

2  
2EJ

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del Colegio de  
Ciencias y Humanidades**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

**CARACTERIZACION DE LOS MECANISMOS QUE CONTROLAN LA  
REPRESION DE LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA DE  
*Escherichia coli.***

**T E S I S**

Que para obtener el título de

**LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA**

presenta

**NORMA ISABEL GARCIA CALDERON**

México, D.F., 1995.

**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.

**A mi madre por ser siempre un ejemplo a seguir en la vida.**

**A mi tía, mi tío, mi abuelita  
y mi primo por su cariño.**

**A Ponco por su paciencia, su ayuda,  
su apoyo y su comprensión durante  
todo el desarrollo de este trabajo.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Dra. Laura Camarena por sus enseñanzas, amistad y apoyo incondicional.**

**A los Dres. Jorge Calderón, Carmen Gómez, Alicia González y Luis Servín por sus valiosas observaciones y críticas con respecto a éste trabajo.**

**A Aurora Osorio, Monserrat Sordo, Sergio Casas, Paloma López, Sebastián y Julia por su amistad, consejo, apoyo y todas las pláticas tan formativas sostenidas en el laboratorio.**

**A Fernando, Chucho, Rafael, Tere, Judith y Don Mike, por las consultas académicas y no académicas.**

**A Santiago Martínez, por el soporte técnico brindado.**

**A Carla, Gino, Gaby, Tania, Lucia, Alejandra y Mario por todo lo bueno que ha ocurrido durante estos cinco años.**

**A todos mis amigos del Coro y sus directores Gabriel Saldívar y Lupita Campos por enriquecer una parte muy importante de mi formación como ser humano.**

**A Claudia, Blanca y Angélica por la amistad que nos une desde hace tantos años.**

## RESUMEN

La asimilación de amonio es el proceso mediante el cual se forman compuestos nitrogenados celulares. Esta asimilación ocurre en *Escherichia coli* principalmente mediante la actividad de dos enzimas, de ellas la GDH, sintetiza ácido glutámico a partir de alfa-cetoglutarato y amonio. Con respecto a la glutamato deshidrogenasa (GDH), se conoce el gen que la codifica (*gdhA*) su secuencia y la secuencia de las regiones 5' y 3' que la flanquean. (Valle, et al., 1984). Existen varios reportes relacionados a la regulación del gen *gdhA* en cuanto a si la actividad de GDH es regulada o no por la disponibilidad de nitrógeno en el medio de cultivo. El objetivo principal de ésta tesis fue elucidar los mecanismos que controlan la represión de la actividad de la glutamato deshidrogenasa cuando las células utilizan glutamato como fuente de nitrógeno.

Mediante ensayos de tipo Northern blot, fuimos capaces de demostrar que la disminución de la actividad de GDH es un fenómeno a nivel transcripcional. A partir de RNA total proveniente de células crecidas en ácido glutámico como fuente de nitrógeno se observó, que la cantidad de transcrito del gen *gdhA* disminuye en relación a la cantidad observada en células crecidas en exceso de amonio.

Con el objetivo de discernir si las proteínas reguladoras del metabolismo nitrogenado juegan algún papel en la represión, fueron determinadas las actividades de la GDH en diferentes fondos genéticos. Encontramos que la cepa MX902, la cual lleva una inserción del transposón Tn5 en el gen *glnG*, presenta una alta actividad de GDH independientemente de la fuente de nitrógeno que sea utilizada. La proteína codificada por *glnG*, se denomina NR<sub>I</sub> y es un regulador global en la asimilación y metabolismo de compuestos nitrogenados.

Dado que el análisis de la secuencia regulatoria del gen *gdhA* no muestra homología con la secuencia consenso de unión de NR<sub>1</sub>, se consideró que se trata de un mecanismo de represión indirecto. Por analogía con *Klebsiella aerogenes* se sabe que GDH es reprimida a nivel de transcripción por el gen *nac* (nitrogen assimilation control) mismo que es controlado por el producto de *glnG*. Por lo tanto se intentó encontrar este mismo gen en *E. coli*, y por análisis de Southern blot utilizando como sonda el gen *nac* de *K.aerogenes* se encontró una banda que hibridó en la cepa silvestre. Esto nos indica que posiblemente que *nac* esté presente en *E. coli* y que sea el responsable de la represión de GDH. Asimismo se midieron las actividades enzimáticas en la MX902 y en la misma MX902 transformada por el plásmido pPC36 que contiene el gen *nac* de *K.aerogenes* bajo control del promotor *tac*. Los resultados indican que hay una represión causada por la presencia de *nac* en la cepa, y es buen indicativo de que este gen sea el responsable de la represión de GDH. Por otro lado se hicieron análisis de Northern blot del nivel de transcripción del gen *gdhA* en dichas condiciones y los resultados indican que la represión es a nivel de transcripción y que ésta se restaura bajo el control de *nac*. Por último analizando la secuencia regulatoria del gen *gdhA* de *E.coli*, se encontró una secuencia de unión a DNA muy parecida a la consenso reportada para *K.aerogenes* de unión de la proteína Nac.

Las conclusiones derivadas de este trabajo son: la GDH es regulada por la disponibilidad de nitrógeno en el medio en condiciones de exceso de amonio y glutamato; la glutamato deshidrogenasa es reprimida a nivel de transcripción cuando las células utilizan glutamato como fuente de nitrógeno; los datos genéticos previamente reportados y los resultados de este trabajo sugieren la presencia de un gen homólogo al *nac* de *K. aerogenes* en *E.coli*; se encontró analizando teóricamente la secuencia regulatoria del gen *gdhA* de *E.coli* una secuencia 5'-ATT-N8-TAT-3' en el promotor del gen, similar a la secuencia consenso 5'-ATA-N9-

**TAT-3' encontrada en *K. aerogenes* como sitio de unión de la proteína Nac; la proteína causante de la represión de GDH en glutamato posiblemente es Nac regulada a su vez por NR<sub>1</sub>, producto de *glnG*.**

## **INDICE**

<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>Objetivos</b>	<b>16</b>
<b>Material y Métodos</b>	<b>17</b>
<b>Cepas Bacterianas</b>	<b>17</b>
<b>Condiciones de cultivo</b>	<b>17</b>
<b>Transformación</b>	<b>18</b>
<b>Purificación de plásmidos por el método de mini-prep hervidos</b>	<b>19</b>
<b>Purificación de plásmidos por lisis alcalina</b>	<b>19</b>
<b>Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa</b>	<b>21</b>
<b>Extracción de DNA cromosomal</b>	<b>22</b>
<b>Purificación de RNA total</b>	<b>23</b>
<b>Método de Hibridización RNA-DNA (Northern Blot)</b>	<b>24</b>
<b>Determinación de la glutamato deshidrogenasa</b>	<b>29</b>
<b>Determinación de proteína por el Método de Lowry</b>	<b>30</b>
<b>Hibridización DNA-DNA (Southern Blot)</b>	<b>31</b>

<b>Resultados</b>	<b>35</b>
<b>Actividad específica de Glutamato Deshidrogenasa (GDH) en la cepa silvestre MX614.</b>	<b>35</b>
<b>Análisis tipo Northern Blot del nivel de transcripción del gen <i>gdhA</i> en la cepa silvestre MX614.</b>	<b>37</b>
<b>Actividades enzimáticas de GDH de la cepa MX902</b>	<b>40</b>
<b>Hibridación DNA-DNA (Southern Blot) de la cepa silvestre MX614</b>	<b>41</b>
<b>Actividad específica de GDH en la cepa MX902 transformada con el plásmido pPC36</b>	<b>45</b>
<b>Análisis del nivel de transcripción del gen <i>gdhA</i> de las cepas MX902 y MX902/pPC36</b>	<b>49</b>
<b>Discusión</b>	<b>51</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>61</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>62</b>

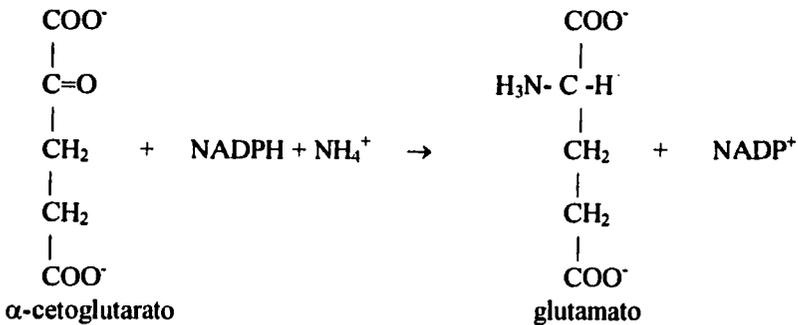
## INTRODUCCION

Las bacterias entéricas son capaces de crecer en medio mínimo constituido por una gran variedad de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía y una variedad más limitada de compuestos orgánicos o inorgánicos como fuente de nitrógeno. A juzgar por las curvas de crecimiento en tales medios, la glucosa es la fuente de carbono predilecta y el amonio es la de nitrógeno. Esta preferencia está reflejada en la composición enzimática de las células, pues éstas contienen enzimas necesarias para obtener energía y esqueletos carbonados a partir de glucosa y enzimas para asimilar amonio. Por otro lado, las enzimas y los sistemas de incorporación para la utilización de otros compuestos como fuentes de carbono y nitrógeno están presentes generalmente en cantidades pequeñas cuando las células son cultivadas en medios con glucosa y amonio. La síntesis de estas enzimas requiere de la inducción por la presencia en el medio del sustrato o alguna sustancia relacionada. Además, la síntesis de enzimas capaces de dar carbono y energía a las células es limitada por la presencia de glucosa en el medio y la síntesis de enzimas capaces de dar a la célula nitrógeno es limitada por la presencia de amonio en el medio. (Magasanik, 1982. Neidhart y Magasanik, 1987)

Todo el nitrógeno celular para la síntesis de macromoléculas en bacterias entéricas proviene del grupo amido de la glutamina, el grupo amino del glutamato o de la incorporación directa de amonio. El glutamato proporciona el nitrógeno para la síntesis de la mayoría de los aminoácidos y la glutamina dona

el nitrógeno para la síntesis de purinas, pirimidinas, aminoazúcares, histidina, triptofano, asparagina, NAD y p-aminobenzoato (Wohlheuter, *et al.*, 1973). En cuanto a la glutamina, ésta también puede donar su grupo amino por medio de las glutaminasas, que catalizan la desaminación hidrolítica de la glutamina, dando como productos glutamato y amonio. *E. coli* tiene dos isozimas que se distinguen por su pH óptimo; la glutaminasa A con un pH óptimo de 5 y la glutaminasa B con un pH óptimo de 7. En bacterias existe la transaminasa de glutamina que cataliza la reacción de la transaminación entre la glutamina y diversos 2-oxoácidos.

*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y otras bacterias entéricas pueden asimilar nitrógeno por la aminación reductiva directa de  $\alpha$ -cetoglutarato en una reacción catalizada por la glutamato deshidrogenasa (GDH):

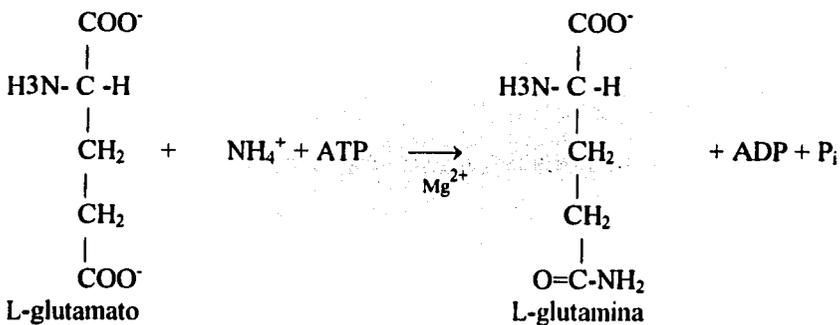


Esta enzima, sin embargo, tiene una  $K_m$  relativamente alta (aproximadamente 1 mM) para amonio y aparentemente es ineficiente cuando la concentración de amonio se encuentra debajo de 1mM. Cuando disminuye la cantidad de amonio

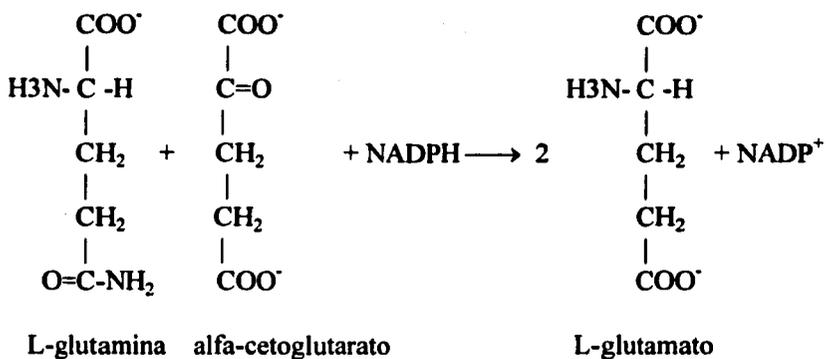
en el medio, las bacterias entéricas responden aumentando la expresión de un número de genes y de operones. Estos operones regulados por nitrógeno (Ntr) codifican productos involucrados en la fijación de amonio o glutamato, el transporte y catabolismo de aminoácidos, etc. (Tabla I). (Magasanik, 1982)

Durante el crecimiento en fuentes limitantes de nitrógeno, la vía glutamino sintetasa(GS)-glutamato sintasa (GOGAT), juega un papel central, las reacciones son las siguientes:

La enzima glutamino sintetasa utiliza amonio y glutamato para sintetizar glutamina:



La enzima glutamato sintasa transfiere el grupo amido de la glutamina al carbono alfa del  $\alpha$ -cetoglutarato, resultando en la producción de dos moléculas de glutamato:



Se necesitan aproximadamente ocho veces más glutamato que glutamina para la biosíntesis de compuestos nitrogenados; así, durante el crecimiento en cantidades limitantes de amonio u otra fuente limitante de nitrógeno, cuando el amonio es asimilado sólo por GS, la mayoría de la glutamina debe ser reciclada a glutamato (Reitzer y Magasanik, 1987).

