

03062  
12  
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION  
DE NITROGENO

CARACTERIZACION MOLECULAR DE LAS ADENIL  
CICLASAS DE *Rhizobium etli*

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN INVESTIGACION  
BIOMEDICA BASICA  
P R E S E N T A :  
JUAN MAURICIO TELLEZ SOSA

CUERNAVACA, MOR.

1997

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Este trabajo fue desarrollado bajo la asesoría del Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos en el Departamento de Ecología Molecular del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México**

**Durante el desarrollo de este trabajo conté con una beca para estudios de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**

**Dedico este trabajo  
A mi compañera y cómplice, Brenda  
A mis hermanos Francisco, Javier, Héctor,  
Maribel y Manuel y a mis jefes Socorro y  
Trinidad.**

## **AGRADECIMIENTOS**

De nueva cuenta, el presente trabajo se une al esfuerzo de cientos de personas que siguen obstinados en hacer ciencia en México.

Agradezco a los Dres. Esperanza Martínez-Romero, Jesús Aguirre Linares, Roberto Corta Ortega y José Luis Puente García sus comentarios al manuscrito de esta tesis. A los Dres. David Romero y Enrique Morett su asesoría en el proyecto de investigación. Al Dr. Jaime Mora su apoyo económico para terminar el proyecto.

Agradezco al Dr. Miguel Angel Cevallos su confianza y su casi infinita paciencia.

Este trabajo sólo pudo ser posible gracias a la colaboración de todos y cada uno de los miembros del departamento de Ecología Molecular, a todos ellos gracias. En especial quiero agradecer a Sergio, Carmen, Mery, Araceli, Adriana, Sandra, Gaby, Mario, Sara, Ramón, Jesús, Svetla, Alberto, Victor, Humberto, Nora, Javier, Angeles, Gisela y Pedro, la convivencia, los consejos, en fin, los buenos tiempos. A mis nuevos compañeros del departamento de Genética Molecular José, Miguel Angel, Paty, Hilda, Gama e Ismael.

Obviamente la diversión es parte integral de nuestro desarrollo y por lo mismo hay que recordar a los cuates que logran que valga la pena estar aquí: Ricardo, Humberto, Ernesto, Agustino, Javier, Sergio, Josué, Ramón, Mario, Aristides, Rivelino, Rodrigo y Filiberto; y a los cuates que logran que vaya al DF: Itzia, Javier, Nacho, Vicente, Tere, Carolina, Elsa, Virginia, Lalito, Gumersindo, Juan Carlos, etc.

Sobre todo, a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno por apoyar mi desarrollo.

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
Las Adenil Ciclasas y el AMPc	2
Las Adenil Ciclasas Enterobacterianas	3
Las Adenil Ciclasas Tóxicas	3
Las Adenil Ciclasas Universales	4
Evolución de las Adenil Ciclasas	4
<b>El AMPc en Bacterias Entéricas</b>	8
La Red de Regulación Global AMPc-CRP	8
El Complejo AMPc-CRP	9
La Regulación Transcripcional mediada por el complejo AMPc-CRP	12
Las Funciones Reguladas por el AMPc en Bacterias Entéricas	19
<b>El AMPc en Bacterias no Entéricas</b>	19
<b>ANTECEDENTES</b>	
La Fijación Biológica del Nitrógeno	19
La Represión Catabólica en <i>Rhizobium</i>	19
El AMPc en <i>Rhizobium</i>	20
Las Adenil Ciclasas de <i>Rhizobium</i>	21
El CRP en <i>Rhizobium</i>	21
El AMPc en <i>Rhizobium etli</i>	22
<b>OBJETIVO</b>	23
<b>MÉTODOS</b>	
Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo	24
Conjugación Bacteriana	25
Preparación y transformación de células competentes	25
Purificación de ADN genómico y plásmido	25
Experimentos de subclonación	26
Ensayos de hibridación	27
Dinámicas de crecimiento	28
Determinación de proteínas	28
Cuantificación de los niveles de AMPc	28
Secuenciación y análisis del ADN	29
<b>RESULTADOS</b>	
Aislamiento e identificación de fragmentos de ADN de <i>R. etli</i>	30
que complementan una cepa mutante <i>cya<sup>-</sup></i> de <i>E. coli</i>	
Caracterización de las cepas complementadas	30
Crecimiento en distintas fuentes de carbono	30
Fermentación de azúcares en placas de agar MacConkey	31
Sensibilidad a la Fosfomicina	31
Sensibilidad a la Serina	31
Motilidad	31
Análisis de los cósmidos complementantes	32
Delimitación de los fragmentos responsables de complementar a la cepa	33
<i>cya<sup>-</sup></i> a partir de los cósmidos pTS933, pTS934, pTS1179 y pTS1190	
Obtención del plásmido p33.10	33
Obtención del plásmido pE2	34
Obtención del plásmido p193	34
Obtención del plásmido pSX3.7	34
Análisis de los plásmidos pE2, p33.10 y pSX3.7	35
Caracterización de las cepas complementadas con los plásmidos pE2	35
p33.10 y pSX3.7	
Complementación de una mutante <i>crp<sup>-</sup></i> de <i>E. coli</i>	38
Cuantificación de los niveles de AMPc en las cepas complementadas	38
Secuencia nucleotídica del fragmento E2 y secuencia proteica deducida	38
Secuencia nucleotídica del fragmento 33.10	40
Generación de una mutante <i>cya<sup>-</sup></i> de <i>R. etli</i>	40
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	43
<b>PERSPECTIVAS</b>	49
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	50
<b>APÉNDICES</b>	57

