

03062
15
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

**Caracterización de dos mutaciones involucradas en la
regulación del operón glbBDF de Escherichia coli.**

T E S I S

**para obtener el grado de
Maestro en Investigación Biomédica Básica**

presenta

LIGIA JUDITH DEL SOCORRO SOBERANIS TEJERO

FALLA DE ORIGEN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

1991



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

ABREVIATURAS

1 INTRODUCCION

- Antecedentes generales del metabolismo nitrogenado
- Organización física y localización genética de los genes de GOGAT
- Fisiología de la expresión de GOGAT
- Generalidades bioquímicas de GOGAT
- Mutaciones que afectan la síntesis de GOGAT

2 OBJETIVOS

3 MATERIAL Y METODOS

4 RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla de cepas y plásmidos

I.- Mutación glt-227::Mud1

a) Caracterización del fenotipo Ntr.

b) Segregación de la mutación glt-227::Mud1(Ap^R Lac⁺).

c) Determinación de la actividad enzimática de GS, β -galactosidasa y GOGAT en diferentes fuentes de nitrógeno.

d) Mapeo por transducción con P Vir de la mutación
1

glt-227::Mud1 y determinación de la actividad específica de GOGAT de la MX1310 en NH⁺₄ 15 mM.

e) Caracterización de la actividad enzimática de la

β -galactosidasa de MX1307 y MX1309, en diferentes fuentes de nitrógeno.

II.- Mutación gltG-228.

a) Identificación de la mutación gltG-228 en la cepa PA340.

b) Hibridación en colonia contra gltB.

c) Demostración de la existencia de los genes gltBDF en las tres cepas gltB⁺, por rescate de marcadores.

d) Determinación de la actividad enzimática de GOGAT a cepas que contienen los genes gltBDF en el genoma silvestre de MX1176.

e) Caracterización de la actividad enzimática de GS y GOGAT de la MX1302, en diferentes fuentes de nitrógeno.

f) Mapeo por transducción con P Vir de la mutación

1

gltG-228.

5 CONCLUSION

6 BIBLIOGRAFIA

ABREVIATURAS

DNA = Acido desoxiribonucleico
RNA = Acido ribonucleico
A.E. = Actividad especifica
BSA = Albumina bovina sérica
CTAB = Bromuro de cetil trimetilamonio
d = Daltones
SDS = Dodecil sulfato de sodio
D.O = Densidad óptica
EDTA = Etilendinitrilotetracetato disódico
°C = Grados Centígrados
g = Gramos
TRIS = Hidroximetil amino metano
h = Horas
l = Litro
µg = Microgramos
µl = Microlitro
mg = Miligramo
ml = Mililitro
mm = Milímetros
mM = Milimolar
min = Minuto
M = Molar
ng = Nanogramos
nm = Nanómetros

NADP = (β - Nicotinamida adēnīn dinucleótido fosfato oxidado)

NADPH = (β -Nicotinamida adenīn dinucleótido fosfato reducido)

ONPG = O- nitrofenil β - D galactósido

rpm = Revoluciones por minuto

U = Unidades

ufp = Unidades formadoras de placa

Aut = Utilización de arginina como fuente de nitrógeno

INTRODUCCION

En todos los sistemas biológicos la incorporación del nitrógeno a macromoléculas y a numerosos compuestos de bajo peso molecular, es esencial para el crecimiento. Las vías metabólicas para el metabolismo nitrogenado pueden ser divididas en dos clases:

a) Las vías asimilatorias necesarias para la utilización del nitrógeno de compuestos que se encuentran en el medio.

b) Y las vías biosintéticas que permiten la producción de compuestos nitrogenados para la célula.

En casi todas las células el glutamato y la glutamina sirven como donadores de nitrógeno para reacciones biosintéticas, por lo tanto, el conocimiento de la formación de glutamato y glutamina a partir de varias fuentes de nitrógeno es muy importante para comprender el crecimiento celular.

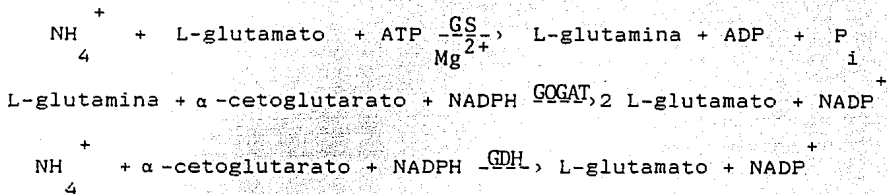
En las enterobacterias, todo el nitrógeno celular para la síntesis de macromoléculas, deriva de la glutamina y del glutamato o directamente de la incorporación de amonio (32).

El glutamato cede su grupo amino, para la síntesis de aminoácidos y proteínas, mientras la glutamina cede su grupo amido para la síntesis de purinas, pirimidinas, aminoazúcares, histidina, triptófano, asparagina, NAD^+ y p-aminobenzoato.

Cuando la concentración del NH_4^+ en el medio es mas de 1 mM, éste es incorporado directamente a glutamato, glutamina y

asparagina y cuando la concentración es menor de 0.1 mM entonces es incorporado sólomente a glutamina.

Las reacciones responsables de la asimilación de amonio y para la síntesis de glutamato y glutamina en medios que contienen amonio son las siguientes:



La glutamino sintetasa (GS) es la única enzima capaz de biosintetizar L-glutamina, mutaciones en glnA, gene estructural de la glutamino sintetasa causan auxotrofia a glutamina (25,16).

Las reacciones catalizadas por la GS y GOGAT, forman el ciclo de la asimilación de amonio.

Para las enterobacterias las fuentes preferidas de nitrógeno y carbono, son amonio y glucosa en medios mínimos, aunque también pueden utilizar al nitrógeno de una gran variedad de compuestos orgánicos tales como arginina, prolina, histidina, etc, y algunas especies de Klebsiella pueden utilizar, NO_3^- , NO_2^- y N_2

(32).

El crecimiento en estas fuentes de nitrógeno orgánico, es más lento que en amonio, a este crecimiento se le llama en limitación de nitrógeno, y a los sistemas que se inducen por esta

limitación se les denomina Ntr.

Estos sistemas Ntr involucran la formación de las enzimas que degradan estas fuentes de nitrógeno y los sistemas de transporte para estas fuentes (25).

La regulación fina de la actividad y síntesis de la GS en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno se conoce con detalle (25), en contraste con la glutamato sintasa.

Debido a la importancia de estos sistemas y a la poca información que se tiene sobre la regulación del operón gltBDF que codifica para la glutamato sintasa, es nuestro objetivo tratar de obtener información que ayude a entender su regulación.

Organización física de los genes de GOGAT.

En E. coli, la enzima GOGAT tiene dos subunidades no idénticas en cantidades equimolares. El gene gltB codifica para la subunidad grande de 135,000 d, el gene gltD codifica para la subunidad chica de 53,000 d (22, 19) y son genes contiguos (8, 14, 12).

Recientemente en el laboratorio (7) se reportó la presencia de un tercer gene denominado gltF involucrado en la respuesta Ntr; los dos genes estructurales y el tercer gene regulatorio forman parte de una unidad transcripcional que constituye el operón gltBDF.

Las mutaciones que resultan en la pérdida de la glutamato sintasa han sido localizadas en el min 69 del mapa de E. coli Figura 1, (24).

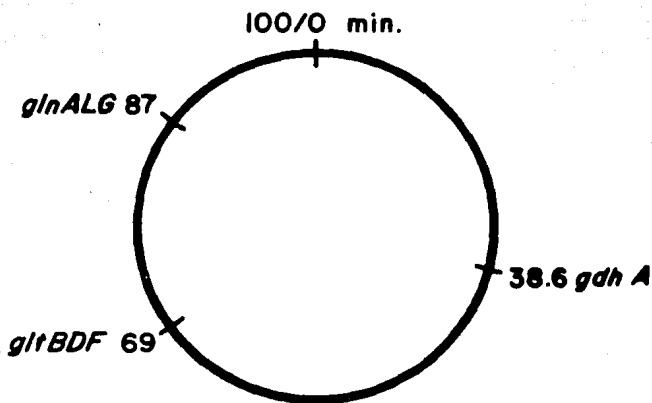


Figura 1. Mapa de Escherichia coli, localización del operón gltBDE en el min 69.

Recientemente se reportó (23), la secuencia nucleotídica de los genes *gltB* y *gltD* de *Escherichia coli*. Los autores identificaron en el extremo 5' del DNA un sitio de inicio de transcripción y un promotor funcional de la subunidad grande, otras posibles secuencias regulatorias son descritas.

Bioquímica de la Glutamato Sintasa

La glutamato sintasa, se abrevia GOGAT; éste es su nombre trivial derivado de glutamina amidotransferasa 2 oxoglutarato aminotransferasa (oxidoreductasa, NADP) (E.C. 2.6.1.53).

Hay dos características que distinguen a la glutamato sintasa de otras amidotransferasas ya bien estudiadas.

Primero, la glutamato sintasa es una flavoproteína fierro-azufre. Los grupos Fe-S están dentro de la subunidad grande (17, 18, 26). Quizás la estructura compleja de la glutamato sintasa refleja alguna función desconocida además de la síntesis de glutamato ya que las estructuras Fe-S son típicas de enzimas involucradas en el transporte de electrones y reducción-oxidación (27).

Segundo, tiene los sitios catalíticos en las dos subunidades, la glutamina se une a la subunidad grande (*gltB*) y su grupo amido es transferido al α -cetoglutarato unido a la subunidad chica (31,19).

Fisiología de la Expresión de la Glutamato Sintasa.

Realmente se conoce poco acerca de la regulación de la síntesis de la glutamato sintasa.

De los escasos estudios reportados, un grupo que trabaja con K. aerogenes encontró niveles muy altos de GOGAT en bajo NH_4^+ en comparación con los cultivos crecidos en amonio en exceso (20).

El grupo de Magasanik (6), usando una cepa diferente de K. aerogenes, encontró que los niveles de GOGAT eran mas bajos en condiciones de limitación de amonio o glutamina, que aquellos cultivos crecidos en amonio en exceso.

K. aerogenes o E. coli crecidas con glutamato como única fuente de nitrógeno contienen niveles bajos de GOGAT (20,29).

Aunque no es posible hacer enunciados definitivos acerca de la regulación de GOGAT a partir de los datos presentados, es claro que la síntesis de GOGAT está regulada. La primera forma de regulación aparece por la represión por glutamato o la activación por la privación del mismo, aunque se conoce muy poco acerca de este mecanismo.

Cabe hacer notar que aunque el glutamato puede ser sintetizado por la GOGAT y la GDH, esta última enzima sigue una vía de biosíntesis independiente de la GOGAT (11, 15, 6).

Un fenotipo interesante que presentan las cepas gltB, es que son Ntr^- (24), incapaces de elevar su nivel de GS en condiciones limitantes de nitrógeno (32, 16) y carecen de actividad de

GOGAT. La relación entre la biosíntesis de la glutamato sintasa y el sistema Ntr es sugerida por el hecho de que el fenotipo Ntr de mutantes en gltB puede ser suprimido por mutaciones en glnL (16, 24), el cual resulta en una alta concentración de glutamino sintetasa independiente de la fuente de nitrógeno del medio.

- Mutaciones que afectan la síntesis de GOGAT

Brenchley et al. (1973), (6) reportaron en Klebsiella aerogenes una mutante que carece de la actividad enzimática de GOGAT, ésta no puede crecer en medios mínimos que contienen amonio como única fuente de nitrógeno a concentraciones menores de 1 mM. Mutantes que no tienen actividad de GOGAT y GDH, son auxótrofos de glutamato (5).

Dendinger et al. (1980), (10) aislaron en Salmonella typhimurium mutantes que tenían alteradas las actividades de GOGAT (un 25% con respecto a la actividad normal de la cepa silvestre) y la GDH, las cuales no podían crecer en medios mínimos con glucosa como fuente de carbono y amonio a concentraciones menores de 1 mM como fuente de nitrógeno. Ambas mutaciones fueron localizadas en el mapa de S. typhimurium, en sitios diferentes a los encontrados en mutaciones que causan fenotipos similares en K. aerogenes y E. coli.

