro que la fusión permitiría distinguir aquellas mutantes cuyas actividades fueran cualitativa y cuantitativamente diferentes a la silvestre.

Es importante mencionar que este plásmido, al igual que el pLLT4, presentó actividades detectables de β -galactosidasa en glutámico.

Este dato no coincide con lo reportado, ya que se esperaba que las actividades fueran de cero, como en el caso de la GOGAT (26). Una posible explicación para esto, es que se esté titulando la actividad del represor del operón de GOGAT, de tal manera que, como los plásmidos están en multicopia, sobrepasan la cantidad de represor capaz de reprimir el operón.

Una vez comprobado que con el plásmido pLLT1 se podía medir la actividad del operón gltBDF a través de β -galactosidasa, se decidió mutagenizarlo.

De la mutagénesis con EMS, se obtuvieron 34 mutantes que inicialmente mostraban un fenotipo diferente al silvestre tanto en amonio como en glutámico.

Pero al pasar los plásmidos mutantes a fondo genético MX614 (cepa silvestre del laboratorio) y determinarles actividad enzimática de β -galactosidasa en amonio y glutámico, sólo 2 de ellos siguieron siendo diferentes al silvestre, tanto en fenotipo como en actividades.

El resto de las mutantes fueron iguales a la cepa silvestre. Esto se comprobó también al medirles a las cepas originales (CSM3/pLLT1 mutagenizadas) actividad de GOGAT en glutámico, presentando el mismo comportamiento que la silvestre.

El hecho de que inicialmente fueran seleccionadas 34 mutantes por su fenotipo, de las cuales sólo 2 permanecieron consistentes con él, indica que el ensayo cualitativo para la detección de actividad de β -galactosidasa en caja petri mediante el indicador X-gal, no es absolutamente eficiente. Esto puede deberse a que, como el color azul observable está dado por la cantidad de X-gal hidrolizado por la colonia, tanto la cantidad de inóculo en el medio sólido como la velocidad de crecimiento

de la cepa mutante en particular, son 2 factores decisivos independientes de la actividad enzimática, que pueden influir para dar diferente intensidad de color en las colonias.

Con respecto a las determinaciones enzimáticas de β -galactosidasa de las mutantes pLLT2 y pLLT3 y la silvestre pLLT1 en la Tabla 3, se presentan sus fenotipos junto con sus actividades, tanto en amonio como en glutámico.

En primer lugar, se puede decir que en los fenotipos de las 2 cepas mutantes no se aprecia una regulación por nitrógeno (sólo en la silvestre), lo que corrobora lo mencionado anteriormente con respecto a la poca eficiencia del ensayo cualitativo de β -galactosidasa.

En cuanto a las actividades, las 3 cepas tienen un comportamiento similar, ya que estas son regulables por la fuente de nitrógeno. La cepa MX614/pLLT2 presenta alrededor de 1.5 veces más actividad de la enzima que la silvestre y para el caso de la cepa MX614/pLLT3, presenta de 5 a 8 veces menor actividad que la silvestre.

Ahora bien, como la mutagénesis con EMS se hizo en todo el plásmido pLLT1, era posible que las actividades enzimáticas y fenotipos de las mutantes se debieran a una mutación en la región regulatoria del operón glbBDF, en el resto del operón, en lac'Z, o en el vector.

Para saber si la mutación estaba exclusivamente en la región regulatoria, se subclonó un fragmento de 1210pb que incluía esta además de \approx 780pb (primeros 260 aminoácidos de la subunidad pesada) en el vector pMC1403.

Con los plásmidos resultantes, pLLT4, pLLT5 y pLLT6, se transformó la cepa DK-1 y para poder corroborar las actividades de β -galactosidasa de las mutantes y de la silvestre de esta nueva construcción con las anteriores, se transformó la MX614 con los nuevos plásmidos.

En la Tabla 4, se muestran las determinaciones enzimáticas de β -galactosidasa de las cepas MX614 que llevan los plásmidos pLLT4, pLLT5, pLLT6.

Estas actividades resultaron más bajas que las de los plásmidos pLLT1, pLLT2 y pLLT3. Para esto puede haber 3 explicaciones posibles:

- 1) al ser tanto construcciones como plásmidos diferentes, no es válido comparar sus actividades enzimáticas (6627nmol/min/mg.prot. contra 1076nmol/min/mg.prot. en el caso de la silvestre).
- 2) el número de copias de ambos plásmidos por célula son diferentes.
- 3) la proteína híbrida activa que expresan los plásmidos pLLT1, pLLT2 y pLLT3, es más estable que la producida por los plásmidos pLLT4, pLLT5 y pLLT6, de tal manera que aunque ambos tengan el mismo nivel de expresión génica, esto no se refleja en la cantidad de proteína activa producida por cada una.

Es interesante observar que, a diferencia del pLLT2, el pLLT5, presentó actividades de β -galactosidasa casi iguales a las del plásmido silvestre pLLT4. Esto pudo deberse a que el plásmido originalmente mutado, el pLLT2, tuviera 2 mutaciones que causaran las actividades altas de β -galactosidasa.

Cuando se subclonó el fragmento de 1210pb del pLLT2, se pudo eliminar una de ellas, encontrándose ahora que las actividades fueran casi silvestres.

Ahora bien, con respecto al hecho de que las actividades de β -galactosidasa del pLLT6 no muestren una regulación por nitrógeno siendo casi igual de bajas tanto en amonio como en glutámico, puede deberse a que la mutación en este plásmido sea más penetrante. Esto significa que la mutación sobrepasa el efecto de represión, haciendo que éste no se aprecie y por lo tanto las actividades sean ostensiblemente iguales en amonio y en glutámico.