## **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS ADENIL CICLASAS DE *Rhizobium etli***

### **RESUMEN**

Las bacterias de la familia *Rhizobiaceae* son capaces de reducir el nitrógeno atmosférico durante una relación simbiótica con plantas leguminosas. En esta compleja interacción, el patrón de la expresión génica en ambos organismos sufre cambios drásticos. La naturaleza de las señales involucradas con este proceso diferencial de la expresión génica no han sido aclaradas. En otras bacterias Gram negativas como *E. coli*, el AMPc y su proteína receptora (CRP), forman parte de un sistema multigénico de regulación, el cual tiene por función regular la transcripción de un amplio número de operones involucrados con numerosas funciones celulares, como la regulación de la represión catabólica. En algunas especies de *Rhizobium*, el AMPc se ha implicado en el control de funciones celulares tales como: represión catabólica, regulación de la asimilación de amonio durante la simbiosis, regulación del metabolismo de hidrógeno, etc. Sin embargo, la carencia de cepas de *Rhizobium* deficientes en la síntesis de AMPc ha impedido discernir en forma precisa el papel del nucleótido en estas bacterias. La adenil ciclasa, producto del gen *cya* es la enzima encargada de sintetizar el AMPc. En el presente trabajo presentamos la clonación de tres distintos genes *cya* de *R. etli* por medio de la complementación de una cepa mutante de *E. coli cya<sup>-</sup>* con ADN procedente de un banco genómico de la cepa CE3. Inicialmente se aislaron cuatro cósmidos que permiten el crecimiento de la mutante en lactosa. No obstante que los cuatro cósmidos (pTS934, pTS933, pTS1179 y pTS1190) presentaron patrones de restricción distintos, experimentos de hibridación permitieron determinar que los cósmidos pTS933 y pTS1190 están sobrelapados, ya que comparten al menos dos fragmentos *EcoRI* de 2 y 1.2 kb. A partir de estos cósmidos se delimitaron las clonas pE2, p33.10 y pSX3.7, que contienen fragmentos *EcoRI* de 2, *SalI* de 2.8 y *SmaI/XhoI* de 3.7 kb, respectivamente. Estas clonas le confieren a la mutante la capacidad de crecer en lactosa, ser móviles y recuperar la sensibilidad a fosomicina y serina. Las cepas complementadas fueron capaces de sintetizar y acumular AMPc. La secuencia de la clona pE2 permitió identificar un marco de lectura abierto que codifica una proteína de 364 residuos de aminoácidos que tiene una similitud del 74% y una identidad del 54% con el gen *cya2* de *R. meliloti*, además de presentar firmas descritas en otras adenil ciclasas. La inserción de un cassette *Km-lacZ* en la clona pE2, permitió la generación de una mutante *cya<sup>-</sup>* de *R. etli*. Esta mutante no presentó diferencias con la cepa silvestre en los fenotipos analizados. Estos resultados indican que la adenil ciclasa codificada en la clona pE2 no es esencial para el crecimiento de *R. etli* en vida libre.