Fuchs et al. (1982), (11) localizaron los genes estructurales

que codifican para la glutamato sintasa y los caracterizaron genéticamente en S. typhimurium.

Ya se había demostrado que mutaciones en la glutamato sintasa, en S. typhimurium se encontraban en el min 69 del mapa cromosómico (11). No se conocía, cuál de las dos subunidades era afectada por estas mutaciones, en 1985 Madonna, et al usaron estas mutantes, para aislar delecciones con Tn10 e inserciones con Mu cts dl para obtener un mapa fino de la región que codifica para la glutamato sintasa. El análisis permitió definir que gltB codifica para la subunidad grande y gltD para la subunidad pequeña.

Pahel et al. (1978), (24) realizaron estudios genéticos y fisiológicos con la mutante CB100 y otras mutantes derivadas de ésta. Los autores reportaron que ésta cepa mutante era incapaz de utilizar una amplia variedad de compuestos nitrogenados como arginina, prolina, y -aminobutirato y glicina. Durante el curso de este estudio encontraron que la posición reportada del locus de gltB era incorrecta y por transducción con P₁, observaron que gltB cotransduce 44% con el locus de argG (24).

En E. coli, dos genes aparentemente análogos a gltBD y que tienen la misma organización genética a gltBD de S. typhimurium han sido clonados (12, 14).

Castaño et al. (1988), (7) en experimentos de hibridación encontraron un RNAM tricistrónico que muestra la presencia de un

tercer gene, glitF, cuyo producto es una proteina regulatoria del sistema Ntr, localizada en el min 69 de E. coli. La información del sistema genómico glitBDF es aún incompleta, por lo que es un sistema muy interesante para estudiar.

Antecedentes.

Con el objeto de obtener mayor información sobre el operón glnALG, en el laboratorio Laura Velázquez, aisló por inserciones al azar de Mud1 en el genoma silvestre de E. coli, dos clases de mutantes con fenotipo Aut, una clase de las cuales tenían afectada la actividad de GOGAT siete veces más baja con respecto a la silvestre, éste dato sugería la existencia de una probable mutación regulatoria sobre el operón gltBDF. En este trabajo se continuó el estudio de estas mutantes y a la mutación que presentó un efecto sobre la expresión del operón gltBDF se le denominó glt-227::Mud1.

Por otra parte, en el laboratorio durante la caracterización de la cepa MX988 se observó la presencia de una mutación regulatoria; que afectaba la expresión del operón gltBDF, abatiendo la actividad de GOGAT siete veces aproximadamente con respecto a la silvestre (Tesis de Maestría de Irene Castaño).

Resultaba interesante esta mutación regulatoria, ya que como se mencionó anteriormente no hay mucha información sobre la regulación de este operón.

Estos dos trabajos, apoyaban la hipótesis de una probable proteína activadora del operón gltBDF, posibilidad muy interesante, y bajo éste marco se estudiaron estas dos mutaciones, los resultados obtenidos durante su caracterización los presento a continuación.

OBJETIVO

Objetivo General:

Este trabajo forma parte de un proyecto, que tiene como objetivo general, tratar de entender como se regula la expresión del operón gltBDF que codifica para la glutamato sintasa en E. coli.

Objetivo Particular:

Caracterizar dos mutaciones que afectan la expresión de la glutamato sintasa en E. coli.

MATERIAL Y METODOS.

1.- Cepas Bacterianas

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

2.- Reactivos

Todas las sustancias fueron grado reactivo, obtenidas de las casas comerciales: Difco Lab., Baker, Sigma Co, Merck, Amershan.

3.- Condiciones de cultivo

Las cepas se mantuvieron en tubos de agar inclinado con medio de Luria, los cuales fueron resemebrados a intervalos de un mes.

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

- Luria (21) que contiene 1% de bactotripton, 0.5% de extracto de levadura y 1% de cloruro de sodio.

- Medio de LC: Medio de Luria, mas 25 mM de cloruro de calcio con 0.6% de agar.

- Medio de LCTG: Medio sólido de Luria adicionado de 25 mM de cloruro de calcio, timina 25 µg/ml y glucosa 0.2% concentración final. La timina se esterilizó por filtración y la glucosa por autoclave durante 20 min. a 15 lb, 121 C, la timina y la glucosa se agregaron después de esterilizar el medio en el autoclave, y cuando tenia aproximadamente 50 C de temperatura.

- Medio Mínimo NN (8) que contiene fosfato monobásico de potasio 13.6 g/l, sulfato de potasio 2.61 g/l, sulfato de magnesio

heptahidratado 0.2 g/l, cloruro de calcio 0.01 g/l, sulfato ferroso heptahidratado 0.05 mg/l. Este medio se esterilizó en el autoclave 20 min, a 15 lb y 121 C. Se le adicionó al medio glucosa 0.2% concentración final como fuente de carbono; cloruro de amonio 15 mM (amonio en exceso) o 0.5 M (limitación de amonio), o glutamina 1 mg/ml, o arginina 0.2% concentración final como fuentes de nitrógeno. Todo esto se esterilizó independientemente por filtración (21).

Otros requerimientos como aminoácidos o vitaminas se esterilizaron por filtración en las condiciones previamente determinadas (21).

Los antibióticos se adicionaron en las siguientes concentraciones: kanamicina 50 µg/ml, tetraciclina 25 µg/ml, cloranfenicol 10 µg/ml, ampicilina 100 µg/ml.

Para los cultivos en medios sólidos, se utilizaron los mismos medios, adicionando agar 15 g/l.

4.- Preparación de lisados P₁ VirA.

Para los experimentos de mapeo por transducción generalizada se utilizó el fago P₁ VirA. Para la propagación del fago en la cepa donadora, ésta se cultivó en medio de Luria hasta la fase exponencial (40 UK).

Se tomaron 0.5 ml del cultivo y se mezclaron con 0.1 ml de bacteriófagos diluidos a 1×10^{-7} u.f.p./ml en Luria estéril, la mezcla se transfirió a tubos con 3 ml de LC.

La mezcla con agar suave se vació en cajas de Petri con medio

de LCTG; seguidamente se incubaron aproximadamente 12 hrs a 37^o C. Luego se raspó el agar suave con espátula, se agregaron 3 ml de Luria y se transfirió a tubos; se añadió un volumen de cloroformo en la proporción de 1:20 y se agitó vigorosamente en vortex. Después se centrifugó a 5000 rpm y el sobrenadante se recuperó y se añadió nuevamente cloroformo, se guardó a 4^o C.

5.- Titulación de P. VirA.

1

Los lisados se titularon infectando a la cepa sensible AB1157, cultivada en medio de Luria y recuperada en 0.01 M de sulfato de magnesio y 0.005 M de cloruro de calcio. Se mezclaron 0.1 ml de la suspensión celular con diferentes diluciones del fago P. después de 20 min de incubación a 37^o C sin agitación, se vaciaron sobre cajas de LCTG con ayuda de agar suave LC.

6.- Preparación de lisógenas de P. Cm.

1

Se puso un precultivo de la cepa que se quería hacer lisógena, se dejó crecer toda la noche, al día siguiente se inocularon 10 ml de Luria 1:100 y se dejaron crecer hasta 30 UK, se plaquearon 0.3 ml de la cepa en cajas de LCM. Se esperó a que se absorbiera muy bien lo plaqueado, después se pusieron seis gotas del P Cm sobre la cepa plaqueada, se incubó a 30^o C durante

1

12 hrs, se parcharon las colonias que crecieron en donde se goteo el fago sobre cajas de LCM se incubó a 30^o C y 42^o C. Se seleccionó una cepa que era ^R Cm a 30^o C y temperatura sensible a 42^o C.

7.- Preparación de lisados de P. Cm.

1

Se creció el precultivo de la MX1061 a 30°C en Luria mas magnesio 0.01 M concentración final, al día siguiente se creció la cepa MX1061 a 30°C en 50 ml de Luria adicionado de sulfato de magnesio a la misma concentración usada anteriormente hasta 40 UK, se centrifugó y resuspendió en el mismo medio concentrando cinco veces, se incubó con agitación a 40°C durante 2 hrs, se pasó a 37°C durante 1:30 hrs con agitación, se trató con cloroformo en la relación 1:20, se centrifugó, se tomó el sobrenadante y se repitió el tratamiento con cloroformo, se guardó el sobrenadante a 4°C.

8.- Titulación de P. Cm.

1

Se creció el precultivo de la AB1157 durante toda la noche, al día siguiente se crecieron 10 ml de la cepa hasta 40 UK, se centrifugó durante 5 min a 5000 rpm. La pastilla se resuspendió en la mitad del volumen en que se creció en un medio de adsorción (0.01 M de sulfato de magnesio heptahidratado mas 0.005 M de cloruro de calcio). Se hicieron diluciones del fago de 10⁻¹ hasta 10⁻⁷ en Luria mas cloruro de calcio 25 mM. Se tomaron 0.1 ml de células de la AB1157 y se mezclaron con la dilución deseada del fago, se incubó a 37°C durante 20 min sin agitación, se puso el control bacteria y control fago, después se añadió a cada tubo agar suave de LC, se agitó la mezcla, des-

pués se vació sobre cajas de medio sólido de LCTG, se incubó a 37 °C durante 12 hrs. Posteriormente se cuantificaron las placas líticas.

9.- Transducciones con P. Vir.

Una vez propagado y titulado el P. Vir (cepa donadora), se cultivó la cepa receptora en medio de Luria hasta 40 U.K. se centrifugó y se concentró diez veces en medio de Luria. Posteriormente se separó en dos tubos cada uno con 0.5 ml de la suspensión de bacterias. Se añadió 0.5 ml a cada tubo de una solución de cloruro de calcio 0.05 M y sulfato de magnesio 0.02 M, al tubo de la transducción se le añadió 0.1 ml de P. Vir propagado en la cepa donadora adecuada diluido 1×10^{-7} u.f.p./ml. Al control se le añadió 0.1 ml de medio de Luria. Después de incubarlo a 37 °C durante 20 min sin agitación, se centrifugó y las células se lavaron dos veces con NN. Estas se resuspendieron en 0.1 ml de NN y se plaquearon en cajas de medio selectivo.

10.- Transformación de plásmidos híbridos.

Se creció un precultivo con 5 ml de medio de Luria durante toda la noche, después se inocularon 10 ml de medio de Luria 1:100 con el precultivo y se dejó crecer a 37 °C, hasta una D.O. de 0.5, se pasó a hielo 10 min, luego se centrifugó 5 min a 5000 rpm, se decantó el medio y se resuspendió en medio volumen de cloruro de calcio 100 mM, seguidamente se puso 15 min

en hielo, se centrifugó 5 min a 5000 rpm, se decantó el medio, después se resuspendió en 1/15 de cloruro de calcio 100 mM. Se dejó en hielo durante 30 min (este paso puede ser de 30 min a 24 hrs). Luego se tomaron 200 µl de células mas 100 ng de DNA de plásmido híbrido, se puso el control de células, se dejó 30 min en hielo, luego se dió un choque de calor a 42 C durante 2 min, después se pusieron 2 min en hielo. Se añadió 0.8 ml de Luria y se dejó incubando a 37 C durante 45 min, posteriormente se centrifugó y resuspendió en 0.2 ml de Luria y se plaquéó 1/10 y 9/10 en cajas con los medios selectivos.

11.- Purificación de DNA cromosomal.