**Tabla I. Productos derivados de genes u operones regulados por nitrógeno (Ntr) (Bender, 1991)**

Glutamato sintasa
Glutamato deshidrogenasa ( <i>gdhA</i> )
<b>Catabolismo de aminoácidos</b>
Utilización de prolina ( <i>put</i> )
Utilización de triptofano
Utilización de arginina
Utilización de ornitina

El cambio ambiental que sirve como estímulo para la inducción del sistema Ntr es una disminución en la concentración de amonio menor a 1 mM. Este cambio se refleja intracelularmente en la relación glutamina/ $\alpha$ -cetoglutarato. Dado el bajo nivel de GS en condiciones no limitantes de amonio, la disminución en amonio da lugar a una caída rápida en la concentración intracelular de glutamina, cuya conversión a glutamato requiere amonio o glutamina. La baja en la relación glutamina/ $\alpha$ -cetoglutarato activa directa o indirectamente a los elementos que regulan el sistema Ntr. Básicamente éste es controlado por 4 proteínas: una uridiltransferasa/eliminador de uridilo (*glnD*); P<sub>II</sub>, producto de *glnB*; NR<sub>II</sub> una NR<sub>I</sub>-cinasa/NR<sub>I</sub>-fosfato fosfatasa, el producto de *glnL* (*ntrB*); y NR<sub>I</sub>, el producto de *glnG* (*ntrC*). (Stadtman y Ginsburg, 1974; Adler, S.P. *et al.*, 1975; García, E. y Rhee, S.G., 1983; Ninfa, A.J., 1983)

La señal de poca glutamina en relación a la poza de  $\alpha$ -cetoglutarato favorece la actividad de la uridiltransferasa y provoca la conversión de P<sub>II</sub> a P<sub>II</sub>-UMP. P<sub>II</sub> en su forma uridilada (P<sub>II</sub>-UMP) no interfiere con la actividad de cinasa de NR<sub>II</sub>; ésta fosforila a NR<sub>I</sub>, convirtiéndolo a NR<sub>I</sub>-fosfato, forma en la cual activa la transcripción en promotores Ntr a través de una RNA polimerasa(E) que contiene  $\sigma^{54}$ , el producto del gen *rpoN* (*glnF*, *ntrA*). Los promotores de los operones Ntr tienen una secuencia consenso CTGGYAYRN<sub>4</sub>TTGCA, (Ausubel, F.M., 1984) localizada, en el caso de *glnA*, entre las bases -27 y -10 a partir del inicio de la transcripción. (Reitzer, L.J., Magasanik, B., 1985). Estos promotores carecen de las regiones de reconocimiento del factor  $\sigma^{70}$  -10 y -35. El inicio de la transcripción de los

promotores Ntr requiere de la holoenzima E  $\sigma^{54}$  la cual es incapaz de formar complejo abierto hasta que la proteína NR<sub>I</sub>-P promueve la formación del mismo. (Popham, et al., 1989; Ninfa y Magasanik, 1986)

En altas concentraciones de amonio la célula tiene aproximadamente cinco moléculas de NR<sub>I</sub>. Esta cantidad, cuando es fosforilada, es suficiente para activar la transcripción del operón *glnALG* unicamente. La activación es eficiente en este operón por la presencia de sitios múltiples de unión a NR<sub>I</sub>, ubicados arriba de la región promotora que sirven como potenciadores (enhancers) del inicio de la transcripción por la acción combinada de NR<sub>I</sub>-fosfato, RNA polimerasa y  $\sigma^{54}$ . La transcripción es iniciada en un promotor llamado *glnAp2*, uno de los dos promotores en tandem del operón *glnALG*. (Reitzer y Magasanik, 1983) (Reitzer y Magasanik, 1985)

Además de provocar un aumento de casi diez veces en la síntesis de GS (*glnA*), ésta transcripción aumenta el nivel de NR<sub>I</sub> (*glnG*). Cuando la concentración celular de NR<sub>I</sub> sube aproximadamente a 70 moléculas/célula es cuando otros promotores Ntr pueden ser activados. Así, las enzimas para la utilización de nitrógeno parecen ser inducidas en este regulón sólo después de la inducción del la GS y por lo tanto la acumulación de NR<sub>I</sub> y NR<sub>II</sub>. (Reitzer y Magasanik, 1983)

Si se adiciona nuevamente amonio al cultivo, la relación glutamina/ $\alpha$ -cetoglutarato será alta debido a un aumento de formación de glutamina por GS; la estimulación de la actividad removedora de grupos uridilo del

producto del gen *glnD* provoca la remoción de grupos uridilo de P<sub>II</sub>. P<sub>II</sub> en su forma no modificada estimula la actividad de NR<sub>II</sub> convirtiéndola en una fosfatasa que actuará sobre NR<sub>I</sub>, dejándolo inactivo para estimular la iniciación de transcripción en los promotores Ntr, incluyendo *glnAp2*. Esto causa que el nivel de NR<sub>I</sub> por baje por dilución a medida que crecen las células en presencia de amonio abundante. El nivel de NR<sub>I</sub> es mantenido en 5 moléculas/célula al iniciarse la transcripción de *glnLp*, que requiere la RNA polimerasa dependiente de  $\sigma^{70}$  y es reprimida por una alta concentración de NR<sub>I</sub>-P. (Reitzer y Magasanik, 1983)

Así NR<sub>I</sub> es un regulador positivo autógeno en *glnAp2* (lo que permite una amplificación rápida), y NR<sub>I</sub>-fosfato es un regulador negativo autógeno en *glnLp* (lo que previene la sobreproducción). El sitio de unión para NR<sub>I</sub> sobrelapa *glnLp* (Ueno-Nishio, et al., 1984), y dos sitios de unión de secuencia similar, que sirven como potenciadores están localizados a 110 y 140 bp arriba de *glnAp2*, sitios que sobrelapan a *glnAp1* (Reitzer y Magasanik, 1986) cuya transcripción por la RNA polimerasa  $\sigma^{70}$  requiere CAP-cAMP. Este promotor es reprimido por NR<sub>I</sub>-P. De tal manera que en las células que crecen en un exceso de amonio, la transcripción de *glnA* puede iniciarse en *glnAp1* y *glnLp* y por lo tanto, ser regulada negativamente por NR<sub>I</sub>. Este arreglo garantiza un nivel basal de GS, la cual es la única vía conocida para la biosíntesis de glutamina.

El sistema sensor de amonio uridiltransferasa-P<sub>II</sub> está conectado a la adeniltransferasa responsable de la inactivación y activación de la actividad

de la GS por adenilación y desadenilación respectivamente. La adeniltransferasa cataliza la adición de AMP a una subunidad de la glutamina sintetasa, ésta es una reacción dependiente de ATP y se libera  $PP_i$ . Cada subunidad puede ser adenilada, de tal manera que una sola molécula de glutamino sintetasa puede tener 12 grupos adenilos unidos covalentemente. La adeniltransferasa puede también catalizar la eliminación de grupos adenilo de cada subunidad de GS. La reacción de desadenilación no es la reversible de la reacción de adenilación.

*In vivo* la actividad de la adeniltransferasa es regulada por  $P_{II}$ . Esta proteína puede existir como dos formas interconvertibles:  $P_{II}$  y  $P_{II}$ -UMP. La primera estimula a la adeniltransferasa para catalizar la reacción de adenilación de la GS, mientras que  $P_{II}$ -UMP estimula la desadenilación. Como se mencionó anteriormente la interconversión de  $P_{II}$  a  $P_{II}$ -UMP depende de la actividad de la uridiltransferasa (UTasa) que une reversiblemente un grupo UMP a la proteína  $P_{II}$ . La UTasa aparentemente también es capaz de desuridilar a  $P_{II}$ -UMP para convertirla en la forma  $P_{II}$ . La actividad de la UTasa se afecta por las concentraciones altas de  $\alpha$ -cetoglutarato y ATP, que estimulan la uridilación de  $P_{II}$  para formar la  $P_{II}$ -UMP, la cual estimula la desadenilación de la GS. Esto resulta en una actividad biosintética mayor de esta enzima y, por lo tanto, en mayor síntesis de glutamina. La reacción de uridilación de la  $P_{II}$  se inhibe por glutamina y fosfato inorgánico, lo que resulta en la forma  $P_{II}$  de esta proteína, y por lo tanto se estimula la adenilación de GS. La adeniltransferasa también responde a los niveles de ATP,  $\alpha$ -cetoglutarato y glutamina, de manera que

concentraciones altas de glutamina y bajas de  $\alpha$ -cetoglutarato estimulan la adenilación, mientras que niveles bajos de glutamina y altos de  $\alpha$ -cetoglutarato y ATP estimulan la desadenilación. Se ha demostrado que el grado de adenilación de la GS es muy sensible a las concentraciones intracelulares de  $\alpha$ -cetoglutarato y glutamina, y que pequeños cambios en la relación de las concentraciones de  $\alpha$ -cetoglutarato/glutamina causan cambios dramáticos en la adenilación de GS (Stadtman y Ginsburg, 1974; Adler, S.P. *et al.*, 1975; García, E. y Rhee, S.G., 1983).

Todas estas reacciones integran una cascada bicíclica, (ver figura I, Stock *et al.*, 1985) la cual hace que las células tengan una sensibilidad aumentada a pequeños cambios en concentraciones de los efectores (la glutamina y el  $\alpha$ -cetoglutarato), y también ajusta rápidamente el estado de adenilación-desadenilación de la glutamino sintetasa, y en consecuencia, su actividad biosintética. La cascada bicíclica no resultaría tan eficiente por si sola si la cantidad de glutamino sintetasa sintetizada por la células no fuese regulada por el nitrógeno disponible, o sea, dentro de la respuesta Ntr.



El conocimiento acerca de los mecanismos bioquímicos conocidos para detectar la limitación de nitrógeno en el medio ambiente así como las fluctuaciones en la relación glutamina/ $\alpha$ -cetoglutarato, la transmisión de señales y la fosforilación de  $NR_I$  que es la responsable de la respuesta Ntr, es incipiente. En *E.coli* se ha demostrado que cepas mutantes en *glnD*, y en *glnB*, las cuales contienen mutaciones puntuales, son incapaces de sintetizar uridiltransferasa y producen una proteína  $P_{II}$  alterada, respectivamente. Ambas cepas son auxótrofas de glutamina, dado que son incapaces de convertir  $P_{II}$  en  $P_{II}$ -UMP. Por otra parte, se ha visto que su auxotrofia puede ser suprimida por mutaciones en *glnL*, por lo que se ha propuesto que  $P_{II}$  reprime la expresión de glutamino sintetasa por interacción de  $NR_{II}$ . Evidencias adicionales demuestran que cepas de *E.coli* y *Klebsiella pneumoniae* que poseen mutaciones que nulifican completamente *glnL*, tienen una regulación nitrogenada normal. Además se ha encontrado que la proteína  $P_{II}$  es necesaria para una rápida desfosforilación de  $NR_I$ , pero no tiene efecto sobre la auto-fosforilación de  $NR_{II}$ . Así, estos resultados sugieren que  $P_{II}$  y  $NR_{II}$  no deben ser las únicas señales transmitidas a  $NR_I$ . Otras posibles alternativas podrían ser reacciones análogas de fosfotransferencia como las catalizadas por los productos de *cheA* y *envZ*, los cuales, se ha demostrado *in vitro* que fosforilan a  $NR_I$ . (Bueno, *et al.*, 1985; Magasanik, 1982)

La glutamato deshidrogenasa (GDH) ha sido purificada de *E.coli* y *S. typhimurium*. Esta enzima utiliza NADPH, pero no NADH, para la reducción de alfacetoglutarato, lo cual sugiere una función biosintética. (Sakamoto, *et al.*, 1975; Veronese, 1975)

GDH es un hexámero de subunidades idénticas con un peso molecular de 300,000 daltones. Las mutaciones que dan como consecuencia la pérdida de la enzima mapean en el minuto 38.5 en *E.coli* y *S. typhimurium*, lo que indica que en ese minuto se localiza su gene estructural. Además se conoce la secuencia que codifica para la proteína así como la de las regiones 5' y 3' que la flanquean. Se sabe que su promotor requiere de la RNA polimerasa asociada al factor  $\sigma^{70}$ . (Bender, *et al.*, 1976; Pahel *et al.*, 1978; Rosenfeld, *et al.*, 1982; Young, K.S., *et al.*, 1990)

*Klebsiella aerogenes* ha sido el sistema más estudiado hasta el momento en relación a la represión de GDH. La correlación entre el grado de limitación de nitrógeno y el nivel de actividad de GDH en *K. aerogenes* indican que mutaciones en *glnL<sup>C</sup>* (*glnL45*) dan una alta expresión de *glnA* y *glnG* y se reprime GDH. Una cepa con mutaciones del tipo *gltB-* y *glnL<sup>C</sup>* requiere glutamato para crecer porque la actividad de GOGAT es deficiente y GDH es reprimida.