## INTRODUCCIÓN

### LAS ADENIL CICLASAS y EL AMPc

Las adenil ciclasas son las enzimas que sintetizan el AMPc (adenosín 3',5'-monofosfato cíclico). El AMPc es una molécula que tiene un papel universal en la regulación de importantes procesos biológicos. Se le ha descrito tanto en procariontes como en eucariontes, y sólo en plantas y arqueobacterias su existencia permanece en discusión. En bacterias, el AMPc participa en la regulación de diversos procesos celulares vía CRP (proteína receptora del AMPc). En eucariontes, el AMPc funciona como un segundo mensajero que media la respuesta celular a estímulos ambientales como las hormonas. Distintos receptores de hormonas se encuentran acoplados a las adenil ciclasas a través de proteínas G. Las adenil ciclasas incrementan los niveles intracelulares de AMPc luego de ser activadas por las proteínas G. El AMPc activa a proteincinasas generalmente constituidas por tetrámeros de dos subunidades regulatorias, capaces de unir AMPc, y de dos subunidades catalíticas. La unión del AMPc a las subunidades reguladoras induce la disociación de la holoenzima, y libera las subunidades catalíticas activas, las cuales, vía fosforilación de proteínas específicas, actúan como efectores de actividades enzimáticas y en la expresión de genes.

La importancia del AMPc y su amplia distribución dentro de la escala evolutiva ha centrado el interés de muchos investigadores al estudio de las adenil ciclasas (AC). La AC sintetiza el AMPc en una reacción que utiliza ATP como sustrato. Esta reacción introduce un enlace fosfodiéster entre los extremos 3' y 5' del azúcar del nucleótido. La degradación del AMPc corre a cargo de una enzima fosfodiesterasa de AMPc, que rompe el enlace fosfodiéster para producir adenosina 5'-monofosfato (AMP). En la célula los niveles del AMPc están regulados por la actividad de ambas enzimas y por su excreción al medio. En *Escherichia coli*, la síntesis, aún más que la degradación, es el factor determinante en la concentración intracelular del AMPc (Magasanik y Neidhardt, 1987).

Son escasos los reportes que describen aspectos estructurales de las AC, principalmente porque se sintetizan a muy baja concentración y son muy inestables durante su purificación. Sin embargo, ha sido posible clonar y secuenciar el gene *cya* que codifica para la AC en distintos organismos, desde bacterias hasta vertebrados superiores. A partir de la secuencia proteica deducida se han logrado identificar características importantes de esta familia de proteínas. Danchin (1993 A) clasifica las distintas AC descritas en tres clases de acuerdo a características comunes presentes en la secuencia proteica: la clase I la forman enzimas relacionadas con las AC enterobacterianas, la clase II la componen las AC tóxicas aisladas de bacterias patógenas; y la clase III se encuentra constituida por ciclasas de eucariontes y de algunos procariontes.



### **Clase I. Las AC enterobacterianas**

Las enzimas de la clase I son proteínas presentes en bacterias Gram negativas, como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Erwinia chrysanthemi*, *Yersinia intermedia*, *Yersinia pestis*, *Pasteurella multocida*, *Aeromonas hydrophila* y *Haemophilus influenzae* (Tabla 1). Estas proteínas están representadas típicamente por la AC de *E. coli*, la cual consta de 848 residuos de aminoácidos, tiene un punto isoeléctrico de 6.1, y es rica en residuos de cisteína e histidina. Estas proteínas presentan dos dominios funcionales, el dominio catalítico ubicado en el extremo amino terminal, y el dominio regulatorio ubicado en el extremo carboxilo terminal, el cual se regula por la proteína membranal III<sub>C</sub><sup>c</sup>, componente del sistema de la fosfotransferasa de azúcares (PTS). El análisis de predicción de estructuras secundarias muestra que los primeros 395 residuos de aminoácidos, que corresponden al dominio catalítico, presentan un 42 % de  $\alpha$ -hélices, mientras que el resto de la molécula sólo presenta un 19 % de  $\alpha$ -hélices. El perfil de hidropatía no revela características típicas de proteínas de membrana (Danchin, 1993 A).