Se creció la cepa en un litro de Luria hasta fase exponencial tardía, seguidamente se centrifugó a 7000 rpm durante 15 min, se resuspendió la pastilla con el poco medio que le quedaba al decantar, luego se agregó y resuspendió en 10 ml/l de cultivo en solución amortiguadora de 25% de sacarosa, Tris 50 mM pH 8.0, EDTA 1.0 mM pH 8.0, se mantuvieron en hielo los agregados celulares y se separaron agitando sin lisar las células. Seguidamente se añadió por litro de cultivo: 3 ml de EDTA 0.3 M pH 8.0, 1 ml de lisozima (5 mg/ml en Tris HCl 0.025 M pH 8.0), 0.1 ml de RNasa (10 mg/ml en acetato de sodio 0.1 M, EDTA 3.3 x 10⁻⁵ M pH 5.0, precalentado a 80 C durante 10 min), se agitó suavemente, se dejó reposar durante 15 min en hielo, se añadió 3 ml de tritón "lytic mix" 3x (3 ml de tritón al 10 %, 75 ml

de EDTA 0.25 M, 15 ml de Tris 1 M pH 8.0 y 7 ml de agua), agitando suavemente, se dejó reposar en hielo por 15 min. Luego se centrifugó en tubos de polipropileno de 50 ml a 10,000 rpm a 4 °C durante 30 min, después se decantó el sobrenadante, la pastilla se disolvió en aproximadamente 10 ml de solución amortiguadora A 1x (Solución amortiguadora A 10x: Tris 0.5 M pH 7.5, EDTA 20 mM, SDS 5%). Después se agregó 1/10 de volumen de proteasa K (5 mg/ml en solución amortiguadora A previamente incubada a 37 °C durante 30 min). Luego se agregó 1/10 de volumen de RNasa (5 mg/ml en solución amortiguadora B {Tris 50 mM, EDTA 2 mM pH 7.5}), prehecha a baño María a 80 °C durante 10 min. ajustando a que llegue a una concentración final de 0.1 a 0.5 mg/ml. Posteriormente se incubó toda la mezcla a 37 °C durante 60 min, se extrajo dos veces a temperatura ambiente con dos volúmenes de fenol, se centrifugó a 10,000 rpm a 4 °C durante 10 min. se tomó la fase acuosa con pipetas Pasteur de punta ancha y se repitió la extracción. Se centrifugó y la fase acuosa se extrajo con dos volúmenes de cloroformo, seguidamente se centrifugó, se tomó la fase acuosa y se precipitó con dos volúmenes de etanol frío, mas 1/25 de cloruro de sodio 5 M y se dejó toda la noche a -20 °C. Después se centrifugó a 10,000 rpm a 4 °C durante 10 min, se decantó el etanol y se secó el DNA durante 5 min. Posteriormente se resuspendió en solución amortiguadora TE (Tris- HCl 10 mM pH 8.0 y EDTA 1 mM pH 8.0).

12.- Digestión con enzimas de restricción.

Las condiciones utilizadas para las enzimas fueron ya reportadas (4). Las reacciones se incubaron a 37°C por el tiempo necesario según la actividad de la enzima, las reacciones se detuvieron calentando a 65°C durante 10 min.

13.- Hibridación DNA-DNA por la técnica Southern. (30)

Las muestras de DNA cromosomal digeridas con Eco RI, se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% de 3 mm de grosor en una solución amortiguadora E (la solución 10x contiene: acetato de sodio anhidro 4.10 g, EDTA sódico dihidratado 3.72 g, Tris base 48.44 g, ácido acético 18.33 ml). Se corrió a 50 voltios a temperatura ambiente durante 4 hrs, el gel se tiñó con bromuro de etidio, y se fotografió, posteriormente se desnaturalizó con cloruro de sodio 1 M e hidróxido de sodio 0.5 M dejándolo 15 min en la solución, y se repitió la operación una vez más.

Después se neutralizó con Tris HCl 1 M y cloruro de sodio 3 M pH 7.0 dos veces durante 15 min, cada vez. La transferencia del DNA al filtro de nitrocelulosa se hizo de la siguiente manera: se acomodó el gel sobre un puente de papel Whatman 3 MM, humedecido en solución SSC 6x (SSC 20x 175.2 g/l de cloruro de sodio mas 88.2 g/l de citrato de sodio). Sobre el gel se colocó el filtro de nitrocelulosa humedecido en agua y encima otro pedazo de papel Whatman 3 MM del tamaño del filtro. Sobre esto se puso medio rollo de toallas Kleenex absorbentes y un peso encima de

aproximadamente 0.5 Kg, se dejó transferir durante 16 hrs a temperatura ambiente. después el filtro se colocó entre dos hojas de papel Whatman 3 MM y se puso a secar a 37 C por 30 min, seguidamente se metió el filtro en un horno con vacío a 80 C durante 2 hrs, para fijar el DNA al filtro. Para la prehibridación se colocó el filtro en bolsas selladas con 10 ml de solución de hibridación que contiene 5 ml de formamida desionizada, 2.5 ml de SSC 20x, 0.1 ml de SDS 10 %, 0.1 ml de EDTA 0.1 M, 0.1 ml de Tris 1 M pH 7.5, 1.0 ml de Denhardt 10x (0.02 g de ficoll, 0.02 g de polivinilpirrolidona, 0.02 g BSA, 2.5 ml de agua estéril, 7.5 ml de SSC 4x), 1.1 ml de agua, 100 ug de DNA desnaturalizado [Para desnaturalizar el DNA diluido en el agua requerida para la hibridación, luego se calentó a 92 C por mas de 10 min, pasándolo inmediatamente a hielo hasta el momento de añadirlo a la solución amortiguadora de hibridación.], luego se selló la bolsa y se incubó a 42 C durante 3 hrs. Seguidamente se cortó una esquina de la bolsa y se agregó la sonda marcada radiactivamente y se dejó la hibridación toda la noche a 42 C.

Al día siguiente se cortó una esquina de la bolsa, se vertió la solución en una botella de desecho radiactivo. A la bolsa se le añadió 25 ml de la solución formada por SSC 2x, SDS 0.1% a temperatura ambiente, para enjuagar y volver a desechar el líquido. Luego se sacó el filtro y se puso en un volumen de

500 a 1000 ml de SSC 2x, SDS 0.1 % a temperatura ambiente, se dejó de 10 a 15 min agitando ocasionalmente. Luego se pasó a un segundo recipiente con SSC 0.1x, 0.1% de SDS y se dejó 15 min agitando en un baño a 50 °C. Con el Geiger se revisó la radiactividad, seguidamente se lavó el filtro con 50 % de formamida más SSC 1x, durante 15 min a temperatura ambiente, se puso el filtro entre 2 hojas de papel Whatman 3 MM a 37 °C durante 30 min. Posteriormente se colocó en un cartucho de autorradiografía y se mantuvo a - 70 °C con pantalla amplificadora, se reveló después de 12 hrs.

14.- Hibridación DNA-DNA en colonia.

Se esterilizaron los filtros de nitrocelulosa humedecidos con agua, envueltos en papel Whatman 3 MM, luego envueltos en papel de aluminio, a 15 lb durante 30 min, después los filtros estériles se colocaron sobre cajas de Petri con medio de Luria, sobre el cual se parcharon las colonias, se incubó a 37 °C aproximadamente 12 hrs. Al día siguiente (Los filtros se pusieron sobre cajas de Petri con la solución respectiva, mas papel Whatman 2 MM como soporte, cuidando de que no hubieran burbujas debajo) se lavaron los filtros con hidróxido de sodio 0.5 M y cloruro de sodio 1.5 M una vez durante 5 min para desnaturalizar seguidamente se lavaron con Tris 0.5 M pH 7.0 y cloruro de sodio 1.5 M dos veces durante 5 min cada vez para neutralizar. Después se pusieron a secar los filtros de nitrocelulosa sobre

papel Whatman a temperatura ambiente como media hora y luego se colocaron los filtros entre dos hojas de papel Whatman y se pusieron a hornear al vacío a 80 °C durante 2 hrs. Posteriormente se lavaron los filtros dos veces con SSPE 2x (SSPE 20x EDTA bihidratado 7.4 g/l, hidróxido de sodio 4.4 g/l, fosfato de sodio monobásico hidratado 27.6 g/l, cloruro de sodio 210.0 g/l, se ajustó el pH a 7.0 con hidróxido de sodio y se llevó a 1 l con agua, se esterilizó por autoclave a 121 °C, 15 lb durante 20 min, para quitar bacterias, luego se dejan secar los filtros sobre papel Whatman, mientras se meten a la bolsa de prehibridación.

Se preparó 60 µl de DNA de esperma de salmón mas 40 µl de agua estéril, se colocó todo en un tubo "ependorf" en agua hierviendolo durante 10 min para desnaturalizarlo, inmediatamente se puso en hielo en espera de su uso. La mezcla de prehibridación se preparó con 3.75 ml de SSPE 20x, 7.5 ml de formamida [la formamida se desionizó con la resina de intercambio iónico AG 501-XE (D) de BIO RAD, se agitó, se ajustó el pH a 7.0 y se filtró por papel Whatman 3 MM], 0.3 ml de Denhardtts 50x (Ficoll 0.5 g, polyvinylpyrrolidona 0.5 g, BSA 0.5 g, todo en 50.0 ml de agua, se filtró por "millipore", se guardó en alicuotas de 6.0 ml a - 20 °C), 0.45 ml de SDS 10%, mas 2.9 ml de agua estéril. Se puso esta solución en una bolsa de plástico, luego los filtros, después se añadió el DNA de esperma de salmón, todo en un volumen final de 15 ml, se selló

la bolsa, se incubó a 42°C durante 3 hrs. Mientras tanto se preparó la sonda gluB de 3.3 Kb, la cual se marcó radiactivamente con un equipo de "nick translation", adquirido de New England Nuclear Co., usando como isótopo deoxi- α (³²P)ATP. Se cortó una esquina de la bolsa de plástico y se agregó la sonda, se selló la bolsa y se dejó incubando a 42°C durante toda la noche. Al día siguiente se cortó una esquina de la bolsa, se desechó en un recipiente toda la mezcla de hibridación. Se tomaron los filtros y se colocaron en una charola con la solución amortiguadora de SSPE 2x para lavarlos a 42°C durante 15 min y cuatro veces con SSPE 0.2x cada vez de 15 min a 42°C con agitación leve y una vez con SSPE 0.1x durante 30 min. Se puso a autorradiografía toda la noche a -70°C, posteriormente se reveló.

15.- Determinación de la actividad enzimática de GS. Descrito en (1) y modificado (2).

Se midió la actividad total de la enzima mediante el ensayo de γ -glutamyl transferasa. Los extractos se prepararon creciendo 10 ml de cultivo en medio NN con las fuentes de nitrógeno adecuadas hasta un crecimiento de 80 UK, inmediatamente se añadió 1 ml de CTAB a una concentración de 1 mg/ml, se agitó durante 3 min en las mismas condiciones de crecimiento. Se enfrió inmediatamente en hielo, las células se centrifugaron

a 4 C. posteriormente se lavaron una vez con cloruro de potasio al 1%. se recentrifugaron y se resuspendieron en 1 ml de cloruro de potasio 1% manteniendo el extracto en hielo hasta el momento de la determinación.

La mezcla de reacción se preparó de la siguiente forma:

Agua	3.5	ml
Imidazol 1 M pH-7.33	1.125	ml
NH ₂ OH 0.8 M 2	0.185	ml
MnCl ₂	0.0225	ml
Arseniato de sodio 0.28 M pH 7.33	0.75	ml
ADP	0.150	ml
CTAB	0.75	ml
L-glutamina 0.2 M	1.0315	ml

Se ajustó el pH a 7.33 con hidróxido de sodio después se aforó a 8.25 ml, se incubaron las muestras en un baño a 37 C; se colocaron tres tubos de vidrio de 13 x 100 por extracto, a todos los tubos se les puso 0.4 ml de la mezcla. Al primer tubo se le añadió 1 ml de reactivo para detener la reacción luego se agregó 0.1 ml del extracto, el segundo y el tercero se incubaron con el extracto durante 5 min y 10 min respectivamente antes de detener la reacción. El reactivo para detener la reacción contiene 55 g/l de cloruro férrico hexahidratado, 20 g/l de tricloroacético y 21 ml/l de ácido clorhídrico. Los tubos se centrifugaron y se determinó la absorbancia del sobre-

nadante en el espectrofotómetro a 540 nm. El factor de conversión utilizado fue 0.532, que es la absorbancia de 1 μ mol de γ -glutamil hidroxamato. Las actividades específicas se reportan como μ moles de γ -glutamil hidroxamato producidas por min y por mg de proteína.

16.- Determinación de la actividad enzimática de GOGAT y GDH (20).