Cierto tipo de revertantes, seleccionadas por su habilidad de crecer en un medio glucosa-amonio, no pueden reprimir GDH y carecen de histidasa (un sistema Ntr) durante limitación de nitrógeno. Una mutación en el gen *nac* (control de asimilación de nitrógeno) parece ser el responsable de este fenotipo. Recientemente se ha reportado que el producto de este gen juega un papel importante en *K. aerogenes* con respecto a la respuesta de ciertos genes a limitación de nitrógeno y que actúa como represor de *gdhA*, el gen

estructural de GDH en condiciones de alto y bajo amonio.( Bender, *et al.*, 1976; Bender, *et al.*, 1983; Schwacha, *et al.*, 1993b)

En relación con *S.typhimurium* se sabe que la glutamato deshidrogenasa no es regulada por la fuente de nitrógeno o la presencia de glutamato. La única regulación se presenta al parecer cuando las células son crecidas en medio rico o con una mezcla de aminoácidos.(Brenchley, *et al.*, 1975)

Existen varios reportes sobre la regulación del gen *gdhA* en *E. coli*, en cuanto a si la actividad de glutamato deshidrogenasa es regulada o no por la disponibilidad de nitrógeno en el medio de cultivo. Uno de ellos, Pateman(1969) observó que ciertos organismos, entre ellos *E. coli*, al ser crecidos en amonio tenían actividad alta de GDH y baja de GS y al ser crecidos en glutamato tenían actividad baja de GDH y alta de GS, de estos resultados se concluyó que el L-glutamato reprime la síntesis de GDH.

Otros reportes, Varicchio (1969), Pahel *et al* (1978) y Castaño *et al* (1988) afirman que no observaron una regulación de la actividad de GDH por la disponibilidad de nitrógeno en el medio de cultivo (amonio 0.5 mM ), y además Varrichio reportó al igual que Pateman que GDH es reprimida en presencia de glutamato en el medio y que esta represión no es a nivel de atenuación.

Desde otra perspectiva, Riba *et al* (1988), reportan datos de actividades específicas de GDH usando concentraciones excedentes y limitantes de

amonio (15mM NH<sub>4</sub>Cl como concentración excesiva y 0.5mM NH<sub>4</sub>Cl como fuente limitante) como fuentes de nitrógeno, ellos observaron que la actividad de GDH es 4 veces mayor cuando las células fueron crecidas en concentración excesiva de amonio. Cabe destacar que en este reporte no analizan la represión de GDH utilizando ácido glutámico como fuente de nitrógeno en el cultivo. Además, presentan datos de que los niveles de mRNA en limitación y exceso de amonio son variables. Por lo tanto afirman que la regulación en exceso y limitación de amonio es a nivel de transcripción a partir de un sólo promotor que produce un solo transcrito del gen *gdhA*.

Este último reporte mencionados presenta una contradicción importante con los anteriores aquí mencionados, ya que afirma que el nivel de actividad y el nivel de transcripción de la glutamato deshidrogenasa dependen de la disponibilidad de nitrógeno en el medio, mientras que los otros reportes afirman lo contrario, que la actividad de GDH es independiente de la disponibilidad de nitrógeno en el medio. Es importante señalar que tal divergencia no se debe a la distancia cronológica de los artículos, ya que el de Castaño *et al.* y el de Riba *et al.* son del mismo año, y utilizan la misma cepa silvestre para sus experimentos, la MX614 derivada de K-12, misma que se utilizó durante este trabajo, además los medios y métodos también son iguales. Por lo que respecta a los otros reportes, Varicchio utiliza *E. coli* B para sus experimentos, lo que puede ocasionar variaciones en los resultados en comparación de *E. coli* K, como lo demuestra Pateman en su artículo, donde realiza experimentos con los dos tipos de *E. coli*, obteniendo resultados diferentes entre las dos subespecies de bacteria, sobre todo en cuanto a la

disponibilidad de amonio como fuente de nitrógeno, sus resultados con *E. coli* B coinciden con los de Varicchio, y los de *E. coli* K demuestran que la GDH depende de la disponibilidad de nitrógeno en el medio. Dada la incertidumbre de los resultados anteriores, uno de los objetivos del presente trabajo fue precisamente tratar de aclarar tal divergencia de ideas, de tal manera que se pudiese elucidar el o los mecanismos de represión de la glutamato deshidrogenasa en *E. coli*.

## **OBJETIVO GENERAL**

**Elucidar los mecanismos que controlan la represión de la actividad de la glutamato deshidrogenasa en diferentes medios de cultivo.**

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

**Verificar si los niveles de GDH dependen o no de la disponibilidad de nitrógeno en el medio.**

**Elucidar los mecanismos que controlan la represión de la actividad de la glutamato deshidrogenasa cuando las células utilizan glutamato como fuente de nitrógeno.**

## MATERIAL Y METODOS

### Cepas Bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas durante este trabajo fueron:

MX614: derivada de *E. coli* K-12. Genotipo: F<sup>-</sup>,  $\Delta(lac-pro)$  *galE ilv-680, thi-1*.

MX902: derivada de la anterior, mismo genotipo pero además *glnG74::Tn5*.

JM103:  $\Delta(lac-pro)$ , *thi, strA, supE, endA, sbcB, hsd R<sup>-</sup>, F' tra D36, proAB<sup>+</sup>, lac I<sup>f</sup>, Z  $\Delta$ M15*.

HB101: F<sup>-</sup>, *hsdS20(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>)*, *recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20(Sm<sup>r</sup>), xyl-5, mtl-1, supE44,  $\lambda$ <sup>-</sup>*.

### Condiciones de cultivo.

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

Los medios de cultivo utilizados fueron:

Luria: que contiene 1% de bacto triptona, 0.5% de extracto de levadura y 1% de cloruro de sodio.

Medio mínimo NN: contiene fosfato monobásico de potasio 13.6g/l, sulfato de potasio 2.61 g/l, sulfato de magnesio heptahidratado 0.2 g/l, cloruro de calcio 0.01%, cloruro de calcio 0.01 g/l, sulfato ferroso heptahidratado 0.05 mg/l. El pH final debe ser de 7.4, se ajusta con KOH.

Se esteriliza por autoclave 20 minutos, a 15 lb y 121°C .

Como fuente de carbono se añadió al medio glucosa al 0.2% (concentración final). Como fuentes de nitrógeno se usaron a concentraciones finales: cloruro de amonio 15 mM (amonio en exceso), cloruro de amonio 0.5 mM (bajo amonio) y ácido glutámico 0.2%.

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

Los cultivos de MX614 y MX902 fueron suplementados con L-isoleucina(50 µg/ml), L--valina(50 µg/ml), prolina (100µg/ml) y tiamina (0.2µg/ml).

Las concentraciones de antibiótico cuando eran requeridas fueron: ampicilina 100µg/ml, tetraciclina fueron 25 µg/ml, kanamicina 50 µg/ml, estreptomycin 100µg/ml y espectinomicina 50µg/ml.

## **Métodos**

### **Transformación.** (Cohen, S.N. *et al.*, 1972)

A partir de un cultivo de la cepa deseada, inocular 10ml de luria con 0.2 ml del cultivo. Crecer hasta una densidad óptica de 0.5 a 550nm. Dejar en hielo 10 minutos y centrifugar estéril en tubos de vidrio 4 minutos a 4500 rpm. Resuspender en 5 ml de CaCl<sub>2</sub> 100mM e incubar 15 minutos en hielo. Centrifugar 4 minutos a 4500 rpm y resuspender en 0.66 ml de CaCl<sub>2</sub> 100mM. Dejar en hielo 1 hora para posteriormente tomar 200µl de células y

agregarlas a un tubo Eppendorf con plásmido (no más de 10µl de plásmido). Incubar 30 minutos en hielo y dar choque térmico a 42°C durante 2 minutos. Reposar otros 2 minutos en hielo y agregar 0.8ml de luria. Incubar a 37°C durante 45 minutos para que las células expresen la resistencia al antibiótico y centrifugar 20 segundos. Resuspender las células en lo que queda de decantar y platear todo en medio selectivo.

### **Purificación de plásmidos por el método de mini-prep hervidos. (Holmes y Quigley, 1981)**

A partir de 2 ml de un cultivo de toda la noche en medio selectivo, se pasan las células a un tubo Eppendorf donde se centrifugan 4 minutos. Se resuspenden en lo que quede de medio y se agregan 300µl de STET (8% sacarosa, 5% tritón, 50mM EDTA pH 8.0, 50mM Tris-HCl pH 8.0) y 30µl de lisozima 10mg/ml. Se agitan en vortex 2 segundos, se hierven 45 segundos exactamente y se centrifugan a temperatura ambiente durante 12 minutos. Se toman 210µl de sobrenadante agregando después 230µl de isopropanol. Se precipitan a -70°C durante 15 minutos y posteriormente se centrifugan 10 minutos en frío. La pastilla se lava con etanol al 70% y se seca al vacío durante 15 minutos. La pastilla se resuspende en 27µl de agua y se corren 3µl en un gel de agarosa al 1%.

### **Purificación de plásmidos por lisis alcalina. (Birnboim, 1983)**

Se toma una colonia de la cepa de interés y se inocula en 10ml de medio selectivo, al día siguiente se inculan 200 ml de medio selectivo con 5

ml del cultivo anterior. Se amplifican con 50mg de cloranfenicol a una densidad óptica de 1.0 a 550nm y se deja hasta el día siguiente. Se centrifugan 10 minutos a 6000rpm, se resuspende en 12 ml de T.E.(Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) y se separan en 6 tubos(2ml por tubo). Agregar: 1 ml de lisozima (10mg/ml) e incubar 30 minutos a 37°C, 2ml de GET frío(50mM glucosa, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0), y 8ml de buffer de lisis fresco (6ml SDS 10%, 0.6gr NaOH, 54ml H<sub>2</sub>O). Dejar en hielo 10 minutos mezclando cuidadosamente, posteriormente agregar 6ml de acetato de potasio 3M frío mezclando bien otros 10 minutos y centrifugar 10 minutos a 7000 rpm. Filtrar el sobrenadante en un embudo con algodón eliminando la pastilla midiendo el volumen del sobrenadante en forma exacta. Agregar 0.6 volúmenes de isopropanol dejando precipitar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar 30 minutos a 7000 rpm, eliminar el sobrenadante. Secar 15 minutos al vacío y resuspender en 600µl de agua. Agregar 20µl de RNasa (10mg/ml) e incubar 30 minutos a 37°C. Extraer una vez con un volumen de fenol equilibrado con TE pH8.0, una vez con un volumen con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico(25:24:1) y una vez con un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico. Precipitar con dos volúmenes de etanol absoluto frío a -20°C durante toda la noche centrifugando 10 minutos en frío. Lavar con dos volúmenes de etanol al 70%, secar y resuspender en 100µl de agua. Correr 2µl en un gel de agarosa al 1%. Cuantificar en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm, 280 nm y 310nm. 1.0 D.O.<sub>260nm</sub> equivale a 50mg/ml de DNA; la relación 260nm/280nm debe dar valores entre 1.7 y 2.0, en caso de ser menor significa que hay proteínas junto

con el DNA. La lectura a 310nm debe ser menor a 0.01 y en caso de ser mayor indica que hay contaminación por fenol.

### **Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.**

Para este procedimiento se utilizó el kit de USBioclean™ MP, el cual es un método rápido para extraer DNA de geles de agarosa, elimina solventes orgánicos, concentra el DNA sin precipitación con etanol y se pueden obtener rendimientos de hasta el 80% de recuperación; el producto de este procedimiento es lo suficientemente puro como para llevar a cabo manipulaciones como marcaje con radioactividad, digestiones enzimáticas o secuenciación. Está basado en el método de Vogelstein y Gillespie(1979), quienes aprovechan la capacidad del vidrio para atraer DNA por carga eléctrica.

El procedimiento inicia cortando las bandas justas de DNA del gel y ponerlas en un tubo Eppendorf. Añadir 3 volúmenes de yoduro de sodio 6M. Incubar a 55°C aproximadamente 5 minutos hasta que se disuelva completamente la agarosa. Añadir 10µl de glass powder (polvo de vidrio) previamente agitado en vortex y mezclar bien. Incubar 30 minutos en hielo. Centrifugar 2 minutos a 3000 rpm en frío y guardar el sobrenadante como precaución. Al tubo que contiene la pastilla añadirle 500µl de buffer de lavado frío y agitar vigorosamente en vortex. Centrifugar 2 minutos a 3000 rpm, eliminar sobrenadante. Lavar 2 veces más eliminando el sobrenadante lo más posible. Resuspender en 30 µl de agua e incubar a 42°C durante una

hora. Correr 3 $\mu$ l en un gel de agarosa al 1%. En caso de no ver la banda en el gel repetir el procedimiento con el sobrenadante que se guardó como precaución desde el punto donde se agrega el glass powder.

### **Extracción de DNA cromosomal.(Maniatis, 1982)**

Hacer un cultivo en 30 ml de medio mínimo toda la noche. Centrifugar 9 minutos a 7000rpm. Eliminar el sobrenadante lo más posible y resuspender en 1ml de T.E. pH8.0. Agregar 1ml de lisozima 5mg/ml disuelta en TE . Incubar 30 minutos a 37°C. Agregar 100 $\mu$ l de proteinasa K 100mg/ml e incubar 15 minutos a 37°C. Posteriormente agregar 0.5 ml de SDS al 10%, agitar suavemente y dejar reposar a temperatura ambiente hasta que se aclare. Añadir 200 $\mu$ l de acetato de sodio 3M, mezclar con el tubo invertido y dejar en hielo 3 minutos. Extraer con 2 ml de fenol equilibrado, agitar bien y dejar 10 minutos en hielo. Centrifugar 10 minutos a 7000rpm. Extraer con 5 ml de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, centrifugar de la misma forma y extraer con 2 volúmenes de cloroformo-alcohol isoamílico. Tomar la fase acuosa y ponerla en un tubo de ensayo y añadir cuidadosamente 5 ml de etanol absoluto frío para formar dos fases. Enrollar el DNA con una pipeta pasteur y pasarlo a un tubo con etanol al 70% frío durante 3 minutos. Pasar la pipeta a un tubo Eppendof con 100 $\mu$ l de agua y esperar a que se resuspenda. Correr 3  $\mu$ l en gel de agarosa al 1% y cuantificar en el espectrofotómetro.

### **Purificación de RNA total (Aiba, *et al.*, 1981)**

Todo el material utilizado durante la manipulación de RNA debe estar horneado (en caso de material de vidrio), o ser nuevo y esterilizado en autoclave durante 25 minutos (en caso de material de plástico). El manejo durante todos los procesos debe llevarse a cabo con guantes y no debe ser tocado por las manos. Los frascos de reactivos como etanol, cloroformo, fenol, etc. debe ser nuevo y solamente introducir pipetas horneadas.