Por otro lado, algo que llama la atención es el hecho de que, sólo se hayan aislado mutantes de baja expresión. Esto puede deberse al medio de selección utilizado. Recientemente se reportó una nueva técnica para seleccionar mutantes de baja expresión en fusiones lac. Esta técnica consiste en utilizar medios de selección con lactosa como fuente de carbono. Como los niveles altos de expresión del operón lac en fusiones lac en plásmidos multicopia son incompatibles con la lactosa, utilizada como fuente de carbono, estos deben ser abatidos varias veces antes de que la cepa pueda crecer. Esto parece deberse a la producción de algún compuesto inhibidor del crecimiento derivado del metabolismo de la lactosa (45).

Como aquí, después de la mutagénesis, se utilizó un medio de selección con lactosa como fuente de carbono, es posible que se haya forzado la aparición de mutantes de baja expresión como en el caso reportado.

Gracias a los plásmidos pLLT5 y pLLT6 se supo que la o las mutaciones responsables de las actividades de β -galactosidasa y fenotipos de las mutantes estaba(n) en el fragmento de ≈ 1210 pb. Por lo que se decidió secuenciarlos para saber si era una o

varias mutaciones y localizarla(s) con precisión.

Siguiendo la estrategia señalada en la Fig.9, fue posible tener en 4 fragmentos, todo el fragmento de ≈ 1210 pb representado.

La secuencia de la cepa silvestre fue comparada con la secuencia del operon glbBDF ya reportada (22), encontrándose diferencias en algunas bases.

La secuencia de las 2 mutantes presentó estos mismos cambios, por lo que las únicas diferencias encontradas entre ellas y la silvestre son consecuencia de la mutagénesis.

Ambas mutantes presentaron un cambio en la primera base de la secuencia homóloga a la secuencia consenso de Shine-Dalgarno.

Bolívar et al. (22) reportaron la presencia en el operón glbBDF de 2 secuencias homólogas a la secuencia consenso de unión a ribosomas (44).

Pero si bien no se sabe si las 2 secuencias reportadas son realmente funcionales ó sólo una de ellas, el análisis de las 2 mutantes dieron algunos indicios sobre la funcionalidad de ellas.

Al parecer por las actividades de β -galactosidasa, se puede decir que el segundo Shine-Dalgarno es el funcional, ya que una mutación en él (mutante pLLt3 y pLLT6) causa una baja de 5 veces en las actividades con respecto a la silvestre. Mientras que, una mutación en el primer Shine-Dalgarno (mutante pLLT5) no altera las actividades de β -galactosidasa.

Existen varios reportes, en los cuales se ha demostrado que el cambio de una sola base en el Shine-Dalgarno, afecta notablemente la traducción (46-49).

Por ejemplo, se han reportado fusiones galE-lacZ, en las que

una mutación puntual en la secuencia Shine-Dalgarno (cambio de una G por una A). Baja las actividades de β -galactosidasa 10 veces con respecto a la fusión silvestre (50).

Además de los datos obtenidos con la mutante pLLT6, hay evidencias que sugieren que el segundo Shine-Dalgarno puede ser el funcional: Band et al. en B. subtilis y De Boer et al en E. coli, demostraron que la presencia de 4 A ó T después del Shine-Dalgarno, dan una eficiencia de traducción muy elevada, mientras que la presencia de 4 C ó G en la misma posición bajan la eficiencia de traducción en un 50-75% respectivamente (51,52).

En el caso del operón gltBDF de E. coli, el segundo Shine-Dalgarno está seguido por la secuencia ITCA, mientras que al primer Shine-Dalgarno le sigue la secuencia CGCG.

También ha sido reportado que el codón UUG como segundo codón en el mRNA, es más eficiente que el codón ACA (53). Para el operón de GOGAT, el segundo codón del mRNA según el segundo Shine-Dalgarno sería UUG ;en cambio el segundo codón según el primer Shine-Dalgarno sería ACA.

Sin embargo, no hay que descartar completamente al primer Shine-Dalgarno. Es posible que contribuya con un poco en la unión a ribosomas, lo que explicaría la poca actividad de β -galactosidasa que se detecta en la mutante pLLT3 y pLLT6.

Se tratará de construir un plásmido en el cual se encuentre deletado el primer Shine-Dalgarno. De esta manera, se podrá observar el efecto que éste tiene sobre las actividades de β -galactosidasa.

MATERIALES Y METODOS

1. CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS

Las cepas utilizadas en esta tesis son derivadas de E. coli K-12 y al igual que los plásmidos se encuentran descritas en la Tabla 1.

Tabla 1. CEPAS Y PLASMIDOS UTILIZADOS.

C E P A	GENOTIPO	REFERENCIA
MX614	<u>galE, fli, thy</u> (<u>lac-pro</u>)	Colección del laboratorio
JM103	(<u>lac-pro</u>), <u>thi, strA</u> , <u>supE, endA, sbcB, hsdR</u> , F' <u>traD36, proAB</u> , <u>lacI^{-Z'}</u>	29
MC1061	(<u>lac-pro</u>)	30
DK-1	igual que MC1061, pero <u>recA-</u>	
CSH3	<u>trp, lacZ, strA, thi</u>	31

PLASMIDO	GENOTIPO	REFERENCIA
pMC1871	pBR322 <u>lacZ</u> , Amp ^r	30
pMC1403	pBR322 <u>lacZYA</u> , Amp ^r	30
pTZ 18R	pUC 18, ori M13, Amp ^r	44
pRSP21	<u>gltBDE</u> , Cm ^r	21
pLLT1	pRSP21:: <u>lacZ</u> (<u>gltB'</u> :: <u>lacZ</u> :: <u>glt'B</u>)	Esta tesis
pLLT2	pLLT1 mutagenizado con EMS	Esta tesis
pLLT3	pLLT1 mutagenizado con EMS	Esta tesis
pLLT4	fragmento HincII-HincII del pLLT1 en pMC1403	Esta tesis
pLLT5	fragmento HincII-HincII del pLLT2 en pMC1403	Esta tesis
pLLT6	fragmento HincII-HincII del pLLT3 en pMC1403	Esta tesis

2.CONDICIONES DE CULTIVO

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las bacterias fueron:

Medio LB (por litro)

10g NaCl

10g Peptona

5g Extracto de levadura

Cuando se requiera un medio sólido se añadan 16g/l de agar.