Por otra parte, mientras que los genes enterobacterianos conservan características idénticas a las descritas para el gen de *E. coli*, como lo son: un atípico codón de inicio (TTG), dos promotores en la región reguladora, un motivo conservado de 18 nucleótidos que sobrelapa con el sitio de unión a ribosoma y que podría estar involucrado en algún proceso de control traduccional, así como los genes corriente arriba y abajo (*hemC* y *cyaY*, respectivamente). Los genes de *P. multocida*, *A. hydrophila* y *H. influenzae*, presentan diferencias en lo referente al entorno genético y carecen del motivo de 18 nucleótidos. Estos datos indican que la regulación de la actividad enzimática de esta clase de enzimas está conservada en las bacterias entéricas, mientras que la expresión de los genes *cya* podría ser diferente en las distintas bacterias (Danchin, 1993 A).

### **Clase II. Las AC toxinas**

La clase II la componen las AC de las bacterias patógenas *Bordetella pertussis*, *B. bronchiseptica* y *Bacillus anthracis* (Tabla 1). En estos organismos la AC son toxinas que contienen un dominio catalítico activable por calmodulina (CaM), proteína presente sólo en eucariotes (Lepla, 1982; Goldhammer y Wolff, 1982). Estas bacterias excretan la toxina que posteriormente se introduce en el hospedero eucariote. Una vez dentro, el dominio catalítico de la AC se activa por CaM y aumenta los niveles de AMPc, lo cual desajusta distintos procesos celulares (Hanski y Forfel, 1985; Weis y Hewlett, 1986).

El gen *cyaA* de *B. pertussis* codifica una proteína de 1706 residuos de aminoácidos con un peso aproximado de 200 kD. Los primeros 400 residuos de aminoácidos del amino terminal contienen la actividad de ciclasa dependiente de CaM, mientras que el resto de la molécula contiene el dominio responsable de la actividad hemolítica de la toxina, razón por la cual a esta proteína se la ha dado el nombre de ciclolisina (AC-Hly) (Glaser *et al.*, 1988). Se desconoce el mecanismo

mediante el cual la AC-Hly se introduce en el hospedero, sin embargo, se cree que existe algún receptor en la membrana de la célula eucarionte que permite el transporte de la toxina. El gen *cyaA* de *B. bronchiseptica* codifica una proteína de 1705 residuos de aminoácidos que tiene un 98 % de identidad con la AC-Hly de *B. pertussis*. Ambas adenil ciclasas conservan dominios idénticos para la actividad AC, unión a CaM, y unión a  $Ca^{2+}$  (Betsou et al., 1995).

El gen *cya* de *B. anthracis*, que codifica la toxina conocida como factor de edema (EF), se encuentra en un plásmido junto con los genes que codifican para la toxina llamada factor letal (LF) y la proteína acarreadora "antígeno protector" (PA). PA es una proteína extracelular de 83 kD que se requiere para la internalización de EF y LF en la célula hospedera, se piensa que PA se une a receptor de membrana en la superficie de la célula eucarionte y que posteriormente contacta a LF o EF formando un complejo que es internalizado por endocitosis. La AC de *B. anthracis* es una proteína de 800 residuos de aminoácidos con un punto isoeléctrico de 5.9 y un peso aproximado de 89 kD que muestra tres segmentos definidos. El primero, iniciando por la región amino terminal, es un péptido señal, que permite la excreción de la proteína; el segundo corresponde al dominio de unión a PA, y en el tercero, ubicado al centro del péptido, se encuentra el dominio responsable de la actividad de AC, finalmente, en el extremo carboxilo terminal se encuentra una región de función desconocida (Tippett y Robertson, 1988; Danchin, 1993 A).