#### **Soluciones y reactivos:**

Agua bidestilada, filtrada y esterilizada, puede además añadirse dietilpircarbonato al 0.2%, concentración final, incubar toda la noche y después esterilizar en autoclave. Con este tipo de agua se preparan las soluciones.

Solución de lisis:

NaAc 20mM pH 5.5

EDTA 1mM

SDS 0.5%

Esterilizar por autoclave

Fenol bidestilado saturado con NaAc 20mM pH 5.5 y EDTA 1mM

Acetato de sodio 3M pH 5.5 (autoclaveado)

Etanol absoluto

Etanol al 70%

#### **Procedimiento:**

Hacer un cultivo de toda la noche de la cepa deseada en medio mínimo con sus requerimientos respectivos.

Inocular matraces con 0.1ml por cada 10 ml de medio y crecer hasta una densidad óptica de 80 kletts. Una vez lograda esta densidad inmediatamente centrifugar en corex siliconizados de 30ml, a 10000 rpm durante un minuto a 4° C. Resuspender en 1/10 del volumen de solución de lisis. Una vez resuspendido se calienta a 65°C un minuto. Inmediatamente agregar 1 volumen de fenol saturado previamente calentado a 65°C. Agitar en incubadora a 65° C, 200-300 rpm durante 10 minutos asegurando que se mezclen las fases. Centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Sin mezclar las fases, sumergir los tubos unos segundos en baño maría a 65°C, tomar fase acuosa repetir dos veces más las extracciones. Precipitar con 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5.5 más 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C durante toda la noche. Centrifugar a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Resuspender en 500µl de agua y extraer con un volumen de cloroformo. Volver a precipitar. Centrifugar en el cuarto frío 15 minutos, lavar con etanol al 70% , secar la pastilla ligeramente y resuspender en 50µl de agua. Leer en el espectrofotómetro 5 ó 10µl de la muestra en 1ml de agua a 260, 280 y 310 nm. El valor de la relación 260/280 debe ser de 2.0 y el de 310 < 0.01. El valor de 1.0 a una D.O. de 260 nm equivale a 40 µg/ml de RNA.

**Método de Hibridización RNA-DNA (Northern Blot).**(Thomas, 1980)

Soluciones:

MENP 10X (1 lt)

MOPS                    41.8gr

NaAc                    6.8gr                    Ajustar pH a 7.0

EDTA                    3.7gr

**Mezcla de muestras (610µl)**

Formamida desionizada            400µl

Formaldehído 37%                    36µl

MENP 10X                            90µl

H<sub>2</sub>O                                        84µl

**Fosfato de sodio y potasio 1M pH 6.9**

**Solución de Bromofenol (10ml)**

5 ml de glicerol

0.05% de azul de bromofenol

100µl Fosfato de sodio y potasio pH 6.9

5 ml de agua.

**SSC 20X**

NaCl 3M

Citrato de sodio 0.3M

**Denhart 50X**

Ficoll                                    1%

Polivinilpirrolidona                1%

BSA                                        1%

**Solución de prehibridización (10ml)**

Formamida                            5.0ml

20X SSC                                2.5ml

Fosfato de Na y K pH6.90.5ml

Pirofosfato de Na 2%	0.5ml
SDS 10%	0.1ml
Denhart 50X	1.0ml
DNA timo de ternera (10mg/ml)	0.25ml
EDTA 0.5M	0.05ml
H <sub>2</sub> O	0.05ml

Desnaturalizar el DNA 5 minutos a 100°C, poner en hielo y añadir a la solución de prehibridización.

#### Solución de hibridización

Formamida	5.0ml
20X SSC	2.5ml
Fosfato de Na y K pH6.9	0.5ml
Pirofosfato de Na 2%	0.5ml
SDS 10%	0.1ml
Denhart 50X	0.2ml
DNA timo de ternera (10mg/ml)	0.25ml
Sonda marcada	0.125ml
EDTA 0.5M	0.05ml
H <sub>2</sub> O	0.05ml

Desnaturalizar el DNA (timo de ternera y sonda juntos) 5 minutos a 100°C, poner en hielo y añadir a la solución de hibridización.

#### Preparación de la sonda de DNA.

Se extrajo el plásmido pSAE4 a partir de la cepa HB101. Este plásmido contiene el gen *gdhA*, que tiene un 100% de homología con el gen del mismo nombre de la cepa silvestre (MX614) y una longitud de aproximadamente 1.6

kb. Se digirieron 120µg con la enzima de restricción *PstI* para linearizarlo y la banda de 7.2kb fue purificada por el método de purificación de fragmentos a partir de geles de agarosa (glass powder) descrito anteriormente. 300 ng de fragmento fueron marcados por el Método de Nick Translation del kit de BRL con dCTP alfa-<sup>32</sup>P.

#### Gel desnaturalizante.(Tsang et al., 1993)

La agarosa se prepara poniendo por cada 100ml finales de agarosa:

10 ml MENP 10X

1.5 gr. agarosa (gel al 1.5%)

aforar a 94.6ml con agua

se autoclavea durante 15 minutos. Cuando se ha enfriado hasta 65°C se añaden 5.35ml de formaldehído para una concentración final de 0.66M.

Tanto el peine como el molde para el gel y la cámara de electroforesis deben ser tratados contra RNAsas. Sumergirlos en NaOH 0.5M durante toda la noche y enjuagar con agua desionizada estéril.

El buffer de corrida es MENP 1X, y se utiliza una bomba peristáltica para recircular el buffer durante toda la corrida, misma que se llevará a cabo en el cuarto frío.

#### Preparación de muestras.

Tomar 7.5 µl de RNA (20µg) y agregar 22.5µl de mezcla de muestras recién hecha y mezclar. Calentar a 65°C dos minutos y poner en hielo 5 minutos. Añadir 3µl de solución de bromofenol, mezclar y cargar en el gel. El gel se corre toda la noche en el cuarto frío a 20V.

#### Transferencia.

El gel se pasa a una cámara de transferencia que contiene SSC 20X.

Se transfiere durante 20 horas. Después de la misma la nitrocelulosa se deja secar entre 2 filtros whatman, y luego se hornea a 80°C durante 2.5 horas en un horno con vacío.

### **Hibridización.**

Enjuagar el filtro en SSC 4X durante 5 minutos y dejar escurrir (casi secar); poner en una bolsa para hibridización y añadir solución de prehibridización. Sellar la bolsa y prehibridizar a 42°C durante toda la noche. Abrir una esquina, sacar la solución de prehibridización y llenar con solución de hibridización con la sonda radioactiva. Hibridizar toda la noche. Desechar la solución de hibridización y lavar el filtro.

### **Lavado del filtro.**

El filtro se lava tres veces durante 5 minutos a temperatura ambiente en SSC 2X y SDS 0.1%. Después se lava dos veces durante 10 minutos en SSC 0.1X y SDS 0.1% a 42°C. Por último se enjuaga el filtro en 0.1X de SSC dos veces durante 15 minutos, se seca en un filtro whatman y se expone con un film de rayos X.

En caso de querer hibridar el gel otra vez hay dos opciones, una es lavar durante 3 hrs. a 65-70°C en la solución que a continuación se muestra y otra es lavar el filtro 10 minutos en la siguiente solución hirviendo:

5mM Tris-HCl pH 8.0

0.2mM EDTA pH 8.0

0.05% Pirofosfato de sodio

0.002% Denhart

### Determinación de la glutamato deshidrogenasa. (Meers, et al., 1970)

Hacer un cultivo de toda la noche en 5 ml. de mínimo suplementado adecuadamente. Crecer los cultivos en los medios adecuados y esperar a que llegen a 80 unidades klett (U.K.). Todo el procedimiento se realiza en frío. Cuando llegan a 80 U.K., lavar una vez con 10 ml de buffer de extracción (50mM Tris-HCl pH 7.6, 0.71%  $\beta$ -mercaptoetanol) y resuspender en 1ml del mismo buffer. Sonicar con 2 pulsos de 10 sg. Centrifugar 1 minuto en frío. Poner 0.9 ml de mezcla de reacción en una celda y agregar el extracto. Agitar e inmediatamente leer en el espectrofotómetro a 340 nm. Calibrar con agua.

Mezcla de reacción (para 1 muestra)

	Completa	Sin amonio	Sin $\alpha$ -cetoglutarato
Agua	625 $\mu$ l	675 $\mu$ l	675 $\mu$ l
Tris 1M pH 7.6	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
NH <sub>4</sub> Cl 0.534g/ml	50 $\mu$ l	-----	50 $\mu$ l
NADPH (1.66mg/ml)	125 $\mu$ l	125 $\mu$ l	125 $\mu$ l
$\alpha$ -cetoglutarato	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	-----

La fórmula para calcular la actividad específica de la enzima es la siguiente:

$$GDH = \Delta_C (\Delta_{s/NH_4Cl} + \Delta_{s/\alpha\text{-ceto}}) \times 0.1 \div 0.62 \div \text{cantidad de proteína}$$

$\Delta_C$  = diferencia de  $T_0 - T_1$  de la mezcla completa.

$\Delta s/\text{NH}_4\text{Cl} + \Delta s/\alpha\text{ceto}$  = suma de las diferencias de T0-T1 de las condiciones sin amonio y sin  $\alpha$ -cetoglutarato.

0.1 es el factor de dilución del extracto

0.62 es el valor de la actividad específica estandar

La cantidad de proteína es determinada por el método de Lowry y está en función de la proteína total del extracto.

### **Determinación de proteína por el Método de Lowry. (Lowry et al, 1951)**

Se preparan las siguientes soluciones:

- Solución A, para 1 litro

NaOH 4 g

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  20 g

- Solución B, para 100 ml:

Tartrato de sodio y potasio 2 g

- Solución C, para 100 ml:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1 g

- Solución de BSA, 1mg/ml, se separa en alícuotas y se guarda a  $-20^\circ\text{C}$ .

- Solución mezcla:

Solución A 98 ml

Solución B 1 ml

Solución C 1 ml

- Solución Folín: dilución 1:3 de folín-ciocalteu en agua.

El blanco es 1 ml de agua destilada. La muestra control son 100µl de BSA en 900µl de agua destilada. La muestra problema son 100µl de extracto en 900µl de agua destilada.

A cada una de las muestras anteriores se le agregan 5 ml de la solución mezcla, se agita vigorosamente y se deja reposar por 10 minutos. Posteriormente se agregan 500µl de solución de Folín, se agita vigorosamente y se deja reposar por 30 minutos. Se determina la cantidad de proteína leyendo a 625 nm en el espectrofotómetro.

### **Hibridación DNA:DNA (Southern Blot)**

#### **Procedimiento de Southern Blot.**(Southern, 1975)

Se corre un gel de agarosa al 1% con las muestras de DNA cromosomal total digerido totalmente con distintas enzimas. Se digirieron 7 µg de DNA cromosomal con *EcoRI* y *BamHI* como control negativo se corrió 1µg de DNA de λ digerido con *BstIIE*. Después de correr el gel se tiñó con bromuro de etidio y se sacó una fotografía.

#### **Para desnaturalizar el gel:**

Se remoja el gel en 5 volúmenes de HCl 0.25M con agitación suave, se quita todo el azul de bromofenol hasta que se ve una coloración amarilla en el gel, pero no debe prolongarse más de 15 minutos.

Inmediatamente se coloca el gel en 5 volúmenes de NaCl 1.5M y NaOH 0.5M por 20 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Este lavado se repite una vez más.

**Para neutralizar el gel:**

Neutralizar dos veces el gel en 5 volúmenes de una solución de Tris 1M pH 7.5 - NaCl 1.5M durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se verifica la eficiencia de la neutralización del gel, probando el pH. Si éste no es menor de 8.5, se repite el último lavado.

**Para transferir el gel:**

Se corta el filtro de nylon y se remoja en agua desionizada. Se monta una cámara de transferencia igual que la del Northern Blot. Una vez transferido el DNA se fija al filtro con luz ultravioleta (autocrosslink).

**Prehibridación del filtro:**

El filtro se prehibrida durante 4 horas a 42°C con la siguiente solución:

Para 16 ml. de solución

	Concentración final	
Formamida 100%	50% (v/v)	8.0 ml
SSPE 20X	6X	4.8 ml
(SSPE: NaCl 3M, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 0.2M, Na <sub>2</sub> EDTA, 0.02, pH 7.4)		
Denhart 50X	5X	1.6 ml
SDS 10%	1%	1.6 ml

El DNA de timo (10mg/ml) se utiliza en un volumen de 20µl por cada ml de solución de prehibridación. Se hierve previamente durante 10 minutos y se poner en hielo durante 5 minutos.

**Para hibridar el filtro:**

Dado que la sonda que se utilizó fue heteróloga, las condiciones de hibridación fueron poco estrictas. Se utilizó un 40% de formamida y la

temperatura de hibridación fue de 37°C para obtener un 60-70% de homología entre las secuencias que hibridaran. La solución de hibridación que se utilizó fue la siguiente para 8 ml de solución:

Concentración final		
Formamida 100%	40% (v/v)	3.2 ml
SSPE 20X	6X	2.4 ml
Denhart 50X	5X	0.8 ml
SDS 10%	1%	0.8 ml
Agua	10%	0.8 ml

El DNA de tимо (10mg/ml) fue utilizado en un volumen de 20µl por cada ml de solución. Fue desnaturalizado junto con la sonda marcada con el kit de BioNick(125µl que contenían 1µg de sonda) hirviéndolo durante 10 minutos y poniéndolo en hielo durante 5 minutos.

Para lavar el filtro:

Lavar 2 veces con SSC5X y 0.5% SDS a 42°C durante 5 minutos.

Lavar 1 vez con SSC 0.1 X y 1% SDS a 42°C durante 30 minutos.