Medio mínimo NN (por litro)

Fosfato de potasio monobásico 13.6g

Sulfato de potasio 2.61g

Sulfato de magnesio 0.2g

Cloruro de calcio 0.01g

Sulfato ferroso 0.0005g

Glucosa 2g

Amonio 0.8g

Ajustar el pH a 7.4 con KOH

A este medio se le agrega : glucosa 0.2% final como fuente de carbono, cloruro de amonio 15mM o glutámico 0.2% como fuente de nitrógeno. Otros requerimientos como aminoácidos o vitaminas se añadieron a las concentraciones óptimas previamente determinadas. Todos los cultivos se hicieron a 37°C.

Cuando se utilizó ampicilina fue a la siguiente concentración: ampicilina (amp) 250µg/ml.

Cuando las bacterias se concentraban para medir actividad enzimática, se hacía en medio mínimo (medio NN), únicamente las sales.

DETECCION DE LA ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA EN CAJAS DE PETRI(31).

Existen varios medios selectivos para detectar la expresion de β -galactosidasa. El indicador más sensible para β -galactosidasa en medio sólido es el sustrato cromogénico 5-bromo,4-cloro,3-indolil- β -D-galactósido (Xgal)(31). El componente no da ningún color hasta que es hidrolizado, dando un precipitado color azul indigo en la colonia que expresa la actividad enzimática.

En agar conteniendo Xgal, una bacteria que expresa la β -galactosidasa forma colonias azules. El Xgal se puede usar prácticamente en cualquier medio sólido. Usualmente el compuesto se disuelve en N-N dimetil-formamida a una concentración de 20mg/ml y se espatula 0.1 ml en cada caja con aprox. 25ml de medio.

Además del Xgal, el agar de Mac Conkey también es utilizado para los mismos fines. En este medio, las colonias Lac+ son rojas y las Lac- son blancas.

MEDICION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA β -GALACTOSIDASA (31).

Otro ejemplo de sustrato cromogénico es el o-nitrofenil- β -D-galactósido. Este compuesto es incoloro, pero en presencia de la enzima se convierte en galactosa y o-nitrofenol.

El o-nitrofenol es amarillo y puede ser medido por su absorbancia a 420 nm. Si la concentración de o-nitrofenil- β -D-galactósido (ONPG) es alta, la cantidad de o-nitrofenol es proporcional a la cantidad de enzima presente y al tiempo que la enzima reacciona con él. Para que el ensayo sea lineal, el ONPG debe estar en exceso. Para mejores resultados, la cantidad de enzima debe ser tal que tome entre 15 minutos y 6 horas para desarrollar un color amarillo. La reacción se detiene añadiendo una concentración elevada de carbonato de sodio, la cual eleva el pH a 11.0 y la β -galactosidasa se inactiva (32).

Las bacterias fueron crecidas hasta fase logarítmica temprana a 37°C con agitación en medio mínimo con diferentes fuentes de nitrógeno. Después de esto, el cultivo se concentró diez veces (en el caso de las fusiones en pMC1403 con baja actividad enzimática) o resuspendida en el mismo volumen de NN (en el caso de las fusiones en pRSP21 con actividades elevadas).

1. En un tubo se mezclan:

0.1ml de extracto de células(cantidad depende de condición de crecimiento y/o plásmido).

0.9ml de buffer Z (ver más adelante)

2 gotas con pipeta pasteur de cloroformo

1 gota con pipeta pasteur de SDS al 10%

2. Se agitan en vortex durante 10 segundos

3. Se colocan los tubos a 28°C durante 5 minutos

4. Se agregan 0.2ml de ONPG (4 mg/ml) a cada tubo y en este momento empieza la reacción que debe hacerse a 28-30°C.

5. Agitar en vortex durante 5 segundos.

6. Detener la reacción a los 5' y 10'agregando 0.5ml de carbonato de sodio 1M a cada tubo. Los tiempos de reacción, así como la concentración de células debe estandarizarse para cada caso.

7. Centrifugar a 8 000 rpm durante 15 minutos.

8. Leer absorbancia a 420 nm.

El ONPG se prepara en buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7.0.

El buffer Z contiene:

Fosfato de sodio dibásico	0.06 M
Fosfato de sodio monobásico	0.04 M
Cloruro de potasio	0.01 M
Sulfato de magnesio	0.1 M
β -mercaptoetanol	0.05 M

Toda la mezcla debe estar a un pH de 7.0

Se define como actividad específica de la β -galactosidasa el número de moles de o-nitrofenil- β -D-galactósido hidrolizado por minuto por miligramo de proteína.

La cantidad de proteína por ensayo fue determinada por el método de Lowry (33).

PURIFICACION DE PLASMIDOS

A) En pequeña escala. "Miniprep".(34)

Para el análisis de clonas individuales buscando la construcción correcta o la transformante deseada, se realizaron extracciones partiendo de 2ml de cultivo crecido a fase estacionaria ó una asada de bacterias.

1. Se prepara la solución A: glucosa 50 mM
EDTA 10 mM
Tris-HCl pH 8.0 25 mM

A dos mililitros de solución A se añaden 4 mg de lisozima y 50 μ l de una solución de RNasa (10 mg/ml en acetato de sodio 0.2 M pH 5.0 hervida durante 10 minutos).