Los extractos se prepararon creciendo 10 ml del cultivo en medio NN con las fuentes de nitrógeno adecuadas, hasta un crecimiento de 80 UK, seguidamente se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min, se decantaron y se lavaron dos veces con la solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM con β -mercaptoetanol 10 mM pH 7.6

Se centrifugaron las células y se resuspendieron en 1 ml de la solución amortiguadora usada para lavar. Se puso el ml del extracto en un tubo "ependorf" y este en un vaso de precipitado con hielo para sonicar a 50 Watts las células, tres veces durante 10 seg y con intervalos de descanso de 30 seg, luego se centrifugó 25 seg a 11.000 rpm, se tomó el sobrenadante, se puso en frío e inmediatamente se determinó la actividad enzimática de GOGAT por medio de una cinética enzimática de 4 min a 340 nm, manteniendo el extracto en hielo hasta el momento de la determinación.

Se hicieron dos controles, ya que existen varias transaminasas

que utilizan glutamina y producen glutamato al catalizar la transferencia del grupo amido de la glutamina. Tambien se conocen algunas transaminasas que utilizan α -cetoglutarato como aceptor del grupo amino de varios aminoácidos lo que resulta tambien en la producción de glutamato.

Control- α -ceto	μ l	Control - gln	μ l
-----		α -ceto glutarato	
Glutamina 5 mM	50	5 mM pH 7.0	50
Tris-HCl 50 mM pH 7.6	50	Tris-HCl 50 mM pH 7.6	50
Agua cbp	675	Agua cbp	675
NADPH 0.25 mM	125	NADPH 0.25 mM	125

Mezcla completa	μ l
α -ceto glutarato 5 mM pH 7.0	50
Glutamina 5 mM	50
Tris-HCl 50 mM pH 7.6	50
Agua cbp	675
NADPH 0.25 mM	125

Se inició la reacción con 100 μ l del extracto.

Para GDH es el mismo procedimiento y se emplea la misma mezcla de reacción, solamente que en vez del substrato glutamina se utiliza cloruro de amonio 40 mM 50 μ l.

17.- Determinación de la actividad enzimática cualitativa de GOGAT y GDH (técnica de Bozov).

Se parcharon las colonias en el medio selectivo, se dejaron crecer durante toda la noche, después de crecidos los parches, se recogieron las células con un palillo de madera estéril y se resuspendieron en 90 μ l de la mezcla de reacción.

Mezcla de reacción: ensayo de GOGAT.

Tris- HCl 0.1 M pH 7.6 5 ml

α -cetoglutarato 0.2 M pH 7.6 1 ml

CTAB 1 mg/ml 1 ml

Deoxicolato de sodio 125 μ g/ml 1 ml

Glutamina 50 mg/ml 1 ml

(preparar al momento).

Poner cloruro de amonio 40 mM 1 ml, en vez de glutamina para el ensayo de GDH.

Después de tener bien resuspendidas las células se incubaron a 37 °C durante 5 min, seguidamente se agregó a cada muestra 10 μ l de NADPH (6 mg/ml en Tris 0.1 M, se puede preparar anticipadamente, alicuotar y guardar a -20 °C). Luego se incubó a 37 °C durante 15 min, posteriormente se tomó 5 μ l de cada muestra y se aplicaron sobre papel Whatman 3 MM, se dejaron secar a temperatura ambiente. Después bajo luz ultravioleta de onda larga se

observó si había o no actividad enzimática viendo la fluorescencia del NADPH. Se pusieron tanto el control positivo (no fluoresce, por lo tanto hay actividad enzimática) y el control negativo (si fluoresce), para seleccionar la cepa que se busca.

18.- Determinación de la actividad enzimática de la β -galactosidasa.

Los extractos se prepararon creciendo 10 ml de cultivo en medio NN con las fuentes de nitrógeno adecuadas hasta un crecimiento de 80 UR, posteriormente el cultivo se enfrió 20 min en hielo. Después se colocaron tres tubos, tiempo 0, 15 min y 30 min. A todos los tubos de vidrio de 13 x 100 se les puso 0.1 ml de cultivo, mas 0.9 ml de la solución amortiguadora Z, todo se hizo en hielo.

Solución amortiguadora Z		g/100 ml
NA HPO ₄ .9H ₂ O 2 4 2	0.06 M	1.608
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O 2 4 2	0.04 M	0.5519
KCl	0.01 M	0.0745
MgSO ₄ .7 H ₂ O 4 2	0.001 M	0.0246
β -mercaptoetanol	0.05 M	0.3496

Se ajustó el pH a 7.0 con hidróxido de sodio y se aforó a 100 ml.

Se agregaron dos gotas de cloroformo, una gota de SDS 1.0%, se agitó mecánicamente durante 10 seg. Se pasaron los tubos, a un baño a 28 C, al tiempo 0 se le agregó 500 μ l de carbonato

de sodio 1 M, al tiempo 15 y 30 min se le agregó 200 μ l de ONPG se prepara al momento de usarse, pesando 4 mg/ml en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.0, se envuelve en papel aluminio y se coloca en hielo). Se detuvo la reacción con 200 μ l de carbonato de sodio 1 M a los 15 y 30 min respectivamente, luego se centrifugó a 4°C durante 15 min, se determinó la actividad enzimática midiendo el O-nitrofenol producido a 420 nm.

19.- Determinación de proteína por el Método de Lowry (13).

Se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución A para 1 litro

NaOH	4 g
Na ₂ CO ₃	20 g

- Solución B para 100 ml

Tartrato de sodio y potasio 2 g

- Solución C para 100 ml

CuSO₄ · 5 H₂O 1 g

- Solución de BSA. 1 mg/ml, se alicuotea y se guarda a -20°C.

- Solución mezcla.

Solución A	98.0 ml
Solución B	1.0 ml
Solución C	+ 1.0 ml

	100.0 ml

- Solución Folin.

Una dilución 1:3. en agua.

a) Blanco : 1 ml de agua destilada.

Referencia: 100 μ l BSA, 900 μ l de agua destilada.

Muestra: 100 μ l de extracto, 900 μ l de agua destilada.

b) Se agregó 5 ml de la solución mezcla, se agitó vigorosamente y se dejó reposar 10 min.

c) Se agregaron 500 μ l de la solución de Folin 1:3, se agitó vigorosamente y se dejó reposar 30 min, se determinó la proteína a 625 nm.

RESULTADOS Y DISCUSION

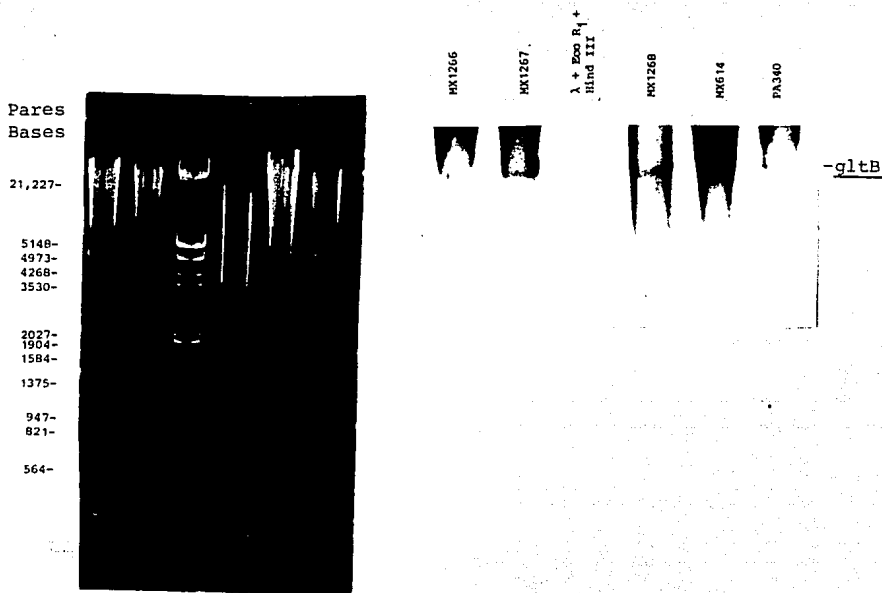
Tabla 1 Cepas Bacterianas y plásmidos.

Cepas	Genotipo o fenotipo relevante	Referencia
AB1157	F, <u>thr-1</u> , <u>leu-6</u> , <u>ara</u> , <u>ere</u> , <u>lac</u> , R, gal, <u>λ</u> , <u>his</u> , Sm, <u>xyl</u> , 6 <u>mt1</u> , <u>ara</u> , B.	B.J. Bachmann
CAG12072	<u>gal-203::Tn10</u> (min 68.75) Tc R	M. Singer (28)
CAG12153	<u>zha-6::Tn10</u> (min 70.00) Tc	"
PA340	<u>araG</u> , B, <u>his</u> , <u>leu</u> , <u>thr</u> , 1 <u>altB31</u> , <u>sdh 1</u> , <u>ΔaltBDF</u>	F. Jacob via B.J. Bachmann
MX614	Δ(<u>ere-lac</u>), <u>galE</u> , <u>ilv 680</u> , <u>thi1</u> ; + R Aut, Ms	Colección del Laboratorio.
MX902	MX614 <u>alnG74::Tn5</u> , Aut, Ms	"
MX971	P (KL16) x MX970 --> <u>araG</u> /Gal 1	"
MX985	MX614 <u>galE</u>	"
MX988	P (PA340) x MX971 --> <u>AraG</u> (Aut.) 1	"
MX1206	MX985 infectada con Mud1 --> Ap / + - + S Gln, Aut, Lac, Ms	Laura Velázquez
MX1242	MX985 infectada con Mud1 --> Ap / + - + R Gln, Aut, Lac, Ms.	"
MX1243	MX985 infectada con Mud1 --> Ap / + - + R Gln, Aut, Lac, Ms	"
MX1245	MX1206/pRSP21 --> Ap Cm /Aut, Ms R R + R	"
MX1246	MX1242/pRSP21 --> Ap Cm /Aut, Ms R R + S	"

Tabla 1 (continuación)

MX1247	MX1243/PRSP21	--> Ap Cm /Aut , Ms	R R + R	"
MX1248	MX1206/pGOG3	--> Ap Tc /Aut , Ms	R R - R	"
MX1249	MX1242/pGOG3	--> Ap Tc /Aut , Ms	R R - R	"
MX1250	MX1243/pGOG3	--> Ap Tc /Aut , Ms	R R - R	"
MX1176	MX614 gdtB::Tn5. gdtB::g R Kan	--> Sm Spc	R R	Irene Castaño
MX1178	MX614 gdtB::g	--> Sm Spc	R R	"
	MX1178/PRSP21	--> Sm Spc /Aut	R R +	Este trabajo
	MX1178/pGOG3	--> Sm Spc Tc /Aut	R R R +	"
MX1179	MX614 gdtE:: g	--> Sm Spc	R R	Irene Castaño
MX1266	P Cm (MX1242) x MX985 1	galeE --> Ap	+ R	Este trabajo
MX1267	P Cm (MX1206) x MX985 1	galeE --> Ap	+ R	"
MX1268	P Cm (MX1243) x MX985 1	galeE --> Ap	+ R	"
MX1302	P (PA340) x MX971 1	--> argg [Aut]	+ -	Este Trabajo
MX1303	P (MX1302) x MX971 1	--> argg [Aut]	+ -	"
MX1304	P (CAG12153) x MX1302 1	--> Tc [Aut]	R -	"
MX1307	P (MX848) x MX1267 1	--> Kan [Aut]	R -	"
MX1308	P (CAG12072) x MX614 1	--> Tc	R	"
MX1309	P (MX902) x MX1267 1	--> Kan [Aut]	R -	"
MX1310	P (CAG12072) x MX1267 1	--> Tc	R	"
MX1312	P (MX1302) x MX1176 1	--> Glu Kan	+ R	"

Figura 6. Hibridación tipo DNA-DNA para demostrar que el Mud1, no se encontraba en gltE.