Lavar una vez con SSC 2X a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Para unir el conjugado de estreptoavidina-fosfatasa alcalina:

Lavar el filtro en 46 ml de TBS-Tween20 (Tris base 100mM, NaCl 150mM, Tween 20 0.05% (v/v), pH 7.5 filtrar a través de una membrana de 0.45µm estéril) durante un minuto. No hay que dejar que se seque la membrana. Poner la membrana en una bolsa nueva de hibridación. Añadir 34 ml. de solución bloqueadora, precalentada a 65°C. Incubar una hora a 65°C con agitación suave. Por otro lado centrifugar el tubo del conjugado SA-AP

durante 30 minutos en frío, tomar 3µl y llevarlo a 3 ml con TBS-Tween. Regresar la solución de bloqueo a su tubo y agregar el SA-AP diluido. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Cambiar de bolsa de hibridación y enjuagar con 45 ml de TBS-Tween durante 15 minutos a temperatura ambiente. Enjuagar una hora con otros 45 ml de TBS-Tween. Lavar la membrana con la solución de lavado final 1X (4.5 de 10X *final wash buffer* (Tris base 100mM, NaCl 100mM, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 50 mM, pH 9.5) en 45 ml de agua), incubar una hora a temperatura ambiente. Poner la membrana en un folder y a lo largo de la orilla del lado en que cierra agregar 450µl de Reactivo de detección (al desfosforilar la fosfatasa alcalina emite luz, esta señal es detectada por su exposición en una placa de rayos X). Cerrar el folder y extender el reactivo a lo largo de la membrana sin dejar burbujas. Incubar durante 30 minutos a 37°C. Poner a exponer una placa de radiografía durante 1 hora y revelar.

#### Preparación de la sonda de DNA.

La sonda utilizada para el Southern Blot fue extraída del plásmido pPC36 digiriéndolo con *BamHI* para obtener un fragmento de 1.1 kb que contiene el gen *nac* de *K.aerogenes*. El fragmento fue purificado por el procedimiento de purificación de DNA a partir de geles de agarosa descrito anteriormente y fue marcado con el sistema de marcado de BioNick (Sistema de detección de ácidos nucleicos quimioluminiscente), equivalente al procedimiento de Nick Translation, pero no radioactivo basado en un complejo de Biotina-14-dATP mismo que es revelado por el procedimiento de unión del conjugado SA-AP.

## **RESULTADOS**

### **Actividad específica de Glutamato Deshidrogenasa (GDH) en la cepa silvestre MX614.**

Con el objeto de verificar los datos previamente reportados de que la actividad de la GDH es reprimida durante el crecimiento en glutamato, se procedió a determinar la actividad enzimática de GDH en la cepa silvestre MX614 en medio mínimo NN-glucosa suplementado con dos fuentes de nitrógeno: amonio en dos concentraciones distintas, en exceso (15mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) y limitante (0.5mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), y glutamato (12mM glutamato). La siguiente tabla muestra los promedios de los datos obtenidos a partir de experimentos independientes y por triplicado.

Como se puede observar en la Tabla 1, hay una clara represión de la actividad enzimática en glutamato, disminuyendo ésta en aproximadamente 7 veces con respecto a la actividad obtenida en exceso de amonio. En cuanto a la actividad obtenida en limitación de amonio, se puede observar que disminuye en aproximadamente dos veces con respecto a exceso de amonio. Esta diferencia reproduce los datos obtenidos por Riba et al (1988) donde observaron que la actividad de la GDH en alto y bajo amonio (15mM y 0.5mM respectivamente) disminuía.

**Tabla 1. Actividades específicas de GDH en la cepa silvestre MX614 crecida en fuentes limitantes (0.5mM NH<sub>4</sub>Cl y 12mM glutamato) y no limitantes (15mM NH<sub>4</sub>Cl) de nitrógeno.<sup>a</sup>**

Fuente de nitrógeno agregada al medio mínimo NN-glucosa		
15 mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.5 mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	12mM L-glutamato
320.48	157.73	41.30

<sup>a</sup> Las actividades enzimáticas están expresadas como nanomoles de NADPH oxidado por minuto por miligramo de proteína a 21°C.

## **Análisis tipo Northern Blot del nivel de transcripción del gen *gdhA* en la cepa silvestre MX614.**

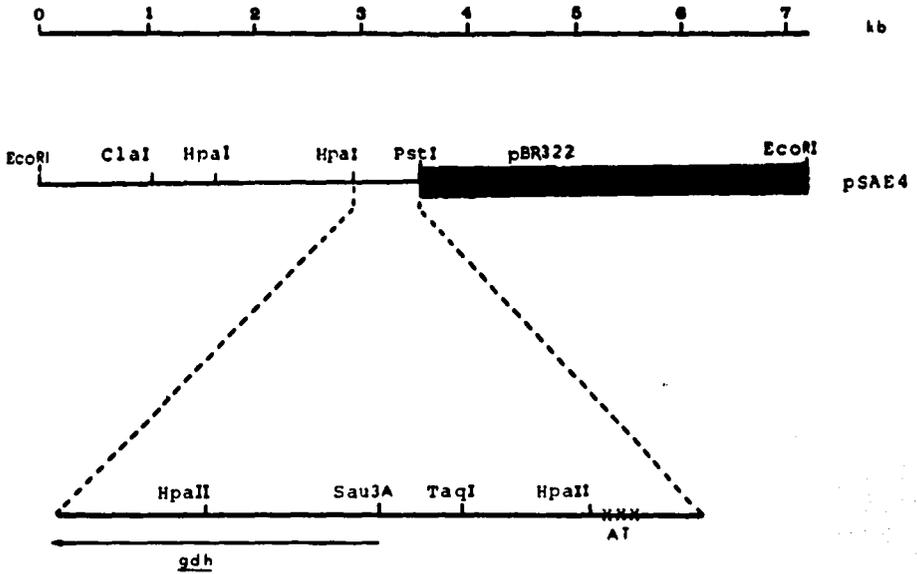
Tomando en cuenta los resultados anteriores, se plantearon dos posibilidades, la primera es que durante el crecimiento en L-glutamato una acumulación de este aminoácido provoque la inhibición de la enzima y por lo tanto, la disminución observada sea provocada por la inhibición a nivel de la actividad de la misma; o alternativamente, que exista un mecanismo responsable de reprimir específicamente la transcripción del gen *gdhA* en estas condiciones de crecimiento.

Para probar cual de estas posibilidades es la correcta, se decidió analizar la cantidad de mRNA correspondiente al gen *gdhA* presente en la cepa silvestre en exceso de amonio y glutámico. Para lo cual a partir de RNA total de la cepa MX614 se realizó un ensayo de hibridización RNA-DNA tipo Northern. La sonda utilizada fue el plásmido pSAE4 que incluía al gen *gdhA* (figura 1), mismo que se digirió con la enzima de restricción *PstI* con el objeto de linearizarlo.

Los resultados de esta hibridización claramente indican que existe un mecanismo de represión a nivel de transcripción del gen *gdhA* en L-glutamato, ya que como se puede observar en la figura 2, existe una diferencia significativa entre la cantidad de transcrito en alto amonio y en L-glutamato. Por lo tanto, estos datos sugieren fuertemente la existencia de un mecanismo

reponsable de reprimir específicamente la transcripción del gen *gdhA* durante el crecimiento celular en L-glutamato como fuente de nitrógeno.

Figura 1. Mapa de restricción del plásmido pSAE4. (Sanchez-Pescador, *et al.*,1982)



**Figura 2.** Análisis del nivel de transcripción del gen *gdhA* en la cepa silvestre.



Hibridización tipo Northern Blot a partir de RNA total la cepa MX614 (silvestre), crecida en distintas fuentes de nitrógeno. Se utilizó una sonda específica de *gdhA* incluida en el plásmido pSAE4. Carriles: A: MX614 crecida en medio mínimo NN-glucosa suplementado con 15mM  $\text{NH}_4^+$ ; B: MX614 crecida en medio mínimo NN-glucosa suplementado con 12 mM de L-glutamato.

## **Actividades enzimáticas de GDH de la cepa MX902.**

Dados los resultados recientemente reportados para *K.aerogenes*, donde han observado una relación indirecta entre la represión de GDH y el sistema Ntr en condiciones de exceso y limitación de nitrógeno, se planteó la hipótesis de que, si bien en *E.coli* no se observa tan claramente que la regulación de la GDH en exceso y limitación de amonio está controlada indirectamente por el sistema Ntr (como en el caso de *K.aerogenes*), probablemente es en estas condiciones particulares (crecimiento en L-glutamato) donde se observa la regulación por el sistema Ntr, específicamente por medio de su efector principal NR<sub>1</sub>.

Se buscó entre otras cepas una en la que el sistema Ntr estuviera alterado y se decidió utilizar la cepa MX902, derivada de la cepa silvestre MX614, la cual tiene el fenotipo Ntr<sup>-</sup> y presenta un crecimiento similar al de la cepa silvestre en exceso de amonio y en glutamato. Este fenotipo fue obtenido al insertar un transposón *Tn5* en el minuto 74 de *E. coli* que corresponde al gen *glnG*, mismo que codifica para la proteína NR<sub>1</sub>, la cual es una de las principales proteínas del sistema Ntr.

Claramente se puede observar en la Tabla 2, que la actividad de la glutamato deshidrogenasa en la cepa MX902 está desreprimida en L-glutamato. Esto sugirió que al poseer el fenotipo Ntr<sup>-</sup>, NR<sub>1</sub> fuera el factor causante de la represión de la actividad de GDH. Una manera de probar esta hipótesis fue analizar la secuencia regulatoria de GDH para buscar sitios de

unión a NR<sub>1</sub>. Este sitio de unión de NR<sub>1</sub> es la secuencia consenso CTGGAYRN<sub>4</sub>TTGCA (Ausubel, F.M., 1984). Al realizar este análisis observamos que no existen sitios de unión a NR<sub>1</sub> en la secuencia regulatoria del gen *gdhA* (figura 3). Por lo tanto, otra posibilidad, por analogía con el sistema de *K.aerogenes*, es que la relación entre NR<sub>1</sub> y la desrepresión de *gdhA* sea indirecta. En el caso de *K.aerogenes*, NR<sub>1</sub> actúa sobre el gen *nac* (nitrogen assimilation control), cuyo promotor es dependiente de la RNA polimerasa  $\sigma^{54}$ , y codifica para una proteína denominada NAC que es el represor del gen *gdhA*. Esta figura será discutida más ampliamente en el próximo capítulo.

Para comprobar esta otra posibilidad se procedió a buscar un gen homólogo al gen *nac* de *K.aerogenes* en *E.coli*.

### **Hibridación DNA-DNA (Southern Blot) de la cepa silvestre MX614.**

Los resultados obtenidos en la sección anterior sugieren, que puede existir un gen homólogo a *nac* de *K.aerogenes* encargado de la represión del gen *gdhA*, en *E.coli*. Para detectar la presencia del gen *nac* en *E. coli* se realizó un análisis tipo Southern Blot. Dada la heterología de la sonda los lavados del filtro se realizaron a baja severidad lo que garantizaba un resultado positivo si hubiera al menos un 60-70% de homología entre la sonda y el DNA total de la cepa silvestre.

El resultado obtenido en la figura 4 muestra una banda de hibridación entre el gen *nac* de *K.aerogenes* y el DNA total de *E.coli*, este resultado

sugiere por lo tanto la existencia de una secuencia homóloga al gen *nac* de *K.aerogenes* en *E.coli*.

**Tabla 2.** Actividades específicas de Glutamato Deshidrogenasa en diferentes cepas de *E.coli* crecidas en fuentes limitantes (12mM L-glutamato) y no limitantes (15mM NH<sub>4</sub>Cl) de nitrógeno.<sup>a</sup>

Cepa	Fuente de nitrógeno agregada a medio mínimo NN-glucosa	
	15 mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	12mM L-glutamato
MX614 cepa silvestre	320.48	41.30
MX902 <i>glnG74::Tn5</i>	268.24	200.16

<sup>a</sup>Las actividades enzimáticas están expresadas como nanomoles de NADPH oxidado por minuto por miligramo de proteína a 21°C.

**Figura 3. Secuencia del gen *gdhA* de *E.coli* K-12<sup>1</sup>(Valle, *et al.*, 1984)**

```

-130                                     -100
CCGGGTGGCA AAAC TTTAGC GTCTGAGGTT ATCGCAATTT

GGTTATGAGA TTACTCTCGT TATTAATTTG CTTTCCTGGG

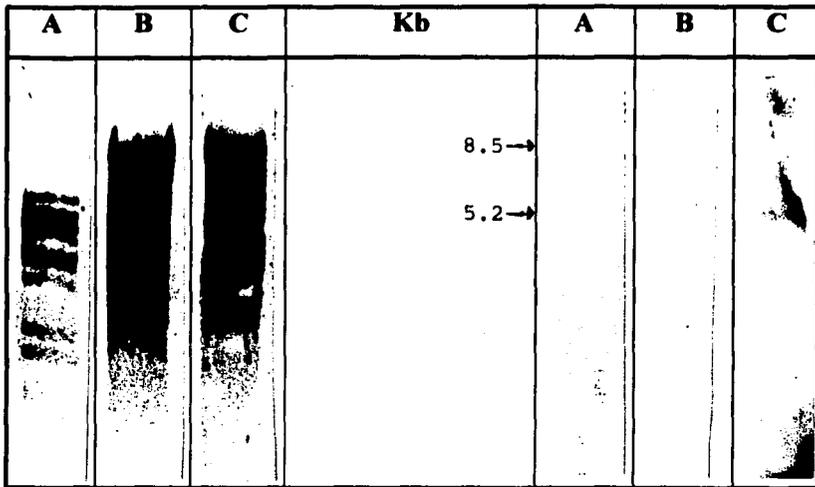
                                     Promotor funcional P3
-50 -----
TCATTTTTTT CTTGCTTAGC GTCACAT*TCT TGATGG TATA*
                _____cAMP-CAP_ *****AAT-N8-TAT*****
-----
                1
GTCGAAAAC T GCAAAGCAC ATGACATAAA CAACATAAGC
                50      ___S.D.____
ACAATCGTAT TAATTATATAA GGGTTTTTATA TCT ATG GAT CAG
                *****ATA-N9-TAT*****           Met Asp Gln
                                     100
ACA TAT TCT CTG GAG TCA TTC CTC AAC CAT
Thr Tyr Ser Leu Glu Ser Phe Leu Asn His

```

**Símbolos:**--- zona del promotor funcional P<sub>3</sub>, TTGCTT.... TATAGT sitio de unión de la RNA polimerasa  $\sigma^{70}$ , \_\_cAMP-CAP\_\_ sitio de unión para la proteína CAP, \*\*\*\*5'-ATT-N8-TAT-3' sitio de unión de la proteína Nac, \*\*\*\*5'-ATA-N9-TAT-3' sitio de unión de la proteína Nac (secuencia consenso de *K.aerogenes*), \_\_\_S.D.\_\_\_ secuencia Shine-Dalgarno, \*5'-T-N11-A\* secuencia consenso de unión de las proteínas de la familia LysR.