#### **Clase III. Las Ciclasas Universales**

La clase III, también conocida como la clase "Universal", está constituida por adenil y guanil ciclasas de procariontes y eucariontes. Desde un punto de vista estructural se han descrito dos grupos principales de guanil ciclasas (GC). El primer grupo lo constituyen proteínas multiméricas transmembranales que presentan tres dominios: un dominio con actividad de cinasa, un dominio catalítico y un dominio receptor de péptidos natriuréticos (péptidos de tamaño variable, entre 28 y 152 residuos de aminoácidos, que funcionan como hormonas en organismos superiores y cuyo papel se vincula a la regulación de fluidos corporales). El segundo grupo lo forman enzimas heterodiméricas citoplasmáticas que contienen dos subunidades de 78 y 82 kD, cada una posee un dominio catalítico carboxilo terminal y un grupo prostético hemo. En el caso de las AC se han descrito dos grupos principales, clasificados en base a su composición estructural. El primer grupo lo forman proteínas que presentan duplicaciones del dominio catalítico en el mismo péptido acoplado a varios segmentos transmembranales, tal es el caso de algunas ciclasas de mamíferos; el segundo grupo lo constituyen proteínas que presentan un único dominio catalítico en el extremo carboxilo terminal fusionado a una variedad de diferentes dominios como es el caso de la enzima de *Saccharomyces cerevisiae* (Danchin 1993 A; Barzu y Danchin, 1994).

En el caso de las adenil ciclasas de origen bacteriano, se han clonado y secuenciado los genes codificantes en *Anabaena cylindrica*, *Anabaena sp.*, *Brevibacterium liquefaciens*, *Spirulina platensis*, *Streptomyces coelicolor*, *Stigmatella aurantiaca*, y *Rhizobium meliloti*. Excepcionalmente en *S. aurantiaca* y *R. meliloti* se han descrito dos AC pertenecientes a la clase III y codificadas por genes distintos, mientras que de la cepa PCC7120 de *Anabaena sp.* se han aislado cinco AC distintas que también pertenecen a clase III (Tabla 1).

**Tabla 1: Adenil Ciclasas Bacterianas**

Especie	Gen	Clase	Tamaño en aa	Referencias
<i>Escherichia coli</i>	<i>cya</i>	I	848	Roy y Danchin (1982)
<i>Salmonella thyphimurium</i>	<i>cya</i>	I	419	Wang et al (1981)
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>cya</i>	I	851	Danchin y Lenzen (1988)
<i>Yersinia intermedia</i>	<i>cya</i>	I	848	Glaser et al*
<i>Yersinia pestis</i>	<i>cya</i>	I	850	Glaser et al*
<i>Pasteurella multocida</i>	<i>cya</i>	I	838	Mock et al (1991)
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>cya</i>	I	843	Dorocicz et al (1993)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>cya</i>	I	843	Trotot et al*
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>cya</i>	II	800	Escuyer et al (1988)
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>cyaA</i>	II	1.706	Glaser et al (1988)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>cyaA</i>	II	1.705	Betsou et al (1995)
<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>cya1</i>	III	193	Kiely y O'Garra (1983)
	<i>cya2</i>	III	363	Archdeacon et al (1995)
<i>Anabaena cylindrica</i>	<i>cya</i>	III	502	Katayama et al (1995)
<i>Anabaena sp.</i>	<i>cyaA</i>	III	735	Katayama y Ohmori (1997)
	<i>cyaB1</i>	III	859	Katayama y Ohmori (1997)
	<i>cyaB2</i>	III	850	Katayama y Ohmori (1997)
	<i>cyaC</i>	III	1.115	Katayama y Ohmori (1997)
	<i>cyaD</i>	III	546	Katayama y Ohmori (1997)
<i>Brevibacterium liquefaciens</i>	<i>cya</i>	III	403	Peters et al (1991)
<i>Spirulina platensis</i>	<i>cyaA</i>	III	494	Yashiro et al (1996)
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>cya</i>	III	381	Danchin et al (1993B)
<i>Stigmatella aurantiaca</i>	<i>cyaA</i>	III	212	Lubochinsky et al*
	<i>cyaB</i>	III	202	Lubochinsky et al*

\* sin publicar

### Evolución de las adenil ciclasas

Como se ha descrito anteriormente, las AC constituyen una familia heterogénea de proteínas multidomínios agrupadas en tres clases perfectamente definidas por su características catalíticas. Sin embargo, dentro de cada clase existe una gama de dominios asociados al segmento catalítico, que posiblemente ejercen diferentes actividades reguladoras. Lo anterior ha llevado a postular que evolutivamente las adenil ciclasas son un claro ejemplo de la construcción modular de proteínas (Danchin, 1993 A; Barzu y Danchin, 1994).