2. Resuspender una asada de la cepa en cuestión ó la pastilla obtenida después de centrifugar 2 ml de bacterias crecidas toda la noche, en 100 μ l de la solución A con lisozima y RNasa.

3. Mantener en hielo durante 30 minutos.

4. Agregar 100 μ l de NaOH 0.2N. SDS 1%; se mezclan cuidadosamente y la solución se aclara, debido a la lisis celular; se agregan 75 μ l de acetato de sodio 3 M pH 4.8 y se mezcla, formándose un precipitado grumoso.

5. Mantener en hielo durante 15 minutos

6. Centrifugar en frío durante 5 minutos a 14, 000 rpm.

7. Colectar 200 μ l de cada tubo y pasar a un tubo nuevo.

8. Agregar 600 μ l de etanol absoluto e incubar en un baño de hielo seco-etanol durante 20 minutos.

9. Centrifugar 15 minutos en frío a 14, 000 rpm.

10. Descartar el sobrenadante y disolver la pastilla en 100 ul de acetato de sodio 2 M.

11. Agregar 300 ul de etanol absoluto y dejar de nuevo 20 minutos en un baño de hielo seco-etanol.

12. Centrifugar 15 minutos en frio a 14,000 rpm.

13. Descartar el sobrenadante y lavar la pastilla dos veces con etanol al 70% frio.

14. Se deja secar la pastilla y una vez seca es resuspendida en 20 ul de Tris-EDTA 10-1 mM pH 8.0.

Esta preparación, dependiendo del tamaño del plásmido y del número de copias dentro de la bacteria, permite purificar hasta 1 ug de DNA en condiciones que no interfieren con su digestión enzimática.

B) En gran escala. "Maxiprep"(35).

Para purificación de plásmido en cantidades de 1 a 3 mg. y en condiciones listas para restricción, clonación, etc. pueden utilizarse varios métodos, se muestra una modificación que se utiliza en el laboratorio.

1. Inocular 500 ml de LB con 5 ml de un pre- cultivo con el antibiótico que requiera el plásmido a purificar.

2. Crecer hasta una densidad óptica de 0.8 a 1.0 a 550 nm.
3. Añadir 170 mg de cloranfenicol en polvo al cultivo.
4. Dejar toda la noche con agitación.
5. Al día siguiente, coleccionar las células en dos botellas de 250 ml centrifugando en el rotor GSA de Beckman a 7,000 rpm durante 15 minutos.
6. Resuspender las células en 30 mililitros de buffer de sacarosa (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 80 mM, sacarosa 10%) y dividir en 3 tubos de 50 ml (10 ml por tubo).
7. Añadir 4 ml de una solución de lisozima 10 mg/ml en buffer de sacarosa (1.33 ml por tubo).
8. Dejar 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Congelar y descongelar dos veces.
10. Centrifugar en el rotor SW40 durante 20 minutos a 35,000 rpm (3 tubos).
11. Guardar el sobrenadante y precipitarlo con 1/2 volumen de LiCl 20% y 1 volumen de isopropanol.
12. Congelar en hielo seco y descongelar.
13. Centrifugar 20 minutos a 12,000 rpm.

14. Lavar la pastilla con etanol al 70% frío.
15. Secar las pastillas.
16. Resuspenderlas en un total de 5 ml de Tris- EDTA 10-1 mM a pH 7.5.
17. Añadir 30 μ l de una solución de RNasa 10 mg/ml en acetato de sodio 0.2M (No olvidar hervirla durante 10 minutos).
18. Incubar 1 hora a 37°C.
19. Pasar a un tubo corex y extraer con un volumen igual de fenol destilado, 2 veces, 1 vez con fenol-cloroformo 50-50 v/v y 1 vez con cloroformo.
20. A la fase acuosa de esta última extracción añadir 1/10 de acetato de sodio 2 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto.
21. Congelar en hielo seco durante 20 minutos.
22. Descongelar y centrifugar a 10,000 rpm durante 15 minutos.
23. Lavar la pastilla con una solución fría de etanol al 70% y secar.
24. Resuspender en Tris-EDTA 10-1 mM pH 7.5 según su concentración.

25. Correr en un gel de agarosa una muestra con 3 μ l para cuantificar.

FRECUENCIA DE REVERSION A LAC⁺ DE LA CEPA CSH3 (31).

1. Se toma 1 colonia de la cepa CSH3 y se pasa a un tubo con 1ml. de medio mínimo.
2. Se hacen diluciones hasta 10^{-8} . Se plaquean 2 cajas de luria con la dilución 10^{-8} para cuenta viable.
3. Se agrega 0.4ml. de la dilución 10^{-8} a 20 tubos con 1.6ml. de luria.
4. Se incuban toda la noche con agitación a 37°C.
5. Una vez crecidos los cultivos, se toma 0.1ml. de cada tubo y se hacen diluciones de 10^{-2} y 10^{-3} , las cuales se plaquean en luria para hacer cuenta viable de nuevo.
6. Por otro lado, se toma 0.1ml. de 10^0 y la dilución 10^{-1} de cada tubo y se espatula en medio de selección (medio mínimo + lactosa). Se incuban a 37°C toda la noche.

Cálculos:

Cuenta viable = no. células

tubo en la dilución

Frecuencia de reversión = total colonias en 10^{-1} /no.tubos

cuenta viable de los tubos ya crecidos
en la dilución 10^{-4}

MUTAGENESIS CON ETIL METANO SULFONATO (EMS) (31).