<sup>1</sup> En esta figura sólo se representa la región reguladora del gen *gdhA* desde la base -130 y la secuencia llega hasta la base 102. La numeración de los residuos empieza con el inicio de la transcripción del RNA mensajero.

**Figura 4.** Hibridación tipo Southern Blot realizada con DNA cromosomal digerido de la cepa silvestre de *E.coli* MX614 y con la sonda del gen *nac* de *Klebsiella aerogenes* obtenida a partir del plásmido pPC36.



La primera fotografía muestra un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. La segunda fotografía muestra el Southern blot del gel anterior.

Carriles: A: DNA de Lambda digerido con *BstEII* como peso molecular estandar; B: MX614 digerido con *EcoRI*; C: MX614 digerido con *BamHI*.

## **Actividad específica de GDH en la cepa MX902 transformada con el plásmido pPC36.**

La existencia en el DNA cromosomal de *E.coli* de una región homóloga al gen *nac* de *K.aerogenes* nos planteó la siguiente pregunta: ¿existe un gen tipo *nac* en *E.coli*; el cual este involucrado en la represión del gen *gdhA*? Una manera de responder a ésta pregunta era medir las actividades específicas de la cepa desreprimida(MX902) y compararlas contra la misma cepa transformada con un plásmido que contuviera el gen *nac*; de ser afirmativa la respuesta, esta cepa recuperaría la represión de GDH independientemente de la presencia de NR<sub>1</sub>.

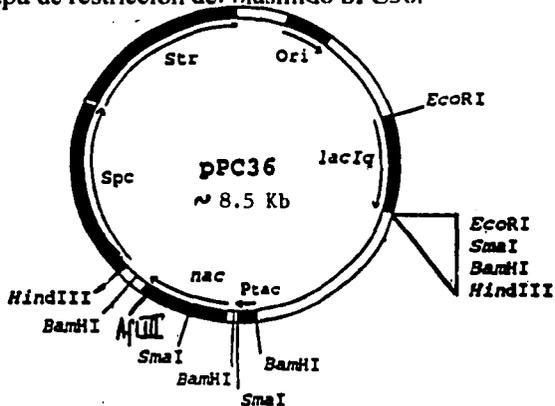
La cepa MX902 fue transformada con el plásmido pPC36 (figura 5). Este plásmido, derivado de pSC101, lleva clonado el gen *nac* de *K.aerogenes* bajo control del promotor *tac*. Además lleva clonado el gen *lacI<sup>f</sup>*, de tal modo que la expresión del gen *nac* solo es inducida por la adición de IPTG en el medio de cultivo.

Se puede observar claramente que la cepa MX902 al ser transformada con el plásmido pPC36 recupera la represión del gen *gdhA* durante el crecimiento en L-glutamato. El hecho de que esta represión no sea equiparable a la obtenida en la cepa silvestre puede deberse en parte a que la proteína codificada por el gen *nac* de *K.aerogenes* no sea idéntica a la proteína codificada por *E.coli*, así el reconocimiento de la proteína NAC no es totalmente específico para el caso de *E.coli*. De manera adicional, se puede

observar que las actividades de GDH en la cepa MX902 transformada con pPC36 son altas en medio mínimo NN-glucosa-amonio alto en presencia de IPTG. Este resultado será discutido en la sección siguiente.

Para dar una idea más clara y para resumir los datos obtenidos a partir de la medición de las actividades específicas de GDH la siguiente gráfica (Gráfica 1) muestra las actividades enzimáticas de GDH de las distintas cepas que fueron utilizadas en este trabajo, en las diferentes condiciones.

**Figura 5.** Mapa de restricción del plásmido pPC36.



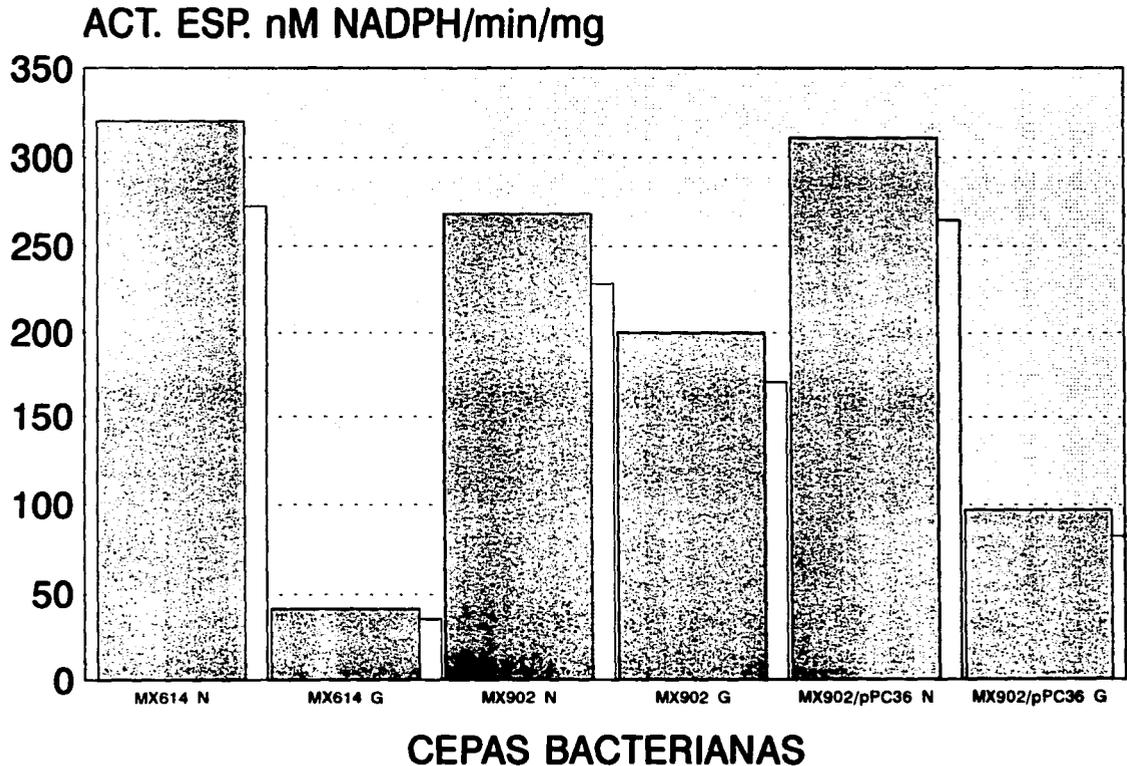
Este plásmido contiene un origen de replicación para *E.coli*, el gen *nac* de *K.aerogenes* sin su promotor y el promotor del gen *tac* y al gen *lacIq* por lo que en este caso el gen *nac* sólo se expresa al inducirlo con una dosis de 0.005mM de IPTG. El IPTG fue añadido al medio de cultivo para todos los ensayos.

**Tabla 3.** Actividades específicas de Glutamato Deshidrogenasa en diferentes cepas de *E.coli* crecidas en fuentes limitantes (L-glutamato) y no limitantes (15mM NH<sub>4</sub>Cl) de nitrógeno.<sup>a</sup>

Cepa	Fuente de nitrógeno agregada a medio mínimo NN-glucosa	
	15 mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	12mM L-glutamato
MX614 cepa silvestre	320.48 +/- 48.03	41.30 +/- 7.64
MX902 <i>glnG74::Tn5</i>	268.24 +/- 31.03	200.16 +/- 33.18
MX902/pPC36 0.005mM IPTG	319.25 +/- 58.91	97.31 +/- 18.67

<sup>a</sup>Las actividades enzimáticas están expresadas como nanomoles de NADPH oxidado por minuto por miligramo de proteína a 21°C.

# ACTIVIDADES ESPECIFICAS DE GDH



Gráfica 1. Actividades específicas de GDH.

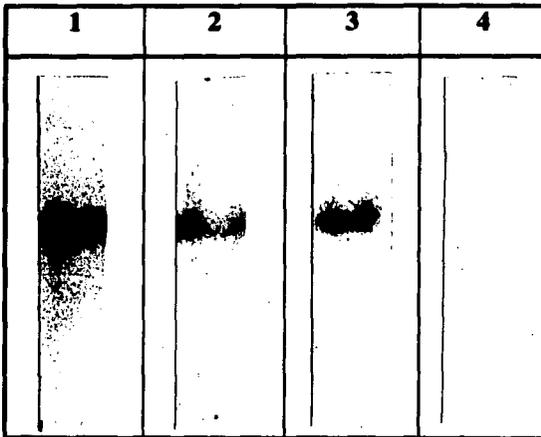
N, amonio en exceso; G, glutamato

### **Análisis del nivel de transcripción del gen *gdhA* de las cepas MX902 y MX902/pPC36.**

A partir de los resultados observados tanto en la Gráfica 1 como en la Tabla 3 la siguiente pregunta era si estos cambios también eran a nivel de transcripción y si la expresión del gen *nac*, inducible por IPTG, influía en el nivel de expresión del gen *gdhA*. Para esto, se extrajo el RNA total de la MX902 y de la MX902/pPC36 y se analizaron por medio de un ensayo de tipo Northern Blot con la sonda del gen *gdhA*.

En la figura 6 se puede ver la clara diferencia en el nivel de transcripción de la cepa desreprimida y de la cepa transformada. Es notable que la introducción del plásmido con el gen *nac* de *K.aerogenes* influye en el nivel de transcripción del gen *gdhA*. Esto último coincide y hace consistentes los datos obtenidos de las actividades enzimáticas, por lo tanto estos resultados sugieren de manera consistente que la proteína NAC es la responsable de la represión del gen *gdhA* en condiciones de limitación de nitrógeno, en este caso específicamente en L-glutamato.

**Figura 6.** Análisis tipo Northern Blot a partir de RNA total de las cepas MX902 y MX902/pPC36 en distintas fuentes de nitrógeno.



Se utilizó una sonda específica de *gdhA* obtenida a partir del plásmido pSAE4. Carriles: 1:MX902 crecida en medio mínimo NN-glucosa y 15mM  $\text{NH}_4^+$ ; 2: MX902 crecida en medio mínimo NN-glucosa y 12 mM de L-glutamato; 3: MX902/pPC36 crecida en medio mínimo NN-glucosa y 15mM  $\text{NH}_4^+$ ; 4: MX902/pPC36 crecida en medio mínimo NN-glucosa y 12 mM de L-glutamato.

## DISCUSION

En este trabajo se ha demostrado que la represión de la glutamato deshidrogenasa durante el crecimiento celular en glutamato ocurre a nivel de transcripción. Esto amplía los resultados reportados por Varicchio (1969) y Pateman (1969) dado que ellos en sus reportes no pudieron averiguar a qué nivel se llevaba a cabo la represión. Asimismo, se complementa la investigación de Riba *et al.* (1988) ya que ellos reportaron que la represión del gen *gdhA* era a nivel de transcripción pero sólo en condiciones de exceso y limitación amonio.

Por otro lado nuestros resultados sugieren que la proteína NAC es la represora del gen *gdhA* en *E.coli*. El sistema regulado por Nac ha sido recientemente descrito en *K.aerogenes* (Schwacha y Bender 1993 a, b). A pesar de que desde 1957, Neidhart y Magasanik observaron que la expresión de los genes de utilización de histidina (*hut*) de *K.aerogenes* estaba aumentada en condiciones de limitación de nitrógeno; en ese momento cierta evidencia llevó a la incorrecta conclusión de que la GS regulaba de manera directa la transcripción de los genes *hut* en *K.aerogenes* (Magasanik, et al., 1974; Tyler, 1979).

Posteriormente, con el descubrimiento de los genes *glnL* y *glnG* y el estudio de su papel regulatorio en la expresión de la GS tanto en *K.aerogenes*, *S. typhimurium* y *E.coli*, se llegó a la conclusión de que todos los genes y

operones del sistema Ntr se encontraban directamente regulados por los productos de los genes *glnG* y *glnL* (revisado por Magasanik, 1982).

Sin embargo, ciertas observaciones no eran explicadas por el modelo propuesto hasta esa fecha. Entre ellas, el hecho de que los genes *hut* de *S. typhimurium* no responden a N-Reg a pesar de que la bacteria cuenta con los genes *glnLG* funcionales (Magasanik, 1978; Kustu *et al.*, 1986). Adicionalmente, cuando los genes *hut* de *S. typhimurium* fueron introducidos a *K. aerogenes*, éstos responden a Ntr (Goldberg, 1976).

Estos datos claramente sugieren que los genes *hut* son controlados por una proteína diferente a NR<sub>I</sub> y NR<sub>II</sub> y que además, ésta, se encuentra ausente en *S. typhimurium*.