Dentro de las adenil ciclasas, sin duda las enzimas de la clase I son las proteínas que tienen mayor similitud en cuanto a organización estructural y secuencia, mostrando en el peor de los casos un 55 % de similitud a nivel de aminoácidos. A nivel de ADN los cambios ocurren principalmente en la tercera posición de los codones, predominando las transversiones sobre las transiciones.

La comparación de las secuencias de aminoácidos de los dominios catalíticos contra las secuencias reportadas en los bancos de datos no revela similitudes significativas con alguna proteína descrita. Únicamente se detecta una similitud escasa con la subunidad alfa de ATPasas y en sus primeros 112 residuos se parecen ligeramente a proteínas que unen pirofosfato (como tRNA sintetetas). Estas similitudes son insuficientes para proponer que las adenil ciclasas de esta clase tiene su origen en las proteínas que unen ATP. Danchin (1993 A) empleó la secuencia del dominio catalítico de las enzimas de *E. coli*, *S. typhimurium*, *E. chrysanthemi*, *Y. intermedia*, *Y. pestis*, y *P. multocida* para generar un árbol filogenético (Figura 1). Las AC de *E. coli* y *S. typhimurium* se encuentran en el mismo grupo, al igual que las proteinas de las dos especies de *Yersinia*. La enzima de *E. chrysanthemi* es claramente distinta a ambos grupos al igual que la proteína de *P. multocida*, que es sin duda la más distante de la clase. Las relaciones filogenéticas generadas coinciden con la filogenia propuesta por los taxónomos, para el grupo de las enterobacterias.

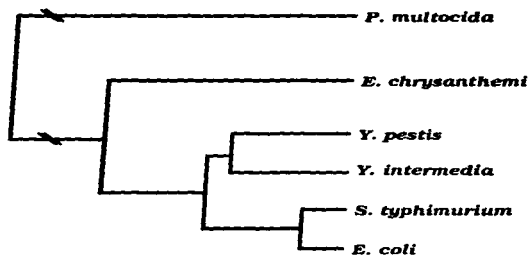


Figura 1: Árbol filogenético de las adenil ciclasas de la clase I (Tomado de Danchin, 1993 A).

En el caso de las AC de la clase II, se han descrito únicamente tres proteínas provenientes de las bacterias patógenas *B. anthracis* (Gram positiva), *B. pertussis*, y *B. bronchiseptica* (ambas Gram negativas). Un rasgo característico de estas enzimas es que se activan por CaM, proteína típicamente eucariote. Esta dependencia por CaM las hace muy interesantes ya que podría sugerirse que las AC de la clase II tienen un origen eucariote (Danchin, 1993 A). Desafortunadamente, y pese a que se han descrito numerosas proteínas eucariotas dependientes de CaM, se conoce muy poco acerca del mecanismo de activación por esta proteína. Por otra parte, no

obstante que las AC de *B. anthracis* y de *B. pertussis* no presentan gran similitud a lo largo de todo el péptido, la comparación de las regiones catalíticas de ambas enzimas permitió la identificación de cuatro regiones conservadas que aparentemente están involucradas con la catálisis y la activación por calmodulina. La primera región tiene una secuencia similar a la encontrada en estructuras de tallos y asas típica de proteínas que unen ATP o GTP y se les involucra con la unión del nucleótido. La segunda región, tiene similitud con la región catalítica de las enzimas 6-fosfofructocinasas. Las otras dos regiones conservadas no muestran similitud significativa con alguna proteína descrita (Danchin, 1993 A).