MX1266 : Porta la mutación glt::Mud1

MX1267 : Porta la mutación glt-227::Mud1

MX1268 : Porta la mutación glt::mud1

MX614 : Control positivo (gltBDF)

PA340 : Control negativo (ΔgltBDF)

Figura 3A Curvas de crecimiento en amonio 15 mM como única fuente de nitrógeno en cepas que contienen la mutación glt::Mud1

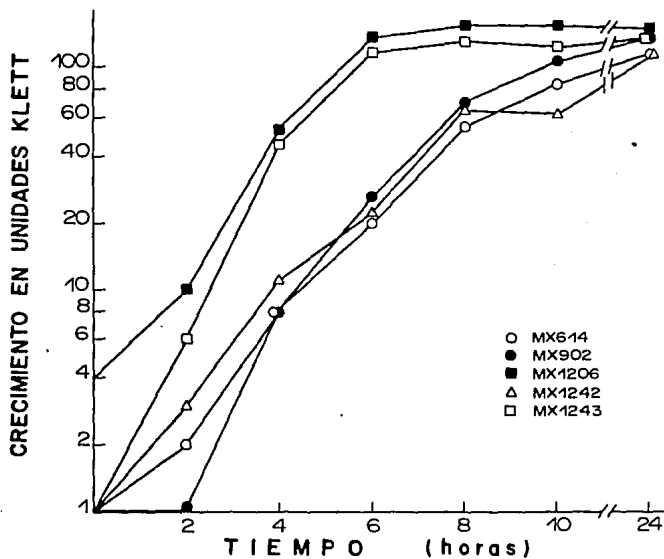


Figura 3B Curvas de crecimiento en arginina como única fuente de nitrógeno en cepas que contienen la mutación glt::Mud1

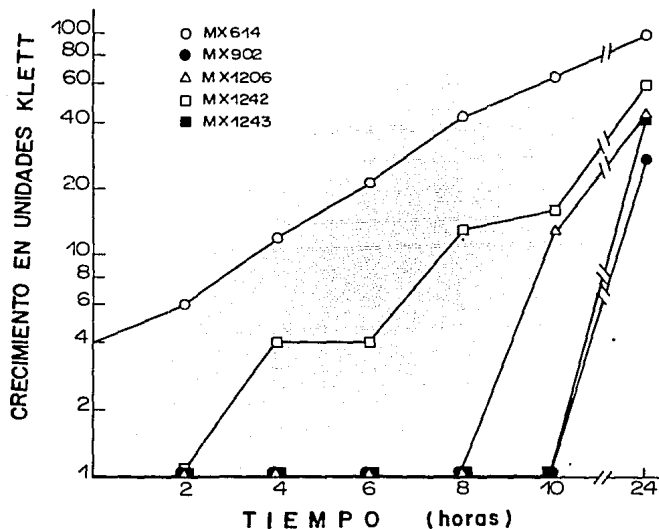


Figura 4A Curvas de crecimiento en amonio 15 mM como única fuente de nitrógeno en cepas que contienen la mutación glt::MudI complementadas con pGOG3

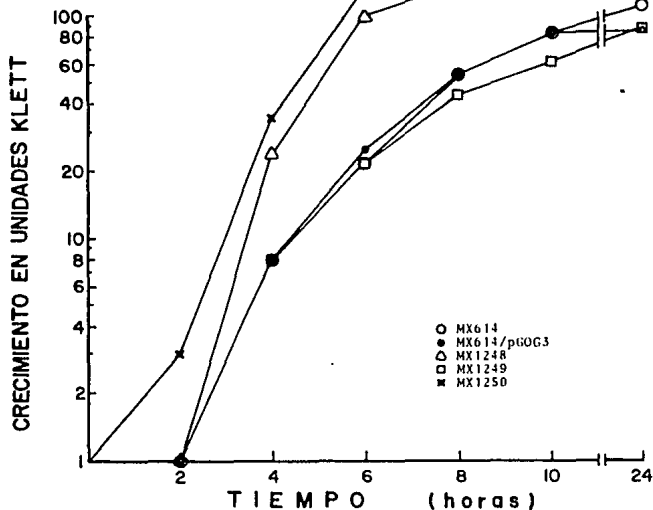


Figura 4B Curvas de crecimiento en arginina como única fuente de nitrógeno en cepas que contienen la mutación glt::MudI complementadas con pGOG3

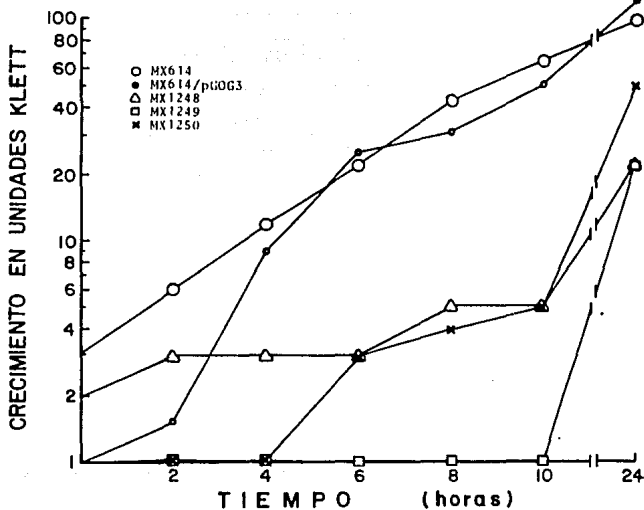


Figura 5A Curvas de crecimiento en amonio 15 mM como única fuente de nitrógeno en cepas que contienen la mutación glt::Mud1 complementadas con pRSP21

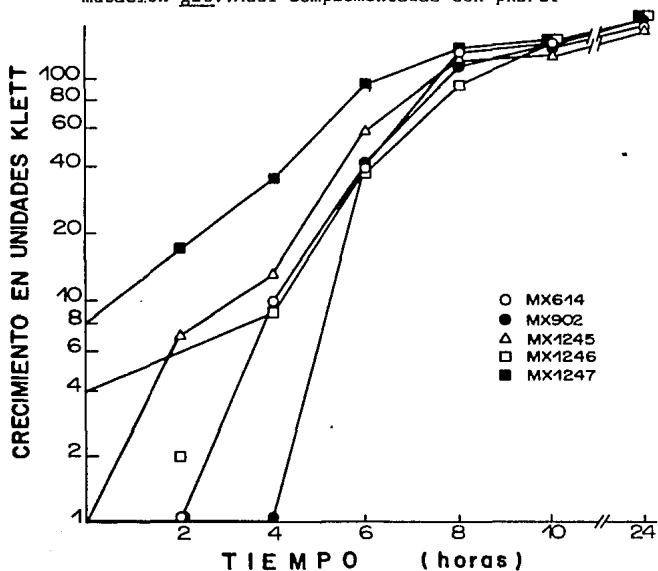
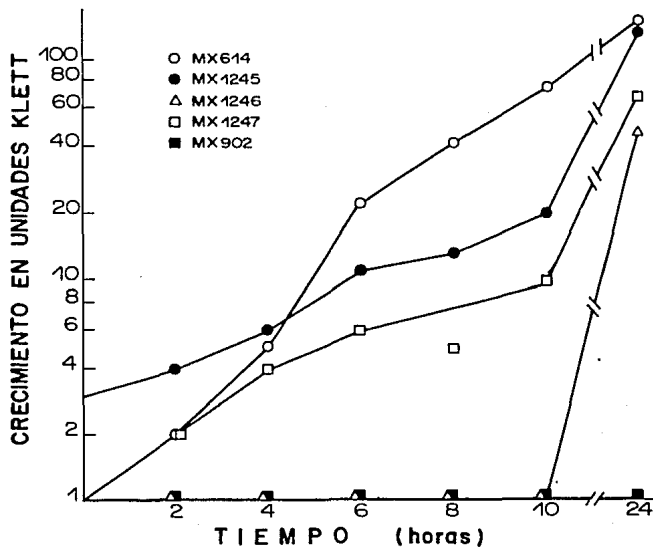


Figura 5B Curvas de crecimiento en arginina como única fuente de nitrógeno en cepas que contienen la mutación glt::Mud1 complementadas con pRSP21



b) Segregación de la mutación *glt_227::Mud1*.

Posteriormente, las tres cepas MX1206, MX1242 y MX1243, que fueron aisladas por inserciones al azar de Mud1 seleccionando fenotipo Aut, se reclonaron en el fondo silvestre de la MX985 para eliminar la posibilidad de la presencia de otra inserción de Mud1 en el cromosoma de las cepas originales. La clonación se llevó a cabo como se muestra en la Tabla 2.

Debido a que estas cepas con Mud1 presentan actividad de GOGAT baja y para descartar la posibilidad que el Mud1 se encontrará en *gltE*, se hizo una hibridación DNA-DNA, como se muestra en la Figura 6.

Tabla 2 Re-clonado y purificación de las mutaciones *glI::MudI*

DONADOR	RECEPTOR	SELECCION	FENOTIPO	TRANSDUCTANTE
			RESULTANTE	PURIFICADAS Lac ⁺
MX1206	MX985	R	R +	MX1267
		Ap	Ap Lac ⁻ ;	
			R -	
MX1242	MX985	R	R +	MX1266
		Ap	Ap Lac ⁻ ;	
			R -	
MX1243	MX985	R	R +	MX1268
		Ap	Ap Lac ⁻ ;	
			R -	
			Ap Lac ⁻	

```

                R +
MX614/pRSP21 --> Cm /Aut "
                R R +
MX1178/pRSP21 --> Sm Spc /Aut "
                R R R +
MX1178/pGGG3 --> Sm Spc Tc /Aut "
                R +
MX1302/pRSP21 --> Cm /Aut "

```

Nota: Las cepas MX1245, MX1246, MX1247, MX1248, MX1249, MX1250, son transformaciones de cepas con plásmidos. Su número no se cambió para no alterar trabajos en los cuales ya están registradas esas cepas.

Tabla 1 (continuación)

Plásmidos	Genotipo o fenotipo relevante	Referencia
pGGG3	pBR322::R Pst/ <u>gltE</u> --> Tc ^R	Irene Castaño
	1	
PRSP21	<u>gltE</u> _D _E --> Cm ^R	

Observaciones

glt::Ω Subunidad pesada de GOGAT con el cassette Ω
 Fragmento flanqueado por múltiples sitios de restricción (Eco R1, SmaI, Bam H1, Hind III), que codifica para la resistencia de espectinomicina (Spc) y estreptomicina (Sm).

I.- Mutaciones de cepas Aut debidas a inserciones de Mud1

a) Caracterización del fenotipo Ntr.

Se procedió a caracterizar el fenotipo Ntr de las cepas con las inserciones Mud1 (MX1206, MX1242 y MX1243) mediante la utilización de arginina como Única fuente de nitrógeno (fenotipo Aut).

En la figura 2A se presentan curvas de crecimiento en amonio 15 mM como control positivo de crecimiento para las células y en arginina para el fenotipo buscado. En esta figura se incluye la cepa MX614 como control positivo para el crecimiento tanto en amonio como en arginina y como control negativo la MX902 en arginina; puede verse claramente que la MX902 presenta un fenotipo Aut.

En la figura 2B, se presenta a la cepa MX1178 (gltB::g), cepa con fenotipo Aut claro hasta las diez h de crecimiento; también podemos ver a ésta misma cepa complementada por pRSP21 (plásmido que lleva los genes gltBDE) y por pGOG3 (plásmido que lleva el gene gltE). Estas complementaciones se hicieron para saber si el fenotipo Aut se restablecía por la presencia de gltB_D_E y por la presencia del producto de gltE. Se observa claramente que cuando la MX1178 es transformada por pRSP21 se convierte a Aut y que pGOG3 no complementa el fenotipo Aut.

En la figura 3A, se presentan los resultados del crecimiento de las tres cepas con inserciones de Mud1 aisladas por L. Velázquez, MX1206, MX1242 y MX1243 cultivadas en amonio 15 mM.

Y las cepas MX614 y MX902, como controles positivo y negativo

respectivamente.

En la figura 3B se observan las mismas cepas de las Figura 3A crecidas en arginina como fuente de nitrógeno. Se observa que las cepas MX1206 y MX1243 tienen fenotipo Aut, aunque la MX1242 es Aut intermedio. Cabe aclarar que este fenotipo es muy difícil de discernir en caja de Petri y por tal razón se efectuaron curvas de crecimiento, en líquido con el afán de obtener una respuesta lo mas clara posible.