Dado que *E. coli* K12 no lleva los genes *hut*, los datos genéticos al respecto del control Ntr fueron menos claros. En 1976, Goldberg observó que al introducir los genes *hut* de *K. aerogenes* a *E. coli*, se observaba una regulación de la síntesis de *hut* en respuesta al estado de limitación de nitrógeno pero esta respuesta fue menos dramática que la regulación observada en *K. aerogenes*.

Finalmente, en 1983 fue aislada una cepa mutante de *K. aerogenes*, la cual era incapaz de activar la síntesis de los genes *hut* pero tenía intacta la regulación de GS (Bender *et al.*, 1983). Al gen responsable de este fenotipo se le denominó *nac* (nitrogen assimilation control).

Recientemente el gen *nac* fue clonado, secuenciado e inactivado, y se comprobó que su transcripción se encuentra bajo control de la RNA polimerasa asociada al factor sigma 54 y es activado por NR<sub>1</sub>-P. (Best y Bender, 1990; Schwacha y Bender 1993a). Asimismo, se determinó que en *K.aerogenes* la síntesis de la histidasa, prolina oxidasa, ureasa y la permeasa de triptofano son activadas por la proteína Nac, mientras que esta misma proteína reprime la actividad de GDH.

Dada la modesta regulación de los genes *hut* de *K.aerogenes* dentro de *E.coli*, y la ausencia de regulación en *S.typhimurium*, todos los estudios de *nac* y Ntr han sido llevados a cabo en *K. aerogenes*.

Para iniciar este trabajo, en un principio se consideró que, si las variaciones en la cantidad de GDH reportadas en los diferentes medios de cultivo obedecían a cambios en el nivel de transcripción del gen *gdhA*, necesariamente el estudio de los mecanismos moleculares que controlan esta represión nos llevarían a la identificación de una proteína represora.

Se eligió como primer paso el uso de ácido glutámico como fuente de nitrógeno dado que la mayor represión de la GDH se observa en estas condiciones y además porque existía la clara posibilidad de que el aumento en la poza intracelular de ácido glutámico directamente inhibiera la actividad de la enzima.

Los resultados en la Tabla 1 y la figura 1 demostraron que en la cepa silvestre la disminución de la actividad de la GDH durante el crecimiento en ácido glutámico se debe a la poca transcripción del gen *gdhA* en estas condiciones.

Estos resultados, aunados a los resultados de Riba *et al.* (1988) demuestran que la GDH sí es una enzima regulada en *E.coli*, y que esta regulación está controlada por la disponibilidad de nitrógeno en el medio de cultivo. Esto es, se observa una disminución de la transcripción del gen *gdhA* cuando la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo es limitante.

Con estos resultados se procedió a averiguar si cepas con mutaciones en el sistema Ntr provocaban la pérdida de la regulación de la GDH. Como se recordará de la sección de Resultados, al utilizar una cepa de *E.coli* cuya GDH estuviese desreprimida (MX902), la primera impresión de los datos fue que dadas las características de la cepa (tiene un transposón Tn5 insertado en el gen *glnG*, por lo tanto tiene un fenotipo Ntr<sup>-</sup>), posiblemente el represor del gen *gdhA* fuera NR<sub>1</sub>. Esto fue descartado dado que el análisis de la secuencia regulatoria del gen *gdhA* no reveló la presencia de un sitio de unión para NR<sub>1</sub>.

Los datos obtenidos sugerían que la relación entre NR<sub>1</sub> y la desrepresión de *gdhA* eran a través de una vía indirecta. Fue por esto que se decidió buscar una secuencia homóloga al gen *nac* de *K.aerogenes* en *E.coli*. Como se puede observar en la figura 3 de la sección anterior se obtuvo una banda de 8.5 kb en una digestión de DNA total de la cepa silvestre MX614

con EcoRI y otra banda de 5.2 kb en una digestión de DNA total de la misma cepa con *BamHI* homólogas al gen *nac* de *K.aerogenes*. Dada las condiciones de lavado que aseguraban hasta un 70% de homología entre las secuencias, es posible que efectivamente exista un gen tipo *nac* en *E.coli*. Este resultado sugiere por lo tanto, la existencia de una secuencia homóloga al gen *nac* de *K.aerogenes* en *E.coli*.

La existencia de una secuencia homóloga al gen *nac* de *K.aerogenes* nos planteó la pregunta de si existía un gen funcional tipo *nac* en *E.coli*. Los datos genéticos previamente reportados (Goldberg et al. 1976) así lo indicaban. Pero nuestra pregunta era más concreta, ¿la presencia de esta región homóloga afectaría la represión de la GDH?. La estrategia para responder esta pregunta fue la determinación de las actividades enzimáticas de la GDH en la cepa MX902 (con una GDH desreprimida), transformada por el plásmido pPC36 que contenía el gen *nac* de *K.aerogenes* bajo el control del promotor *tac*. Como se puede observar en la Tabla 3 de la sección anterior se obtuvo una represión de la glutamato deshidrogenasa en glutamato en la cepa MX902/pPC36 con IPTG, pero esta represión no llega a los niveles de la cepa silvestre MX614. Esto puede deberse a que la proteína Nac codificada por el gen *nac* de *K.aerogenes* no sea 100% homóloga a la de *E.coli* y por lo tanto el reconocimiento de la proteína a su sitio de unión no sea totalmente específico.

Como se mencionó anteriormente al analizar la secuencia regulatoria del gen *gdhA* de *E.coli*, no se encontraron sitios de unión para NR<sub>1</sub> o para la RNA polimerasa dependiente de  $\sigma^{54}$  (figura 3).

En el reporte de Riba *et al.* (1988) se observa en la región reguladora del gen *gdhA* el promotor P<sub>3</sub>, que aparentemente es el único promotor funcional del gen *gdhA* ubicado entre las posiciones -39 a la región -9, donde se encuentran las regiones -10 y -35 correspondientes al sitio de unión de la RNA polimerasa dependiente de  $\sigma^{70}$ . Sobrelapando esta región P<sub>3</sub> se encuentra un sitio de unión para cAMP-CAP y en la región 48 a 53 está la secuencia Shine-Dalgarno de unión de ribosomas.

De acuerdo con un reporte de Goss y Bender (1995), la secuencia consenso encontrada para la unión de Nac en *K.aerogenes* es 5'-ATA-N<sub>9</sub>-TAT-3', misma que encontraron cerca de los promotores de *hut*, *put* y *ure*. En el caso de *hut* este sitio está sobrelapando parcialmente el sitio de unión de cAMP-CAP lo cual plantea que estos dos factores (Nac y cAMP-CAP) tal vez actúan sinérgicamente para activar la transcripción de *hut* bajo ciertas condiciones.

En el caso del gen *gdhA* de *E.coli*, al analizar la secuencia regulatoria del gen se encontró una secuencia similar a la consenso reportada por Goss y Bender (1995). Esta secuencia (5'-ATT-N<sub>8</sub>-TAT-3'), se sobrelapa con el sitio de unión para cAMP-CAP y también con el promotor funcional P<sub>3</sub>. De la misma manera esta secuencia es similar a la secuencia 5'-T-N<sub>11</sub>-A-3' característica para la unión de las proteínas de la familia Lys-R de unión al DNA que es a la que pertenece la proteína Nac.

Así mismo, cubriendo la región Shine-Dalgarno se encontró la secuencia 5'-ATA-N<sub>9</sub>-TAT-3' que es 100% homóloga a la secuencia consenso de unión de la proteína Nac de *K.aerogenes*.

Dado que en este trabajo se utilizó la proteína Nac de *K.aerogenes*, a lo mejor ésta reconoció la región 5'ATA-N<sub>9</sub>-TAT-3' ubicada sobre la secuencia Shine-Dalgarno con mayor especificidad que la ubicada en el promotor, bloqueando de todos modos la acción de la RNA polimerasa pero con menor eficiencia, y esta puede ser una explicación por la cual los niveles de actividad de la cepa transformada con el plásmido pPC36 no llegaron a los niveles basales de la cepa silvestre.

El haber encontrado teóricamente las secuencias de unión para Nac permite plantear un modelo (figura 7) en el cual, en condiciones limitantes de nitrógeno (ácido glutámico), la proteína Nac se una a la secuencia ubicada en el promotor y de este modo bloquea la unión de la RNA polimerasa al promotor reprimiendo de esta manera la transcripción del gen *gdhA*.

Cabe destacar un dato curioso. Como se puede observar en la tabla 3, en la condición de exceso de amonio se obtiene una actividad equiparable a la que se observa en la cepa silvestre MX614. Si el gen *nac* está bajo el control de IPTG ¿cómo es posible que en exceso de amonio estuviese desreprimida la GDH si la expresión del gen *nac* no depende en este caso de la fuente de nitrógeno? Esto nos lleva a sugerir que tal vez exista un mecanismo adicional para la regulación de *gdhA* independiente de Nac para el caso de exceso de

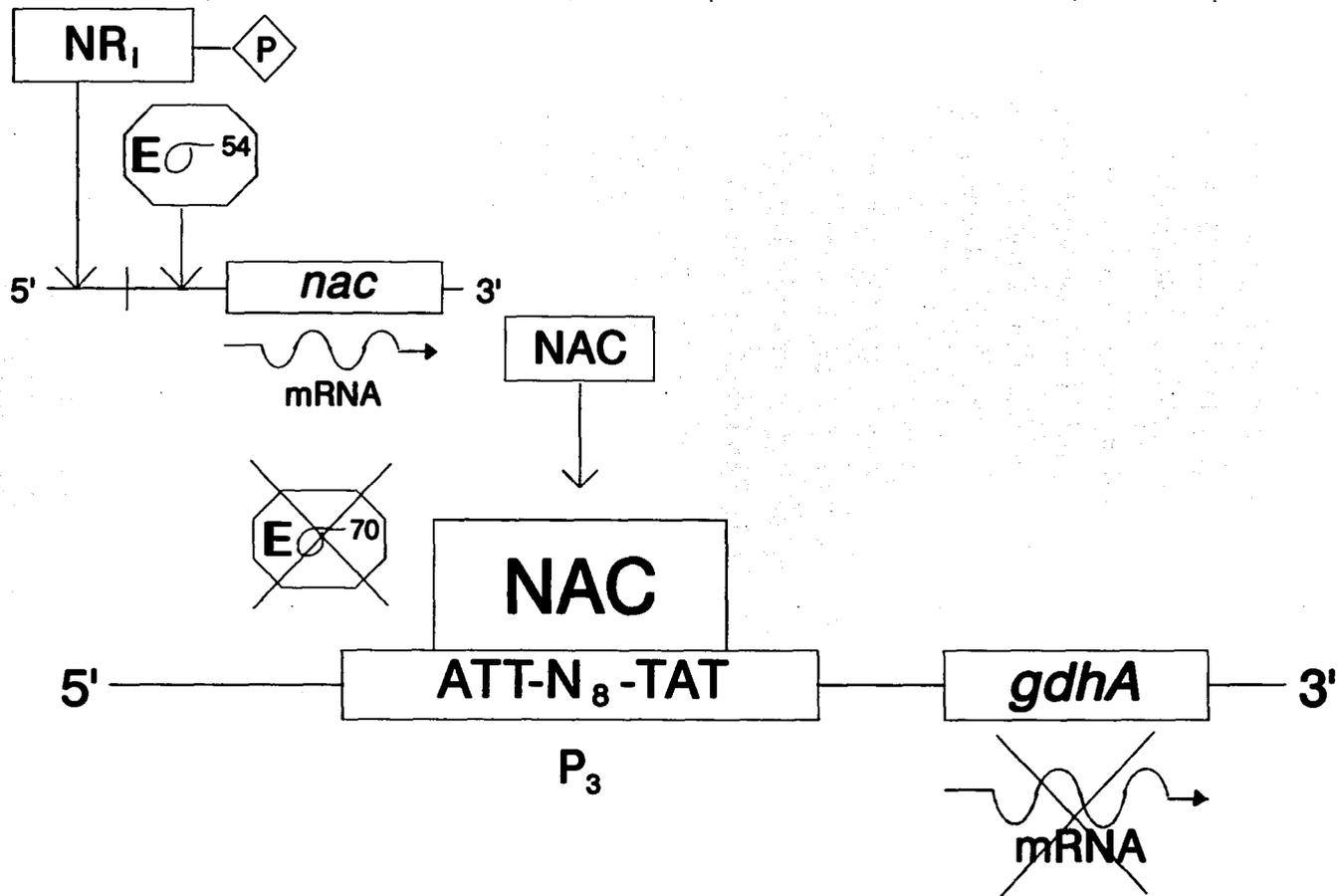


Figura 7. Modelo teórico de Nac como represor del gen *gdhA* de *E. coli* en glutamato.

amonio; otra opción sería que Nac necesite estar modificado (por ejemplo fosforilado) en ciertas condiciones de nitrógeno, como en el caso de glutamato, y que por ello sea independiente en el caso de amonio alto. Así mismo, la diferencia entre la actividad específica de GDH en la cepa transformada y el nivel de mensajero se deba a que la estabilidad de la enzima o del RNA mensajero sea diferente dependiendo de la fuente de nitrógeno en la que sea medida.

Estos resultados contrastan con los obtenidos en *K.aerogenes*, donde la proteína Nac es suficiente para la activación de *hut* y *put* y para la represión de *gdh*. Cuando se insertó un promotor *tac* inducible con IPTG entre el promotor de *nac* y su secuencia codificadora, los operones dependientes de Nac (*hut*, *put* y *gdh*) eran controlados por IPTG y no por la limitación de nitrógeno, de la misma manera ocurría en el caso en el que las células eran crecidas en amonio alto (Schwacha y Bender, 1993). De esta manera se comprobó que el gen *nac* bajo el control de IPTG activaba *hut* y *put* independientemente de su estado metabólico con respecto a nitrógeno, y también en estas condiciones la proteína Nac era formada en cepas Ntr<sup>-</sup>.