1. Se crecen las cepas (experimental y control) toda la noche (5ml.) en luria + los requerimientos de la cepa.
2. Se centrifugan 10 min. a 5 rpm y se resuspende en 2.5ml. de medio mínimo.
3. Se prepara aparte una solución con 2.4 ml. del mismo medio mínimo usado para resuspender las bacterias + 0.1 ml. de EMS.

4. Se mezclan las bacterias con la solución y se deja uncubando 4 hrs. a 37°C sin agitación.
5. Se centrifugan 5 min. a 5 rpm y se lava 2x con tiosulfato de sodio 5% con el mismo volumen.
6. Se reuspenden 2 ml. de la mezcla de bacterias + EMS en 10 ml. de medio mínimo de selección. Se hace por duplicado.
7. Se incuban a 37°C con agitación.
8. Una vez que el cultivo experimental está crecido se hacen ddiluciones 10⁻⁶ y 10⁻⁸ y diluciones 10⁰ y 10⁻³ del control.
9. Se espatula de cada dilución de cada matraz experimental 3 cajas con medio de selección.
10. Del matraz control sólo se espatula 2 cajas con medio de selección, 1 de cada dilución.
11. Se incuban a 37°C el tiempo necesario.

DETERMINACION ENZIMATICA DE GLUTAMATO SINTASA (GOGAT)(36).

Se determinó actividad enzimática de GOGAT según el método descrito por Mears et al.(38).

DIGESTION DE ACIDOS NUCLEICOS

Para todas las manipulaciones de DNA, construcciones y mapeos físicos de los plásmidos se utilizaron enzimas de restricción de casas comerciales conocidas como Amersham, Biolabs, Promega, etc. etc.

Las condiciones utilizadas fueron las recomendadas para cada enzima. Las reacciones se incubaron por lo general a 37°C por el tiempo necesario.

DEFOSFORILACION (37).

En todas las construcciones que se mencionarán en este trabajo, el vector de clonación y/o expresión fue defosforilado con la enzima fosfatasa alcalina bacteriana (BAP) para evitar la recircularización del vehículo y favorecer la ligación con las moléculas de inserto.

Una reacción típica de defosforilación lleva de 100 a 200 ng de DNA del vector, 10 unidades de BAP y un buffer de defosforilación (Tris 10mM pH 8) en un volumen de 400µl. Según el tipo de extremos que tenga el vector son las condiciones de tiempo y temperatura de la reacción.

El vehículo defosforilado se extrae una vez con fenol, una vez con fenol-cloroformo 50:50 v/v y una vez con cloroformo antes de precipitarse con 1/10 de acetato de sodio 3M pH 4.8 y etanol. El DNA se seca, se resuspende en Tris-EDTA 10-1 mM y se pone a ligar.

CONVERSION DE FRAGMENTOS CON EXTREMOS 5' SOBRESALIENTES A EXTREMOS RASOS (38).

Los extremos 5' sobresalientes fueron rellenos usando la actividad de DNA polimerasa del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de E.coli.

1. Se pone la siguiente reacción:

fragmento a rellena (hasta 1µg de DNA en 14µl de H ₂ O)	
fragmento Klenow de DNA polimerasa I de <u>E.coli</u>	1µl
(5u/µl)	
2mM mezcla de los 4 dNTP's (concentración final 0.04mM)	0.4µl
H ₂ O	5µl
	<hr/>
Vol.final	20µl

2. Mezclar e incubar 60' a temperatura ambiente. Luego calentar 15' a 70°C.

3. Pasar a hielo. Poner a ligar con el vector previamente defosforilado

No es necesario purificar el fragmento después de tratar con Klenow, ya que generalmente se lleva a cabo la reacción de ligar después de ésta.

LIGACION DE FRAGMENTOS DE ACIDOS NUCLEICOS (39)

Normalmente después de defosforilar el vector y purificar el inserto por electroelución, la construcción de las fusiones se llevó a cabo ligando el vector con el inserto en una reacción a 16°C catalizada por la ligasa del fago T4 en un buffer de ligación.

ELECTROELUCION DE DNA DE GELES DE AGAROSA O ACRILAMIDA (40).

Después de que la muestra ha migrado dentro del gel y se tife con una solución de bromuro de etidio 200µg/ml, se observa el gel bajo una lámpara de luz ultravioleta de onda larga, seleccionando la banda de interés y contrándola con una navaja.

El trozo de agarosa o acrilamida se coloca en el interior de una bolsa de diálisis de poco diámetro (6.4mm) y poro pequeño (para moléculas de 20,000 a 14,000) con buffer de electroelución (TBE 0.1X).

Se aplica una corriente eléctrica hasta que el DNA sale de la agarosa y queda en suspensión dentro de la bolsa. Se extrae el buffer con una micropipeta y se coloca en un microtubo, donde será extraído con fenol, fenol:cloroformo 50:50 v/v y cloroformo para después ser precipitado con acetato de sodio 2M pH 4.8 y etanol absoluto.

TRANSFORMACION BACTERIANA POR EL METODO DE CLORURO DE CALCIO
(41).

Siempre que se quería introducir un plásmido a una cepa receptora, se utilizó el método de transformación que permeabiliza a las células por un tratamiento de cloruro de calcio.

1. Crecer las células hasta 40 u. klett en medio rico.
2. Dejar el cultivo en hielo durante 10 minutos.
3. Centrifugar a 5,000 rpm durante 10 minutos.
4. Guardar la pastilla celular y resuspenderla en la mitad del volumen de cloruro de calcio 100 mM estéril.
5. Incubar en hielo durante 30 minutos.
6. Centrifugar a 5,000 rpm durante 10 minutos.
7. Guardar la pastilla y resuspenderla con mucho cuidado en la misma solución de cloruro de calcio (1/10 del volumen original).
8. Dividir en alícuotas de 200 μ l según los plásmidos a transformar. añadir de 20-50ng de plásmido por alícuota y dejar en hielo durante una hora.