Sin duda, las enzimas de la clase III conforman el grupo más diverso dentro de la familia de las adenil ciclasas. La clase universal incluye a las AC y GC eucariontas y a las AC procariontas. Tal como ocurre en las ciclasas de las clases I y II, el dominio catalítico de estas enzimas se encuentra asociado a diversos dominios que presentan distintas funciones. Sin embargo, la comparación de los dominios catalíticos ha permitido la identificación de al menos cuatro secuencias específicas para esta clase de enzimas. Estos motivos están probablemente involucrados con la reacción de ciclización más que con la discriminación del sustrato (ATP o GTP) ya que estos motivos se conservan en las adenil y guanil ciclasas. Beuve y Danchin (1992) demostraron que mutaciones puntuales que abaten la síntesis de AMPc en una de las adenil ciclasas de *R. meliloti* le confieren la capacidad de sintetizar GMPc. La mutación no sólo permitió identificar secuencias involucradas en la actividad catalítica, si no que también evidenció como es que una AC puede generar una GC. Ambos tipos de enzimas comparten como característica común el poseer un dominio catalítico único ubicado en la región carboxilo terminal. Danchin propone, basado en estas evidencias, que ambas proteínas podrían haberse originado de un ancestro común que presentaba actividad de ciclasa de nucleótidos purínicos trifosfatados. Así mismo, sugiere que probablemente existió una proteína ciclasa con actividad dual que sintetizaba tanto AMPc como GMPc y que precede a la separación de Eubacterias y Eucariontes. Lo anterior conduce a pensar que originalmente la función del AMPc podría diferir del papel actual de segundo mensajero.

Aún resulta controversial el establecer relaciones filogenéticas entre las distintas clases de adenil ciclasas, alternativamente puede proponerse que no existe ninguna relación filogenética dentro de esta familia de proteínas y que se trata de un caso particular de evolución convergente, en el cual las distintas clases de AC se originaron independientemente. Los datos de cristalografía de las AC, aunado a la determinación de un mayor número de secuencias de genes *cya* en distintas bacterias, permitirá establecer filogenias convincentes (Danchin, 1993 A).

## EL AMPc EN BACTERIAS ENTÉRICAS

### La Red de Regulación Global AMPc-CRP

Muchas actividades bacterianas involucran la participación coordinada de gran cantidad de operones, los cuales están organizados en sistemas multigénicos de regulación denominados "Redes de Regulación Global" o "Redes Reguladoras". En algunos sistemas de este tipo, la regulación de la expresión génica de los distintos operones controlados es llevada a cabo por una proteína reguladora común (activador o represor). Usualmente las proteínas reguladoras interactúan directamente con el ADN en secuencias particulares comunes a todos los operones miembros de la red para llevar a cabo su función, activadora o represora según sea el caso. A este conjunto de operones regulados coordinadamente se les ha dado el nombre de "Regulón". En otros sistemas la red está definida por un factor sigma alternativo que reprograma a la ARN polimerasa para que reconozca únicamente los promotores de los operones miembros de la red. En algunos otros casos se involucra tanto la participación de proteínas reguladoras como de factores sigma. Comúnmente, los operones de un regulón codifican para distintas proteínas cuyas funciones están relacionadas y pueden expresarse coordinadamente bajo circunstancias particulares dadas por cambios en el ambiente.

Entre las redes de regulación global involucradas en la respuesta de bacterias entéricas a la limitación de carbono se encuentra la red AMPc-CRP, cuyos elementos como lo indica su nombre son: el AMPc, el cual funciona como señal metabólica; la proteína CRP (proteína receptora del AMPc), también llamada CAP (proteína activadora del catabolismo), o CGA (activador de genes catabólicos) que lleva a cabo la actividad reguladora. Los operones sometidos a este tipo de regulación suelen ser, aunque no siempre, operones involucrados en la utilización de fuentes secundarias de carbono y poseen en su región reguladora una secuencia nucleotídica común para el reconocimiento y unión de CRP. En *E. coli* esta red es en parte responsable del fenómeno conocido como "Represión Catabólica", que aunado a otros fenómenos como la "Represión Transitoria" y la "Exclusión Inducida" conforman el llamado "Efecto Glucosa". El efecto glucosa describe la acción inhibitoria que ejerce el metabolismo de la glucosa sobre el catabolismo de fuentes secundarias de carbono. Por medio de este efecto la bacteria asegura la prioridad de la glucosa como fuente principal de carbono y energía. En la represión transitoria se observa una severa inhibición de la síntesis de enzimas catabólicas inducibles, ante la adición de glucosa a un cultivo de bacterias que crece en una fuente de carbono secundaria. En la exclusión inducida, la presencia de glucosa impide la entrada de otros azúcares a la bacteria, al inactivar sus permeasas (Magasanik y Neidhardt, 1987).