Los resultados no excluyen la posibilidad de que Nac a su vez sea un activador para el represor de GDH. Sin embargo, las evidencias obtenidas en *K.aerogenes* y en este trabajo apoyan el modelo en el cual la proteína Nac es directamente la molécula represora de la transcripción.

Los resultados obtenidos en este trabajo además de responder algunas de nuestras preguntas, abre nuevas interrogantes con respecto al papel de Nac. Por un lado, nos cuestionamos con respecto al nivel de transcripción del gen *nac* en las condiciones de exceso de amonio y glutamato. Nuestra hipótesis es que dado que Nac es un controlador negativo de la transcripción de *gdhA*, su presencia en condiciones de exceso de amonio debería ser escasa, mientras que en condiciones de L-glutamato, donde es precisamente donde está actuando debería estar expresando de manera activa para producir suficiente represor de GDH. Por otro lado nos preguntamos ¿cómo será el nivel de actividad específica de la GDH en una cepa *glnF*? Como se recordará *glnF* es el gen que codifica para el factor sigma 54, por lo tanto si nuestra hipótesis es correcta, en una cepa deficiente de este gen, la GDH debería estar desreprimida porque el factor sigma 54 es necesario para la transcripción del gen *nac*, esto último sería difícil de cuantificar, dado que la ausencia de un factor tan importante en condiciones fisiológicas podría afectar otros genes dependientes del mismo factor sigma. Otras preguntas serían ¿qué pasa en el caso de limitación de amonio?, ¿será Nac también el represor? ¿Cómo es la interacción de Nac con el DNA para ser un activador y un represor de la transcripción? ¿Nac requiere modificación post-transcripcional alguna? ¿Cuántos genes y operones antes clasificados como Ntr o NR<sub>1</sub>-dependientes son controlados de manera directa por Nac?

Otro enfoque sería la localización, clonación, secuenciación y caracterización del gen *nac* y su proteína en *E.coli*, dado que esto confirmaría aun más su existencia y reforzaría los datos obtenidos en este trabajo. Además

sería una ventaja hacer los experimentos directamente con la proteína propia de *E. coli*, ya que se confirmaría exactamente su sitio de unión al DNA y los efectos de esta interacción y permitiría además averiguar en que otros genes tiene efecto.

Por último, en este caso estamos observando el efecto de Nac como controlador negativo de *gdhA*, pero, ¿actuará también como controlador positivo?. Una forma de abordar esta pregunta sería analizando el caso del operón de utilización de prolina (*put*) como se discutió anteriormente, *put* es controlado positivamente en el caso de *K.aerogenes*, por lo tanto sería interesante observar si existe este mismo efecto en *E.coli*, o si tendrá otro efecto. Tal vez no sería similar dado que en *K.aerogenes* la represión de Nac sobre GDH es en condiciones de exceso y limitación de amonio, mientras que en el caso de *E.coli* no se observa una clara influencia de NAC en condiciones de limitación de amonio, pero sí existe un efecto cuando las células son crecidas en L-glutamato como fuente de nitrógeno.

## CONCLUSIONES

Las conclusiones derivadas de este trabajo son:

- 1.- La GDH es regulada por la disponibilidad de nitrógeno en el medio en condiciones de exceso de amonio y glutamato.
- 2.- La glutamato deshidrogenasa es reprimida a nivel de transcripción cuando las células utilizan glutamato como fuente de nitrógeno.
- 3.- Los datos genéticos previamente reportados y los resultados de este trabajo sugieren la presencia de un gen homólogo al *nac* de *K. aerogenes* en *E.coli*.
- 4.- Se encontró analizando teóricamente la secuencia regulatoria del gen *gdhA* de *E.coli* una secuencia 5'-ATT-N8-TAT-3' en el promotor del gen, similar a la secuencia consenso 5'-ATA-N9-TAT-3' encontrada en *K. aerogenes* como sitio de unión de la proteína Nac.
- 5.- La proteína causante de la represión de GDH en glutamato posiblemente es Nac regulada a su vez por NR<sub>1</sub>, producto de *glnG*.

## BIBLIOGRAFIA

Adler, S.P., Purich, D., Stadtman, E.R. (1975). "Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase: properties of the P<sub>II</sub> regulatory protein and the uridylyltransferase-uridylyl-removing enzyme". J.Biol. Chem. **250**:6264-6272.

Aiba, H., Adhya, S., De Crombrughe, B. (1981). "Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells". J. Biol.Chem. **256**: 11905-11910.

Ausubel, F.M. (1984) "Regulation of nitrogen fixation genes". Cell **37**:5-6.

Bender, R.A. (1991). "The role of the NAC protein in the nitrogen regulation of *Klebsiella aerogenes*". Molecular Microbiology **5**(11): 2575-2580.

Bender, R., Macalluso, A., Magasanik, B. (1976). "Glutamate dehydrogenase: genetic mapping and Isolation of regulatory mutants of *Klebsiella aerogenes*". J. Bacteriol. **127**:141-148.

Bender, R.A., Snyder, P.M., Bueno, R., Quinto, M. and Magasanik, B. (1983). "Nitrogen Regulation system of *Klebsiella aerogenes*: the *nac* gene". J. Bacteriol. **156**: 444-446.

Best, E., Bender, R.A. (1990) "Cloning of the *Klebsiella aerogenes nac* gene, which encodes a factor required for Nitrogen Regulation of the Histidine Utilization (*hut*) Operons in *Salmonella typhimurium*". J. Bacteriol. **172**: 7043-7048.

Birnboim, H.C. (1983). "A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA". Methods Enzymol. **100**:243-255.

Bloom, F.R., Streicher, S.L., Tyler, B. (1977) "Regulation of enzyme synthesis by the glutamine synthetase of *Salmonella typhimurium*: a factor in addition to glutamine synthetase is required for activation of enzyme formation". *J. Bacteriol.* **130**:983-990.

Brenchley, J.E., Baker, C.A., Patil, L.G. (1975). "Regulation of the ammonia assimilatory enzymes in *Salmonella typhimurium*". *J. Bacteriol.* **124**:182-189.

Bueno, R., Pahel, G., and Magasanik, B. (1985). "Role of *glnB* and *glnD* gene products in regulation of the *glnALG* operon of *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* **164**:816-822.

Castañó, I., Bastarrachea, F., Covarrubias, A. (1988). "*gltBDF* Operon of *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* **170**: 821-827.

Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Hsu, L. (1972). "Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor". *Proc Natl Acad Sci Usa* **69**:2110-2114.

García, E., Rhee, S.G. (1983) "Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase: purification and properties of P<sub>II</sub> uridylyltransferase and uridylyl-removing enzyme". *J. Biol. Chem.* **258**: 2246-2253.

Goss, T., Bender, R.A. (1995) "The nitrogen assimilation control protein, NAC, is a DNA binding transcription activator in *Klebsiella aerogenes*". *J. Bacteriol.* **177**:3546-3555.

Goldberg, R.B., Bloom, F.R., Magasanik, B. (1976) "Regulation of histidase synthesis in intergenic hybrids of enteric bacteria". *J. Bacteriol.* **127**:114-119.

Hirschman, J., Wong, P.K., Sei, K., Keener, J. and Kustu, S. (1985) "Products of nitrogen regulatory genes *ntxA* and *ntxC* of enteric bacteria activate *glnA* transcription in vitro:

evidence that the *nitA* product is a sigma factor". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**:7525-7529.

Holmes, D.S., Quingley, M. (1981) "A rapid bioling method for the preparation of bacterial plasmids" Anal. Biochem. **114**:193-197.

Hunt, T.P. and Magasanik, B. (1985) "Transcription of *glnA* by purified *Escherichia coli* components: core RNA polymerase and the products of *glnF*, *glnG* and *glnL*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**:8453-8457.

Kustu, S., Sei, K., Keener, J. (1986) "Nitrogen regulation in enteric bacteria". En: I.R. Booth and C.R. Higgins (edits), Regulation of gene expresión. Symposium of the Society for General Microbiology. Cambridge University Press, Cambridge. pags 139-154.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A. L. Farr, and R.J. Randall. (1951). "Protein measurment with the Folin phenol reagent". J.Biol.Chem. **193**: 265-270.

Macaluso, A., Best, E., Bender, R. (1990). "Role of the *nac* gene product in the nitrogen regulation of some NTR-regulated operons of *Klebsiella aerogenes*". J. Bacteriol. **172**:7249-7255.

Magasanik, B., Prival, M.J., Brenchley, J.E., Tyler, B.M., DeLeo, A.B., Streicher, S.L., Bender, R.A., Paris, C.G. (1974). "Glutamine synthetase as a regulator of enzyme synthesis". Curr. Top. Cell. Regul. **8**:119-138.

Magasanik, B. (1982). "Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria". Annu. Rev. Genet. **16**:135-168.

Magasanik, B. (1978). En The Operon. Miller, J.H., and Reznikoff, W.S. (edits). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. págs 373-387.

Magasanik, B. and Neidhart, F.C. (1987). "Regulation of Carbon and Nitrogen Utilization". en *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology. Vol. 2: 1318-1325.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982) "Molecular Cloning; A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory.

Meers, J.L., Tempest, D.W. and Brown, C.M.. (1970). "Glutamine(amide): 2-oxoglutarate aminotransferase oxidoreductase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria". J.Gen. Microbiol. 64: 187-194.

Neidhart, F.C. (1987). "Ammonia Assimilation and the Biosynthesis of Glutamine, Glutamate, Aspartate, Asparagine, L-Alanine, and D-Alanine". en: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology. Vol.1:302-317.

Ninfa, A.J., and Magasanik, B. (1986). "Covalent modification of the *glnG* product, NR<sub>I</sub>, by the *glnL* product, NR<sub>II</sub>, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5909-5913.

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.,

Pateman, J.A. (1969) "Regulation of Synthesis of Glutamate Dehydrogenase and Glutamine Synthetase in Micro-organisms". Biochem. J. 115:769-775.

Popham, D.L., Szeto, D., Keener, J., Kustu, S. (1989) Function of a bacterial activator protein that binds to transcription enhancers". Science 243:629-635.

Reitzer, L.J., and Magasanik, B. (1983). "Isolation of the nitrogen assimilation regulator NR<sub>1</sub>, the product of the *glnG* gene of *Escherichia coli*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**:5554-5558.

Reitzer, L.J., and Magasanik, B. (1985). "Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**:1979-1983.

Reitzer, L.J., and Magasanik, B. (1987) "Ammonia Assimilation and the Biosynthesis of Glutamine, Glutamate, Aspartate, Asparagine, L-Alanine and D-Alanine". en: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology. Vol.1:302-317.

Riba, L., B. Becerril, L. Servín-González, F. Valle and F. Bolívar. (1988). "Identification of a functional promoter for the *Escherichia coli* *gdhA* gene and its regulation". Gene **71**: 233-246.

Rosenfeld, S.A., Dendinger, S.M., Murphy, C.H., Brenchley, J.E. (1982). "Genetic characterization of the glutamate dehydrogenase gene (*gdhA*) of *Salmonella typhimurium*". J. Bacteriol. **150**:795-803.

Sakamoto, N., Kotre, A.M., Savageau, M.A. (1975). "Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties". J. Bacteriol. **124**:775-783.

Schwacha, A., Bender, R. (1993). "The *nac* (Nitrogen Assimilation Control) gene from *Klebsiella aerogenes*". J. Bacteriol. **175**:2107-2115.

Schwacha, A., Bender, R. (1993). "The product of the *Klebsiella aerogenes* *nac* (Nitrogen Assimilation Control) gene is sufficient for activation of the *hut* operons and repression of the *gdh* operon". J. Bacteriol. **175**:2116-2124.

Southern, E. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis". *J.Mol.Biol.* **98**:503.

Stadtman, E.R., Ginsburg, A. (1974) "The glutamine synthetase of *Escherichia coli*: structure and control. En: Boyer, P.D. (edit). *The enzyme*, vol. 10. Academic Press, New York. pags 755-807.

Stock, J.B., Ninfa, A., Stock, A. (1989). "Protein Phosphorylation and Regulation of Adaptive Responses in Bacteria". *Microbiological Reviews.* **53**(4): 450-490.

Thomas, P.S. (1980). "Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose". *Biochemistry* **77**: 5201-5205.

Tsang, S.S., Yin, X., Guzzo-Arkuran, C., Jones, V.S., Davison, A.J. (1993). "Loss of Resolution in Gel Electrophoresis of RNA: A problem associated with the presence of formaldehyde gradients". *Biotechniques* **14**(3): 380-381.

Tyler, B., DeLeo, A.B., Magasanik, B. (1974). "Activation of transcription of *hut* DNA by glutamine synthetase" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**:225-229.

Ueno-Nishio, S., Mango, S., Reitzer, L.J., Magasanik, B. (1984). "Identification and regulation of the *glnL* operator-promoter of the complex *glnALG* operon of *Escherichia coli*". *J.Bacteriol.* **160**:379-384.

Valle, F., Becerril, B., Chen E., Seeburg, P., Hynesker, H., Bolivar, F. (1984). "Complete nucleotide sequence of the glutamate dehydrogenase gene from *Escherichia coli* K-12". *Gene*, **27**:193-199.

Varrichio, F. (1969). "Control of glutamate dehydrogenase synthesis in *Escherichia coli*". *Biochem. Biophys. Acta* **177**:560-564.

Veronese, F.M., Boccu, E., Conventi, L. (1975). Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: induction, purification and properties of the enzyme". *Biochim. Biophys. Acta* 377:217-228.

Vogelstein, B., Gillespie, D. (1979). "Preparative and analytical purification of DNA from agarose". *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 76:615-619.

Wohlheuter, R.M., Shutt, H., Holzer, H. (1973) "Regulation of glutamine synthesis *in vivo* in *E.coli*". En: Prusiner, S., Stadtman, E.R. (edits) *The enzymes of glutamine metabolism*. Academic Press, New York. pags. 45-64.

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

ESTA TESIS NO DEBE  
VALER DE LA BIBLIOTECA