9. Dar un choque calórico de 2 minutos a 42°C.
10. Pasar a hielo 2' y añadir 800µl de Luria a cada tubo de transformación.
11. Incubar a temperatura permisiva durante 30 minutos.
12. Centrifugar a 5,000 rpm durante 5 minutos y espatula la pastilla de bacterias en cajas con medio de selección.

PURIFICACION DE CADENA SENCILLA PARA SECUENCIA (42).

1. Poner un precultivo con la cepa JM103 con el plásmido PTZ 18R que lleve clonado el inserto a secuenciar.
2. Inocular 5ml de Luria con ampicilina con 50µl del precultivo.
3. Crecer con agitación a 37°C hasta una D.O._{600nm} de 0.3 a 0.6.
4. Agregar en ese momento 1×10^8 fagos M13 K07.
5. Dejar una hora a 37°C con fuerte agitación.
6. Tomar 100µl e inocular 3ml de Luria con kanamicina, dejar con agitación fuerte (250 rpm) a 37°C toda la noche.

7. Centrifugar 1.5 ml del cultivo de toda la noche en un tubo eppendorf a 10 000 rpm 5 minutos, 2 veces.
8. Recoger, finalmente, 1.2ml de sobrenadante.
9. Poner 0.3 ml de polietilén glicol y mezclar cuidadosamente (El PEG se prepara en NaCl 2.5 M a una concentración final de 20%).
10. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Centrifugar a 14, 000 rpm durante 15 minutos.
12. Secar la pastilla perfectamente.
13. Resuspender en 200 μ l de Tris-EDTA 10-1 mM pH 8.0
14. Extraer: 2 veces con fenol
 - 1 vez con fenol-cloroformo 50:50 v/v
 - 1 vez con cloroformo
15. Precipitar con 1/10 de Acetato de sodio 2 M pH 4.8 y 2.5 vol. de etanol absoluto. Congelar.
16. Centrifugar 20 minutos en frio.
17. Secar y resuspender en 100 μ l de Tris-EDTA 10-1 mM.

18. Correr en un gel de agarosa al 1% y cuantificar.
19. Precipitar los 90 μ l restantes con 9 μ l de acetato de sodio 2 M pH 4.8 y 225 μ l de alcohol absoluto.
20. Congelar en hielo seco.
21. Centrifugar 20 minutos en frio.
22. Lavar dos veces con etanol al 70% colocando en hielo seco durante 30 minutos cada vez y centrifugando 10 minutos.
23. Secar y resuspender en 15 μ l de Tris-EDTA 10-1 mM pH 7.5.
24. Guardar a -20°C y secuenciar 7 μ l.

SECUENCIACION DE DNA POR EL METODO DE SANGER (43).

Una de las metodologías para la secuenciación de ácidos nucleicos es la de Sanger (43) llamado comunmente método por terminación de cadenas ó método de los dideoxi.

El plásmido utilizado para secuenciar en esta tesis es el pTZ 18R que mide $\approx 3\text{kb}$.

1. Para cada templado, se hace la siguiente reacción de alineación:

primero M13 reversa	0.5pmol
DNA	0.5-1.0pmol
buffer de alineación 5X (200 mM Tris-HCl pH 7.5 100 mM MgCl ₂ 250 mM NaCl)	2ul
H ₂ O para un volumen final de 10ul	

2. Calentar la reacción a 65°C durante 3 min., luego dejar que se enfríe lentamente hasta temperatura ambiente.

3. Aparte se preparan las siguientes mezclas:

Mezcla de Marcaje (dil 1:5):

mezcla para marcarje de nucleotidos (1.5 µM dGTP, 1.5µM dCTP, 1.5µM dTTP)	2ul
H ₂ O	8ul

SequenasaTM (dil 1:7):

sequenasa	1ul
Tris-EDTA 10-1 mM pH 7.5 frio	7ul

4. Para marcar la reacción de alineación, una vez que ésta bajó a temperatura ambiente, se le añade lo siguiente:

DTT (0.1 M)	1ul
Mezcla de marcaje	2ul
[α- ³² S] ó [α- ³² P]ATP	SuCi (≈0.5ul)
Sequenasa TM (dil 1:7)	2ul (3 U)

El volúmen final es $\approx 15\mu\text{l}$. Mezclar bien e incubar por 5 min. a temperatura ambiente.

5. Se etiquetan 4 tubos "G", "A", "T", "C". Se llenan con $2.5\mu\text{l}$ de la mezcla de terminación de dideoxi (cada mezcla contiene: G: $80\mu\text{M}$ dGTP, $8\mu\text{M}$ ddGTP, 50mM NaCl; A: $80\mu\text{M}$ dATP, $8\mu\text{M}$ ddATP, 50mM NaCl; T: $80\mu\text{M}$ dTTP, $8\mu\text{M}$ ddTTP, 50mM NaCl; C: $80\mu\text{M}$ dCTP, $8\mu\text{M}$ ddCTP, 50mM NaCl.) y se precientan a 37°C - 42°C .

6. Cuando la reacción de marcaje esta completada, se transfieren $3.5\mu\text{l}$ de ella a cada uno de los 4 tubos precalentados con la mezcla de cada dideoxi. Se incuban por 5 min. a 37°C - 42°C .

7. Al cabo de ese tiempo, se añaden $4\mu\text{l}$ de la solución de terminación (95% formamida, 20mM EDTA, 0.05% azul de bromofenol y 0.05% xilen-cianol ff) a cada tubo, se mezcla y se congela.

8. Para cargar el gel de secuencia, se calientan las muestras a 75°C durante 3 min. y se carga de 2- $3\mu\text{l}$ en cada carril.