En la figura 4A, observamos las tres cepas con las inserciones Myd1 complementadas con pGOG3 en amonio como control positivo y en la figura 4B las mismas cepas, en arginina para caracterizar el fenotipo Aut.

Concluimos de estas curvas de crecimiento que *glfE* (que se encuentra en pGOG3) no complementa este fenotipo, y que por lo tanto, la inserción de Myd1 no se encuentra en *glfE*.

En la figura 5A se presentan a las cepas con inserciones Myd1 complementadas por el pRSP21 crecidas en amonio y en la figura 5B las mismas cepas crecidas en arginina, donde la MX1246 es Aut, la MX1245 y la MX1247 son Aut.

Figura 2A. Curvas de crecimiento en amonio 15 mM y arginina como única fuente de nitrógeno.

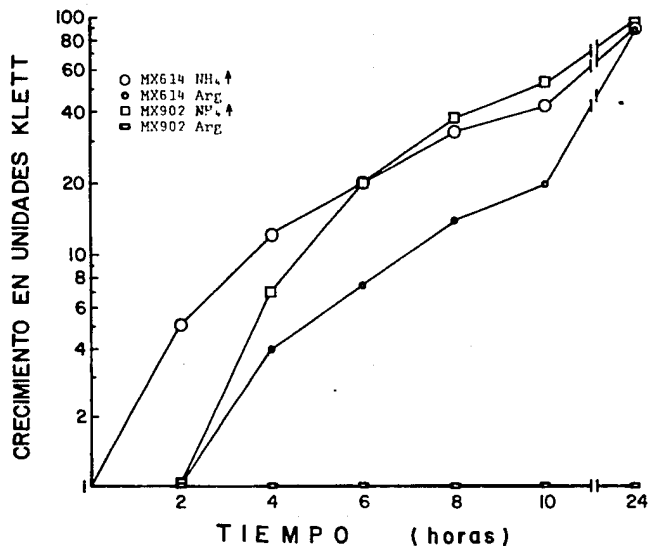
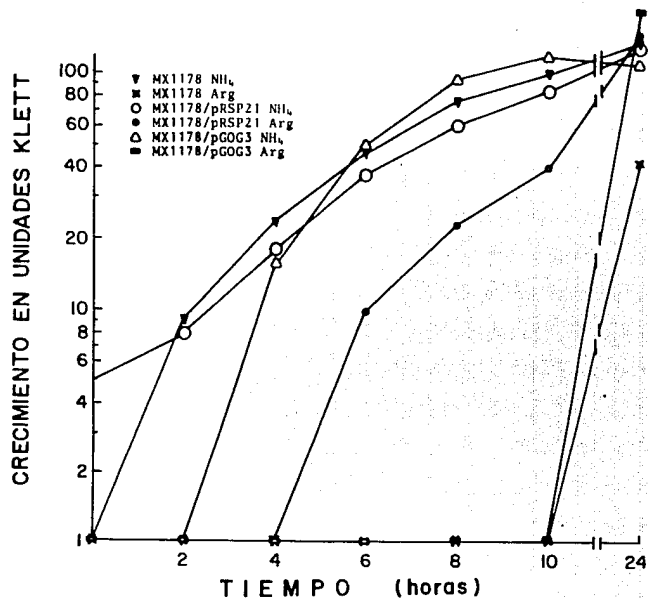


Figura 2B Curvas de crecimiento en amonio 15 mM y arginina como única fuente de nitrógeno de cepas que contienen la mutación *glbB::Ω* complementadas con pRSP21 y pGOG3



En esta hibridación se usó como monitor un fragmento Hpa I - Hpa I (3.3 Kb) de *gltB*, ver Figura 9. Se presentan también los controles positivo y negativo a *gltB* en esta Figura. El DNA cromosomal fue digerido con Eco RI ya que ni el Mud1 ni el gene *gltB* de las tres cepas, presentan este sitio de restricción. Dado que se observa la banda que corresponde a *gltB* en las cepas MX1266, MX1267 y MX1268 (Figura 6B) de esta hibridación, concluimos que el Mud1 no se encuentra en el gene *gltB*.

Seguidamente se caracterizó la actividad enzimática de GS, β -galactosidasa y GOGAT de las cepas MX1266, MX1267 y MX1268, en diferentes fuentes de nitrógeno. Los resultados se observan en la Tabla 3.

Tabla 3 Actividad enzimática de GS, β -galactosidasa y GOGAT de cepas que contienen un MudI en el genoma silvestre de MX985.

Cepa	Actividad Enzimática									
	GS			β -gal			GOGAT			Feno tipo
	NH_4^+ (15mM)	Gln	Glu	NH_4^+ (15mM)	Gln	Glu	NH_4^+ (15mM)	Gln	Glu	Aut
MX614	170	1380	1400	0	0	0	71	58	0	+
MX1266	210	1260	1180	113	147	54	4	0	0	-
MX1267	220	870	900	64	250	252	4	71	0	-
MX1268	190	1210	1440	75	69	58	0	0	0	-

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

b) NH_4^+ 15 mM, significa que los cultivos se crecieron a esta concentración como fuente de nitrógeno.

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

d) Aut significa crecimiento en L-arginina 0.2% como concentración final como fuente de nitrógeno.

+ = Crecimiento después de 10 hrs de incubación en medio

o líquido a 37 C con agitación.

- = No crecimiento después de 10 hrs de incubación en medio

o líquido a 37 C con agitación.

e) Los valores en NH_4^+ y L-glutamina son el promedio de dos determinaciones y en glutámico es el de una determinación.

Estos experimentos se realizaron en cultivos de limitación de nitrógeno por crecimiento en glutamina como fuente de nitrógeno, con el objeto de observar condiciones de inducción de la GS.

Se observa que las cepas MX1266 y MX1268 su GS se induce por glutamina, presentan actividad de β -galactosidasa y fenotipo Aut y en ellas la inserción del Mud1 causó la pérdida completa de la actividad de GOGAT. La cepa MX1267 presentó un 64% de la actividad de la GS comparada con la cepa silvestre, presentó inducción de β -galactosidasa en glutamina y glutámico.

A diferencia de las otras dos mutantes, la cepa MX1267 presentó actividad de GOGAT solamente en glutamina. En amonio alto no se detectó nivel alguno y en glutámico esta enzima se encontraba completamente reprimida, y además esta cepa presentó fenotipo Aut. Debido a que la cepa MX1267 presenta un fenotipo muy interesante, se seleccionó esta mutante para estudiarla con más detalle; aunque no se descartaron por completo las otras dos cepas.

Posteriormente, se mapeó la inserción de Mud1 por transducción con P. Vir A con respecto al min 69 (argG) y con dos Tn10, uno en el min 68.75 y el otro en el min 70, seleccionando Tc. Estos datos los observamos en la Tabla 4 y Figura 7. Los resultados indican que la inserción Mud1 en la MX1267 se encuentra en el min 66.76. Este dato apoya el resultado obtenido en la hibridación DNA-DNA (Figura 6) que el Mud1 no se encontraba en gluB.

La cepa MX1268 no cotransdujo con ninguno de los marcadores seleccionados en los min mencionados anteriormente. La cepa MX1266 no permitió crecimiento de P Vir, ni P Cm, y por ésta razón no se presentan datos de ella.

Con el objeto de conocer si la cepa MX1310 (Tabla 4) recuperaba su actividad de GOGAT al ser recombinada por la región del Tn10 de la CAG12072, se le determinó esta enzima en amonio en exceso y en glutamina. En la Tabla 5 se observa como resultado que tiene actividad de GOGAT en ambas fuentes de nitrógeno.

Tabla 4 Mapeo por transducción de la mutación *glt-227::Mud1* con respecto a *::Tn10* min 68.75, *argG* min 69.0 y *::Tn10* min 70.0

Donador	Receptor	Selección	Contra selección	% de colonias que contienen el marcador no seleccionado.	% de cotransducción (33).
CAG12072	MX1267	Tc ^b	Aut ^a (MX1310) ^e	0.5 (1/200)	1.99
MX1267	MX971	AP ^c	Aut	No se obtuvieron transductantes.	----
MX1267	MX971	<i>argG</i>	AP	0 (0/100)	----
MX1268	MX971	AP	Aut	No se obtuvieron transductantes.	----
MX1268	MX971	<i>argG</i>	AP	0 (0/100)	----
CAG12153	MX1267	Tc	Aut	0 (0/200)	----

a) Aut⁺ y Aut⁻ significan crecimiento y no crecimiento, respectivamente, en L-arginina 0.2 % como fuente de nitrógeno.

b) Tc^R significa crecimiento en 100 µg/ml de tetraciclina.

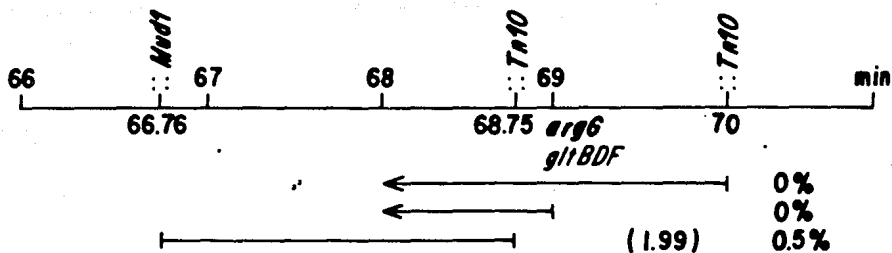
c) AP^R significa crecimiento en 100 µg/ml de ampicilina.

d) Estos experimentos se realizaron por duplicado.

e) El número de cepa entre paréntesis, es el asignado a la transductante aislada y purificada.

Figura 7 Mapa de la región en donde se encuentra la mutación *alt-227::Mud1* de *E. coli*

Mapa elaborado según los datos de la Tabla 4



- a) El número entre paréntesis indica la distancia en min, según el arreglo de Wu (33).
 b) Los porcentajes son la frecuencia de cotransducción entre los marcadores.

Tabla 5 Actividad enzimática de GOGAT de la cepa MX1310

Cepa	Actividad Enzimática de GOGAT	
	NH ₄ ⁺ 15mM	Glutamina 11mM
MX614	99	171
MX1310	85	77

a) Todos los símbolos utilizados en esta Tabla son los mismos que los de la Tabla 3.

Podemos observar que la cepa MX1310, (recombinante de P (CAG12072) x MX1267 ---> Tc^R 1); si se perdió la mutación 1

glt-227::Mud1 de la MX1267 con el Tn10 del min 68.75 (CAG12072). Ya que se restablece la actividad de GOGAT.

Con el objeto de conocer, si mutaciones que anulan la respuesta Ntr como glnG o glnF tenían un efecto sobre la mutación glt-227::Mud1, se construyeron las cepas MX1307 y MX1309, se les determinó actividad de β -galactosidasa en diferentes fuentes de nitrógeno, (Tabla 6).

Dado que el estudio de la mutación glt-227::Mud1 de la cepa MX1267, al tener la mutación glnF (MX1307); su actividad de β -galactosidasa no se observaba una diferencia en ésta con respecto al control MX1267. Y la cepa MX1309 es una doble mutante glt-227::Mud1, glnG, no creció en medios mínimos, esto no permitió estudios posteriores.

Se hicieron experimentos sobre auxotrofías (9), tratando de encontrar una respuesta a esta falta de crecimiento y no se obtuvieron resultados claros.

El paso a seguir sería la clonación de la mutación glt-227::Mud1, ya que sabemos que se encuentra en el min 66.76 y su posterior secuenciación. Esto es para poder entender como está afectando al operón gltBDE.

Una de las razones fundamentales por las cuales aún no se ha podido clonar el gene silvestre correspondiente a la mutación gltB227::Mud1; es la dificultad de selección, ya que es fácil encontrar complementación con plásmidos conteniendo el operón

+ + +
gltB_D_E debido a su expresión multicopia que no parece requerir de la presencia del producto activador.

Además estos plásmidos multicopia podrían escaparse de la represión que se sabe existe en éste operón, por titular al represor (Camarena, Osorio y Bastarrachea, datos no publicados).