Las reacciones para secuenciar el DNA clonado y purificado como cadena sencilla del pTZ 18R se llevan a cabo utilizando un "kit" comercial que contiene las soluciones de nucleótidos y dideoxinucleótidos además de la enzima y los buffers necesarios. El utilizado aquí fue el paquete de "Sequenase" de la casa comercial Amersham.

Las muestras fueron corridas en geles de acrilamida al 4% y 6% con 50% de urea a 2,000-2.500 voltios.

Los geles se secaron a 60°C toda la noche antes de poner a exponer con una placa Kodack X-O mat K durante 24 horas, después de lo cual se leyeron las secuencias.

BIBLIOGRAFIA

1. Tyler, B. (1978). Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. Annu. Rev. Biochem. 47, 1127-62.
2. Tempets, D. . W. ., Meers, J. . L. . and Brawn, C. M. (1970). Synthesis of glutamate in Aerobacter aerogenes by a hitherto unknown route. Biochem. J. 117, 405-407.
3. Meers, J. . L. ., Tempest, D. . W. ., and Brown, C. . M. . (1970). Glutamine (amide):2-oxoglutarato amino transferase oxido-reductase (NADP) an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. J.of Gen. Micro. 64, 187-194.
4. Senior, P. . (1975). Regulation of nitogen metabolism in E.coli and K.aerogenes: Studies with the continuous-culture technique. J.Bacteriol. 123, 407-418.
5. Magasanik, B. . (1982). Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. Ann.Rev.Genet. 16, 135-68.
6. Miller, E. . S. . and Stadman, E. . R. . (1972). Glutamate synthase from Escherichia coli an iron sulfide flavoprotein. J. Biol. Chem. 247, 7407-7419.
7. Trotta, P. . P. ., Platzer K.E.B., ., Haschemeyer, R.H. and Meister, A. . (1974). Glutamine-binding subunit of glutamate synthase and partial reactions catalized by this glutamine amidotransferase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4607-11.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

69

8. Miller, R. . E. . (1975). Glutamate synthase from Escherichia coli.
An iron-sulfide flavoprotein in "The Enzymes of Glutamine
Metabolism" Prusier S and Stadman E.R. eds. Academic Press N.Y.
183, 205-.
9. Mäntsälä, P. ., and Zalkin, H. (1976). Active subunits of
Escherichia coli glutamate synthase. J. Bacteriol. 126, 539-541.
10. Geary, L. ., and Meister, A. (1977). On the mechanism of glutamine-
dependent reductive amination of α -cetoglutarate catalized by
glutamate synthase. . J. Biol. Chem. 25.3501-3508
11. Rendina, A. . R. ., and Orme-Johnson, W. . H. . (1978). Glutamate
synthase: On the kinetic mechanism of the enzyme from Escherichia
coli. Biochemistry 17, 5388-93.
12. Bower, H. ., and Zalkin, H. . (1983). Chemical modification and
ligand binding studies in the Escherichia coli glutamate synthase
Biochemistry 22, 1613-1620.
13. Veronese, F. . M. ., Boccu, E. ., and Conienti, L. . (1975).
Glutamate dehydrogenase from Escherichia coli: Induction,
purification and properties of the enzyme. Biochim. Biophys. Acta
377, 217-228.
14. Fuchs, R. . L. ., Madonna, M. . J. ., and Brenchley, J. . E. .
(1982). Identification of the structural genes for glutamate
synthase and genetic characterization of this region of the
Salmonella typhimurium chromosome. J. Bacteriol. 149, 906-915.

15. Gaillardin, C. . M. ., and Magasanik, B. . (1978). Involvement of the product of the *glnF* gene in the autogenous regulation of glutamine synthetase formation in *Klebsiella aerogenes*. J. Bacteriol. 133, 1329-1388.
16. Pahel, G. ., Zelenetz, A. ., and Tyler, B. . (1978). *gltB* gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 133, 139-148.
17. Covarrubias, A. ., Sanchez-Pescador, R. ., Osorio, A. ., Bolivar, F. ., and Bastarrachea, F. . (1980). ColE1 hybrid plasmids containing *Escherichia coli* genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine. Plasmid 3, 150-164.
18. Lozoya, E. ., Sanchez-Pescador, R. ., Covarrubias, A. ., Vichido, I. ., and Bolivar, F. . (1980). Tight linkage of genes that encode two glutamate synthase subunits of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 144, 616-621.
19. Garciarribio, A. ., Lozoya, E. ., Covarrubias, A. ., and Bolivar, F. . (1983). Structural organization of the genes that encode two glutamate synthase subunits of *Escherichia coli*. Gene 26, 165-170.
20. Madonna, M. . J. ., Fuch, R. . L. ., and Brenchley, J. . E. . (1985). Fine structure analysis of *Salmonella typhimurium* glutamate synthase genes. J. Bacteriol. 161, 356-360.
21. Castaño, I. ., Bastarrachea, F. ., and Covarrubias, A. . (1988). *gltBDF* operon of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 170, 821-827.

22. Oliver, G. ., Gosset, G. ., Sanchez-Pescador, R. ., Lozova, E. ., Ku, L. .M. ., Flores, N. ., Becerril, B. ., Valle, F. . and Bolivar, F. . (1987). Determination of the nucleotide sequence for the glutamate shynthase structural genes of Escherichia coli K-12. Gene 60, 1-11.
23. Berbrich M.A. (1972). A glutamate-dependent phenotype in Escherichia coli K-12: the result of two mutations. Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 1498-1503.
24. Brenchley, J. . E. ., Prival, M. . J. ., and Magasanik, B. . (1973). Regulation of enzymes responsible for glutamate formation in Klebsiella aerogenes. J. Biol. Chem. 248, 6122-6128.
25. Brenchley, J. . E. ., and Magasanik, B. . (1974). Mutants of Klebsiella aerogenes lacking glutamate dehydrogenase. J. Bacteriol. 117, 544-550.
26. Brenchley, J. . E. ., Baker, C. . A. ., and Patil, L. . G. . (1975). Regulation of the ammonia assimilatory enzymes in Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 124, 182-189.
27. Dendinger, S. . M. ., Patil, L. . G. ., and Brenchley, J. . E. . (1980). Salmonella typhimurium mutants with altered glutamate dehydrogenase and glutamate synthase activities. J. Bacteriol. 141, 190-198.