Podemos decir que la mutación glt-227::Mud1, se encuentra en el min 66.76, es Aut, tiene A.E. de GOGAT cero en amonio alto y glutámico; pero en glutamina tiene 70.0 de A.E.

La pregunta es, ¿cómo está relacionada esta mutación con el operón gltBDE que se encuentra en el min. 69 del mapa cromosómico de *E. coli*?, ¿porqué tiene A.E. de GOGAT la cepa MK1267, solamente en glutamina?. Estas y otras preguntas faltan por contestar.

Tabla 6 Actividad enzimática de β -galactosidasa de las cepas MX1307 y MX1309, en diferentes fuentes de nitrógeno.

Cepa	Actividad Enzimática			
	β -gal		Gln	Glu
	NH ₄	NH ₄		
	+ 15mM	+ 0.5mM		
	4	4		
MX1267	49	204	348	335
MX1307	73	237	934	355
MX1309	--	---	---	---

-- = Significa que no hubo crecimiento

a) Todos los símbolos utilizados en esta Tabla son los mismos que los de la Tabla 3.

II.- Caracterización de la mutación gltB-228

a) Identificación de la mutación gltB-228 en la cepa PA340

Experimentos previos realizados por I. Castaño (Tesis de Maestría), demostraron que la cepa PA340, posee dos mutaciones relacionadas con el fenotipo Aut. Ella preparó lisados de P₁ en la PA340 (gltB⁺, argG⁻) y los usó para transducir la cepa MX971 (gltB⁻, argG⁺ como receptora, seleccionando transductantes ArgG⁺ y entre éstas determinando cuantas heredaban la mutación gltB31 que produce el fenotipo Aut. Irene observó que entre las transductantes seleccionadas, ArgG⁺ Aut⁻, existían dos clases. Esto fue posible gracias a la hibridación de las transductantes en colonia utilizando una sonda de gltB, (pGDF3).

De las transductantes Aut⁻, un 14 % hibridaron positivamente con la sonda en tanto que un 86 % no lo hicieron. En base a estos datos es posible concluir, que la cepa PA340 posee en su genoma dos mutaciones, cada una de las cuales ya perfectamente segregada, confiere a las células que las portan, el fenotipo Aut. Una de ellas, la mutación gltB31 propiamente dicha, es una delección, ya que tanto PA340 como las transductantes que heredan gltB31, son incapaces de hibridar positivamente con el probador de DNA del gene gltB. El porcentaje de cotransducción con argG es parecido al que se reportó anteriormente por Pahel Zelenetz y Tyler (24). Otro porcentaje pequeño de transductantes Aut⁻ (6.0%) heredó una mutación, que confiere el fenotipo

Aut pero que hibridó positivamente con el probador de gltB por la técnica en colonia. De lo cual concluimos que existe la posibilidad de que dicha mutación, se encuentre situada en el mapa, más allá de argG y del operón gltBDE. Ya que las dos mutaciones independientemente confieren el fenotipo Aut resulta imposible saber si aquellas que heredaron la delección (gltBDE31), también heredaron la otra mutación.

Para resolver esta duda, tendríamos que tomar un número de transductantes (gltBDE), propagar P en cada una de ellas y transducir de nuevo la cepa MX971, para saber si entre las transductantes ArgG existen o no, y en qué porcentaje, Aut, que también heredarán gltBDE. La mutación segregada que confiere el fenotipo Aut independientemente de gltB31 probablemente de naturaleza puntual, se denominó gltG-228.

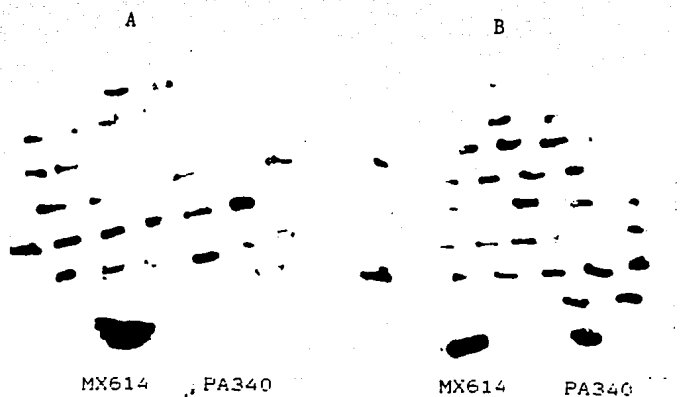
Determinaciones enzimáticas de GOGAT demostraron que cepas que llevan la mutación gltG-228 abaten la actividad de GOGAT siete veces que la de la cepa silvestre.

Con el objeto de reproducir la segregación de la mutación gltG, se repitió la transducción:

P (PA340) x MX971 ---> Arg [Aut]
 1

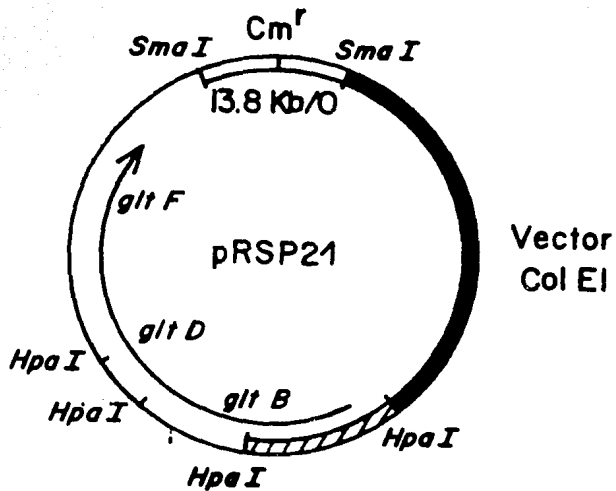
Para encontrar entre las transductantes aquellas que heredaron la mutación regulatoria se hizo lo siguiente (Figura 8):

Figura 8. Hibridación en colonia contra glbB.



En la hibridación en colonia se utilizó el fragmento Hpa I - Hpa I (3.3 Kb) de glbB como sonda, mostrado en la Figura 9.

Se tomaron tres posibles positivas y tres negativas a glbB, los controles se encuentran en el margen inferior de la Figura 8, a la izquierda se encuentra el control positivo MX614 y a la derecha el control negativo PA340, para cada panel.



Monitor de
 *glt B* de 3.3 Kb

Figura 9. Mapa del plásmido pRSP21.

Después a estas cepas seleccionadas se les determinó su actividad de GOGAT, para seleccionar cuantitativamente cual era la cepa que buscábamos, estos datos los observamos en la Tabla 7.

Tabla 7 Determinación de la actividad enzimática de GOGAT a las seis transductantes Aut, tres cepas positivas y las tres cepas negativas a hibridación con la sonda de *gltB* de la cruz P (PA340) x MX971.

1

Cepa	Hibridación con la sonda <i>gltB</i> .	Actividad Enzimática GOGAT		Fenotipo Aut.
		NH ⁺ 4	15 mM	
MX614	+	70		+
Transduc tante 1	+	0		-
2	+	0		-
3	+	0		-
4	-	0		-
5	-	0		-
6	-	0		-

a) Todos los símbolos utilizados en esta Tabla, son los mismos que los de la Tabla 3.

De las seis transductantes obtenidas de la cruz a P (PA340) x

1

MX971, las tres cepas que dieron positiva la hibridación con el probador gltB aparentemente heredaron el operón gltB_D_F de la cepa puntual MX971. Sin embargo, su fenotipo resultó Aut probablemente por heredar una mutación en gltG (gltG-228) de la PA340. Tanto a las tres transductantes que dieron hibridación positiva como a las tres que dieron hibridación negativa; se les introdujo por transformación el DNA del plásmido pRSP21. Y las transformantes que resultaron se les determinó actividad de GOGAT, con objeto de determinar si existía o no un efecto trans de la mutación gltG-228 que pudiera afectar la expresión multicopia del operón gltB_D_F del plásmido pRSP21. Los resultados que se presentan en la Tabla 8 no dieron las actividades esperadas, ya que de ser el producto del gene gltG un activador positivo, cabría esperar que el operón gltBDF en multicopia se expresara como en la cepa PA340/pRSP21 y no como en la MX614/pRSP21. La cepa silvestre MX614 transformada con pRSP21 tiene una actividad de GOGAT de 747 (Tabla 8); este nivel se debe a que en el cromosoma se tienen los genes de gltB_D_F y en multicopia gltBDF en el pRSP21; por ésta razón se ve aumentada la actividad de GOGAT diez veces más con respecto a la cepa MX614 sin transformar. La PA340, tiene una delección en el cromosoma de gltBDF y la mutación que afecta la expresión del operón gltB_D_F; su actividad en este caso es de cero, pero transformada con pRSP21 tiene una actividad de GOGAT basal de 50.

[Tanto de las tres cepas gltB⁺ y las tres cepas gltB⁻ transformadas con pRSP21, se esperaba una diferencia entre sus actividades de GOGAT. Debido a que las que hubieran heredado la mutación regulatoria, gltBDF⁺, y al estar transformadas con pRSP21 se esperaba una actividad de GOGAT menor a la de MX614/pRSP21; pero igual o mayor a la de PA340/pRSP21.

La expresión basal de GOGAT a partir de 50 copias de gltB_D_F⁺⁺⁺ sería muy similar a la de 51 copias. Las actividades de GOGAT fueron intermedias y como tales, no es posible asignarles a las cepas que portan la mutación gltG-228 como son las transductantes 1, 2 y 3, un carácter de regulador positivo definitivo.

Tabla 8 Transformación de las tres cepas *gltB* con pRSP21 y determinación de la actividad enzimática de GOGAT.

Cepas	Hibridación con el probador de DNA de <i>gltB</i>	Actividad enzimática GOGAT
		NH ⁺ 4 15 mM
MX614/pRSP21	+	747
PA340/pRSP21	-	51
Transductante 1 /pRSP21	+	365
Transductante 2 /pRSP21	+	470
Transductante 3 /pRSP21	+	534
Transductante 4 /pRSP21	-	308
Transductante 5 /pRSP21	-	601
Transductante 6 /pRSP21	-	604

a) Todos los símbolos utilizados en esta Tabla son los mismos que los de la Tabla 3.

Sin embargo, con el objeto de profundizar en el estudio de la mutación *gluB-228* presente en las transductantes ya mencionadas. Se realizó un experimento de rescate de marcadores en el cual se propagó el bacteriófago P en cada una de ellas, el cual se utilizó para transducir la receptora MX1176 (Castaño et al., 1988) la cual lleva dos mutaciones la *gdh-1* localizada en el min 38,6 del cromosoma (34) y la inserción *gluB226::g* que interrumpe al gene *gluB* del operón *gluBDF*. Entre las transductantes Glu cabría esperar dos tipos principales. Aquellas que heredaran el *gdh* de las transductantes y aquellas que eliminaran el alelo mutado *gluB226::g*, reemplazándolo por el alelo silvestre *gluB*, ya que la MX1176 es auxótrofa de glutámico y cualquiera de los dos alelos silvestres que heredaran por recombinación, daría transductantes Glu.

Los resultados que se presentan en la Tabla 9 indican que cuando menos la transductante 2, portaba en su genoma la mutación *gluB::228*, ya que dio lugar a transductantes (2/35) que fueron Glu^R y que perdieron los marcadores Sm^R y Spc^R característicos del cassette insertado en *gluB226::g*.

De lo anterior se concluye que cuando menos una de dos transductantes, la 2, portaba el gene silvestre *gluB* tal y como se suponía por la hibridación en colonia original. Presumiblemente, entonces la transductante 2 portaba no solo *gluB* silvestre sino que portaba todo el operón silvestre *gluB-D-E*, ya que de cruces entre cepas con deleciones y sin deleciones las recom-

binantes heredan o toda la delección o no la heredan completamente (Tabla 9).

Se observa en la Tabla 9, que de las tres construcciones solamente se pudo analizar la M:1312 ya que en las otras dos transducciones no hubieron transductantes.

Finalmente, se determinó la actividad de GOGAT, a las dos transductantes que presentaron el fenotipo no seleccionado.

Los resultados obtenidos los observamos en la Tabla 10, que nos muestran que si llevan los genes gluBDF ya que presentan actividad de GOGAT las dos transductantes.

Tabla 9 Identificación de los genes gltBDF en las cepas gltB⁺, por rescate de marcadores.

Donadora	Receptora	Selección	Contraselección	No.de colonias que presentan el fenotipo contraseleccionado.
Transductante 1	MX1176	+ R Glu Kan	s s Sm Spc	-----
Transductante 2	MX1176	+ R Glu Kan	s s Sm Spc	(2/35) ^a (MX1312)
Transductante 3	MX1176	+ R Glu Kan	s s Sm Spc	(0/35)

^a = Número asignado a la transductante.

Tabla 10 Determinación de la actividad Enzimática de GOGAT a cepas que contienen los genes *glbBE*, en el genoma silvestre de MX1176 (MX1312, de la Tabla 9).

Cepa	Actividad Enzimática	
	GOGAT	
	NH ₄	15 mM
MX614		60
MX1312 (1)		72
MX1312 (2)		85

a) Los símbolos utilizados en esta Tabla son los mismos, que los de la Tabla 3.

En la Tabla 11 se presentan los datos obtenidos de la caracterización de la actividad de GOGAT, de la cepa MX1302 en diferentes fuentes de nitrógeno.

Como se observa en esta Tabla, la cepa MX1302 lleva una mutación que afecta la expresión del operón *gltBDF* ya que no presenta actividad de GOGAT ni en exceso ni en limitación de nitrógeno. La actividad de GS está reprimida parcialmente en la condición de limitación de nitrógeno y la cepa tiene fenotipo Aut. Aunque en los resultados presentados en esta cepa MX1302, no hay variación de la actividad de GOGAT con respecto a cultivos en diferentes fuentes de nitrógeno (exceptuando glutámico, que en esta condición existe un 100 % de represión), así como tampoco se ve una relación clara entre los niveles de síntesis de GS y GOGAT, hay datos que sugieren cierta relación (32, 16). En cepas *gltB* de *E. coli* y *K. aerogenes*, algunas revertantes Aut de estas cepas, se localizan en *glpL* y son altas constitutivas para la síntesis de GS.

Se realizaron experimentos por transducción con P para localizar genéticamente la mutación puntual de la MX1302; los resultados se muestran en la Tabla 12. Como se observa, esta mutación está cerca de *gltBDF* que se encuentra en el min 69, según los datos de la Tabla 12, los marcadores se pueden acomodar como se muestra en la Figura 10; donde se observa que esta mutación *gltG-228* se encuentra entre el min 70.07 y 70.38, muy cerca de *gltBDF*.

Tabla 11 Caracterización de la actividad enzimática de la GS y GOGAT de la MX1302, en diferentes fuentes de nitrógeno.

Cepa	Actividad Enzimática								Fenotipo. Aut
	NH ₄ ⁺ GS		Gln	Glu	GOGAT		Gln	Glu	
	(15mM)	(0.5mM)			NH ₄ ⁺	NH ₄ ⁺			
MX614	161 ^c	1370 ^d	1190	1450	70	67	76	0	+
MX1302	89 ^d	920	336	494	0	0	0	0	-

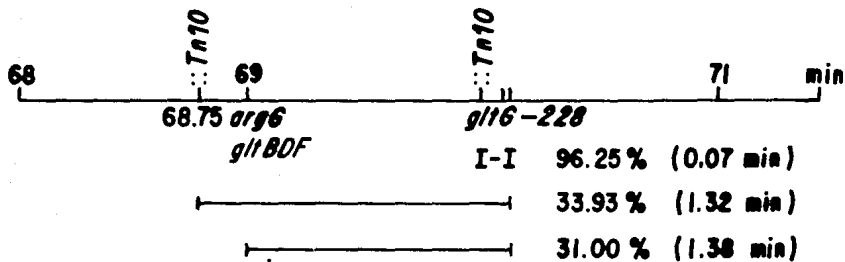
- a) Todos los símbolos utilizados en esta Tabla son los mismos que los de la Tabla 3.
- b) NH₄⁺ 0.5 mM significa que los cultivos se crecieron a esta concentración de amonio como fuente de nitrógeno.
- c) Promedio de tres repeticiones.
- d) Promedio de dos repeticiones.

Tabla 12 Mapeo por transducción con P Vir de la mutación ¹ altG-228 con respecto a Tn10 min 68.75, argG min 69.0 y Tn10 min 70.0

Donador	Receptor	Selección	Contraselección	% de colonias que contienen el marcador no seleccionado.	Cálculo de frecuencia de cotransducción según Arreglo de Wu (33).
CAG12072 min 68.75	MX1302	Tc ^R	Aut ⁺	33.93 (132/389)	1.32 min
MX1302 min 69.0	MX971	<u>argG</u> ⁺	Aut ⁻ (MX1303)	31.0 (31/100)	1.38 min
CAG12153 min 70.0	MX1302	Tc ^R	Aut ⁺ (MX1304)	96.25 (386/401)	0.07 min

a) Entre paréntesis está el número asignado a la cepa transductante

Figura 10 Mapa de la región en donde se encuentra la mutación *glg-228* de *E. coli*, elaborado según los datos de la Tabla 12



- a) Los números entre paréntesis indican la distancia en min según arreglo de Wu.
- b) Los porcentajes son la frecuencia de cotransducción entre los marcadores.

La mutación denominada *glg-228* se encuentra entre el min

70.07 y 70.38

CONCLUSION

I.- La MX1267 es Aut⁻, la mutación de la MX1267 no se encuentra en gltE ni en gltE.

La mutación glt-227::Mud1 esta en el min 65.76 ya que la MX1310, recupera la actividad de GOGAT en amonio alto. La actividad de B-galactosidasa y GOGAT se inducen por crecimiento en glutamina.

II.- La mutación gltG-228 segregada de la PA340, no es alélica a la glt-227::Mud1, dado que se encuentra entre el min 70.07 y 70.38. La cepa MX1302 (gltG-228) lleva los genes de GOGAT y sin embargo no presenta esta actividad.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bender, R.A., Janssen, K.A., Resnick, A.D., Blumberg, M., Four, F. and Magasanik, B. (1977). Biochemical parameters of glutamine synthetase from Klebsiella aerogenes. J. Bacteriol. 129: 1001 - 1009.
- 2.- Berberich, M.A. (1972). A glutamate dependent phenotype of E. coli K-12: the result of two mutations. Biochem. Biophys. Res. Commun. 47: 1498 - 1503.
- 4.- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Betlach, M.C. and Boyer, H.N. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles: 1 ampicilline resistant derivatives of the plasmid pMB9. Gene 2: 75 - 93.
- 5.- Brenchley, J.E. and Magasanik, B. (1974). Mutants of Klebsiella aerogenes lacking glutamate dehydrogenase. J. Bacteriol. 117: 544 - 550.
- 6.- Brenchley, J.E., Prival, M.J. and Magasanik, B. (1973). Regulation of the synthesis of enzymes responsible for glutamate formation in Klebsiella aerogenes. J. Biol. Chem. 248: 6122 - 6128.
- 7.- Castano, I., Bastarrachea, F. and Covarrubias, A. (1988). gltBDE operon of Escherichia coli. J. Bacteriol. 170: 821 - 827.
- 8.- Covarrubias, A.A., Sánchez - Pascador, R., Osorio, A., Bolivar, F. and Bastarrachea, F. (1980). ColEI hybrid plasmids containing Escherichia coli genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine. Plasmid 3: 150 - 164.

- 9.- Davis, R.W., Botstein, D. and Roth, J.R. (1980). A manual for genetic engineering advanced bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. pag. 207 (Nutritional supplements).
- 10.- Dendinger, S.M., Patil, L.G. and Branchley, J.E. (1980). Salmonella typhimurium mutants with altered glutamate dehydrogenase and glutamate synthase activities. J. Bacteriol 141: 190 - 198.
- 11.- Fuchs, R.L., Madonna, M.J. and Branchley, 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.
- 12.- Garcíarrubíe, A., Lozoya, E., Covarrubias, A. and Bolívar, F. (1983). Structural organization of the genes that encode two glutamate synthase subunits of Escherichia coli K-12. Gene 26: 165 - 170.
- 13.- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Raudall, R.J. (1951). Protein measurements with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265 - 275.
- 14.- Lozoya, E., Sánchez Pescador, R., Covarrubias, A., Vichido, I. and Bolívar, F. (1980). Tight linkage of genes that encode the two glutamate synthase subunits of Escherichia coli K-12. J. Bacteriol. 144: 616 - 621.
- 15.- Madonna, M.J., Fuchs, R.L. and Branchley, J.E. (1985). Fine structure analysis of Salmonella typhimurium glutamate synthase genes. J. Bacteriol. 161: 353 - 360.

- 16.- Magasanik, B. (1982). Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. Ann. Rev. Genet. 16: 135 - 168.
- 17.- Mantasala, P. and Zalkin, H. (1976a). Glutamate synthase properties of the glutamine-dependent activity. J. Biol. Chem. 251: 3294 - 3299.
- 18.- Mantasala, P. and Zalkin, H. (1976b). Properties of apoglutamate synthase and comparison with glutamate dehydrogenase. J. Biol. Chem. 251: 3300 - 3305.
- 19.- Mantasala, P. and Zalkin, H. (1976c). Active subunits of Escherichia coli glutamate synthase. J. Bacteriol. 126: 539 - 541.
- 20.- Meers, J.L., Tempest, D.W. and Brown, C.M. (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.
- 21.- Miller, J.H. (1972). Experiments in molecular genetics. 2a Edición. Cold Spring Harbor Laboratory N.Y.
- 22.- Miller, E.R. and Stadman, E.R. (1972). Glutamate synthase from Escherichia coli: an iron sulfide flavoprotein. J. Biol. Chem. 247: 7407 - 7419.
- 23.- Oliver, G., Gosset, G., Sánchez-Pescador, R., Lozoya, E., Ku, L.M., Flores, N., Becerril, B., Valle, F. and Bolívar, F. (1987). Determination of the nucleotide sequence for glutamate synthase structural genes of Escherichia coli K-12. Genes 60: 1 - 11.
- 24.- Pahel, G., Zelenetz, A.D. and Tyler, B.M. (1978). gltB gene

- and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in Escherichia coli. J. Bacteriol. 133: 139 - 148.
- 25.- Reitzer, L. and Magasanik, B. (198) Chapter 20. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine and D-alanine. B.1 Biosynthesis of amino acids. E. coli and S. typhimurium.
- 26.- Rendina, A.R. and Orme-Johnson (1978) Glutamate synthase: On the kinetic mechanism of the enzyme from Escherichia coli W. Biochem. 17: 5388 - 5393.
- 27.- Rosenfeld, S.A. and Brenchley, J.E. (1983). Regulation of glutamate and glutamine biosynthesis. In Hermann, K.M. and Somerville, R.L. (Eds), Amino acids: Biosynthesis and genetic regulation. Addison- Wesley, Cambridge, M.A. pag. 1 -17.
- 28.- Singer, M., Baker, T.A., Schnitzler, G., Deischel, S.M., Goel, M., Dove, W., Jaacks, K.J., Grossman, A.D., Erickson, J.E. and Gross, C.A. (1989). A collection of strains containing genetically linked alternating antibiotic resistance elements for genetic mapping of Escherichia coli. Microb. Rev. 53: 1 - 24.
- 29.- Senior, P.J. (1975). Regulation of nitrogen metabolism in E. coli and K. aerogenes studies with the continuous culture technique. J. Bacteriol. 123: 407 - 418.
- 30.- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503 - 517.
- 31.- Trotta, P.P. Platzer, K.E.B., Haschemeyer, R.H. and Meister,

A. (1974). Glutamine - binding subunit of glutamate synthase and partial reactions catalyzed by this glutamine amidotransferase. P.N.A.S. 71: 4607 - 4611.

32.- Tyler, B. (1978). Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. Ann. Rev. Biochem. 47: 1127 - 1162.

33.- Wu, T.T. (1966). A model for three - point analysis of random general transduction. Genetics 54: 405 - 410.

34.- Young Kim S., McLaggan, D. and Epstein, W. (1990). The gdhA gene is located at 38.6 minutes on the Escherichia coli map. J. Bacteriol. 172: 6127-6128.