DOUBLED FOR D. G. B. - B. O.

28. Riba, L. . . Becerril, B. . . Servin-Gonzalez, L. . , Valle, F. . . and Bolivar, F. . (1980). Identification of a functional promoter for the Escherichia coli gdhA gene and its regulation. *Gene* 71, 233-246.
29. Messing, J. . , Crea, R. . , and Seeburg, P. . H. . (1981). A system for shotgun DNA sequencing. *Nucleic Acid Res.* 9, 309-321.
30. Casadaban, M. . J. . , Martinez-Arias, A. . , Shapira, S. . K. . , and Chou, J. . (1983). β -galactosidase gene fusion for analysis gene expression in Escherichia coli and yeast. *Meth. Enzymol.* 100, 293-308.
31. Miller, J. . (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor , Cold Spring Harbor, N.Y.
32. Vieira, J. . , and Messing, J. . (1987). Production of single stranded plasmid DNA. *Meth. Enzymol.* 153, 3-11.
33. Lowry, O. . H. . , Rosenbrough, N. . J. . , Fors, A. . L. . , and Raudall, R. . J. . (1951). Protein measurements with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
34. Ish-Horowitz, D. . , and Burke, J. . F. . (1981). Rapid and efficient cosmid vector cloning. *Nucl. Acids. Res.* 9, 2989-2991.
35. Maniatis, T. , Fritsch, E. . F. . , and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor , -.

36. Meers, J. . L. ., and Tempest, D. . W. . (1970). Glutamine (amide): 2-oxoglutarate amino transferase oxido-reductase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 64, 187-194.
37. Chaconas, G., and Van de Sande, J. . H. . (1980). 5'-³²P labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Meth. Enzymol.* 65, 75-80.
38. Wartell, R. . M., and Reznikoff, W. . S. . (1980). Cloning DNA restriction endonuclease fragments with protruding single stranded ends. *Gene* 9, 307-310.
39. Bahl, C. . P. ., Mariani, K. . J. ., Slawinsky, R. . W. . J. ., and Narang, S. . A. . (1976). A general method for inserting specific DNA sequences. *Gene* 1, 81-85.
40. Mc Donnell, M. . W. ., Simon, M. . N. ., and Studier, F. . W. . (1977). Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J. Mol. Biol.* 110, 119-123.
41. Mandel, M. . A. ., and Higa, A. . (1970). Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53, 154-160.
42. Schreier, P. . H. ., and Cortese, R. . (1979). A fast and simple method for sequencing DNA cloning in the single-stranded bacteriophage M13. *J. Mol. Biol.* 129, 169-172.

43. Sanger, F. ., Nicklen, S. ., and Coulson, A. . R. . (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5469.
44. Shine, J. ., and Dalgarno, L. . (1974). The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1342-46.
45. Charlier, D. ., Weyens, G. ., Roovers, M. ., Piette, J. ., Bacquet, C., Pierard, A., and Glansdorff, N. . (1988). Molecular interactions in the control region of the carAB operon encoding Escherichia coli carbamoylphosphate synthetase. J. Mol. Biol. 204, 867-877.
46. Jacob, W. . F. ., Santer, M. ., and Dahinerg, A. . E. . (1987). A single base change in the Shine-Dalgarno region of 16S rRNA of Escherichia coli affects translation of many proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4757-4761.
47. Weyens, G. ., Charlier, D. ., Roovers, M. ., Pierard, A. ., and Glansdorff, N. . (1988). On the role of Shine-Dalgarno sequence in determining the efficiency of translation initiation at a weak start codon in the car operon of Escherichia coli K-12. J. Mol. Biol. 204, 1045-1048.
48. Dunn, et. al. (1978). Mutations of bacteriophage T7 that affect initiation of synthesis of the gene 0.3 protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2741-2745.

49. Schwartz, et. al. (1981). Mutations that affect lamB gene expression at a posttranscriptional level. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2937-2914.
50. Bingham, A. . H. ., and Busby, W. . S. . J. . (1987). Translation of the galE and coordination of galactose operon expression in Escherichia coli: effects of insertions and deletions in the non-translated leader sequence. Mol. Microbiol. 1, 117-124.
51. Band, L. ., and Henner, D. . J. . (1984). Bacillus subtilis requires a stringent Shine-Dalgarno region for gene expression DNA. DNA 3, 17-22.
52. DeBoer, H. . A. ., Hui, A. ., Comstock, L. . T. ., Worgat, E. ., and Vasser, M. . (1983). Portable Shine-Dalgarno region: a system for a systematic study of defined alterations of nucleotide sequences within Escherichia coli ribosome binding sites. DNA 2, 231-235.
53. Looman, A. . C. ., Bodlsender, J. ., Comstock, L. . J. ., Eaton, D. ., Jhurani, P. ., DeBoer, H. . A. ., and Van Knippenberg, P. . H. . (1987). Influence of the codon following the AUG initiation codon on the expression of a modified lacZ gene in Escherichia coli. EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J. 6, 2489-2492.
54. Tabor, S., Richardson, C.C. (1987). DNA sequence analyses with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. PNAS 84, 4767, 4771.