### El complejo AMPc-CRP

La proteína CRP se descubrió a principios de los 70's (Emmer *et al.*, 1970; Zubay *et al.*, 1970; Anderson *et al.*, 1971), sin embargo, es hasta inicios de los 80's

que fue posible clonar y secuenciar a *crp*, el gen codificador en *E. coli* (Aiba *et al.*, 1982). La cristalografía de rayos X determinó que CRP es una proteína homodimérica constituida por subunidades de 209 residuos de aminoácidos, con un peso aproximado de 23,619 D (McKay *et al.*, 1982; Weber *et al.*, 1987).

Cada subunidad posee dos dominios. El dominio amino terminal, constituido por los residuos 1 al 135, contiene tres  $\alpha$  hélices y 8 hojas  $\beta$  plegadas en las que se encuentra los sitios de unión al AMPc (McKay *et al.*, 1982; Weber *et al.*, 1987). El dominio carboxilo terminal incluye los residuos 136 a 209 y se constituye principalmente por tres  $\alpha$  hélices y 4 hojas  $\beta$ -plegada. En este dominio se encuentra el motivo hélice-vuelta-hélice que interacciona específicamente con el ADN (Steitz *et al.*, 1982; Schultz *et al.*, 1990).

Cada dímero interacciona con dos moléculas de AMPc, como producto de esta interacción se inducen cambios conformacionales que alteran la orientación relativa de ambas subunidades, esto permite que el complejo AMPc-CRP se una al ADN en secuencias específicas (Kypr y Mrazek, 1985). Actualmente se sabe que la unión de una molécula de AMPc al dímero es suficiente para incrementar la especificidad de CRP por el ADN (Fried y Crothers, 1984; Heiduk y Lee, 1989). Los motivos hélice-vuelta-hélice de cada subunidad del complejo se unen a dos secuencias simétricas del ADN en dos surcos mayores consecutivos. Los operones dependientes de CRP presentan estas secuencias específicas a diferentes distancias corriente arriba del inicio de transcripción, que varían entre -40 y -200. La comparación de 26 sitios de unión conocidos denota una secuencia consenso palindrómica de 22 pb (AAATGTCATCTAGATCACATTT), en la cual el motivo TGTGA está altamente conservado en todos los sitios examinados (Berg y VonHippel, 1988).

#### **La regulación transcripcional mediada por el complejo AMPc-CRP**

El complejo AMPc-CRP activa la transcripción de algunos promotores y reprime la de otros. Los mecanismos en ambos casos son muy distintos, aunque generalmente tanto en la activación como en la represión el nivel de regulación está dado al inicio de la transcripción. No se conoce otra función para el complejo AMPc-CRP diferente del control de la transcripción, al menos en *E. coli* (Adhya y Gargos, 1982).

#### **Activación**

La activación transcripcional mediada por el complejo AMPc-CRP puede realizarse por mecanismos directos e indirectos. El complejo AMPc-CRP participa directamente en la activación transcripcional de aquellos operones que presentan en su región reguladora sitios de unión a CRP cercanos al inicio de transcripción. Ejemplo de lo anterior son los promotores *galP1*, *lacP1*, y *malTP1*, donde el sitio de unión de CRP se sitúa en los nucleótidos -41, -65, y -70 corriente arriba del inicio de la transcripción, respectivamente. Los tres sitios están separados del sitio de unión de la polimerasa por un número entero de giros helicoidales del ADN. Lo que

sugiere que CRP debe de encontrarse en una posición estereoespecífica con respecto de la ARN polimerasa, quizás debido a que existen contactos CRP-ARN polimerasa similares en los tres casos, que son requeridos para la activación (Collado-Vides et al., 1991). En estos casos la participación del complejo AMPc-CRP es suficiente para activar la transcripción por la ARN polimerasa. La activación de aquellos promotores que presentan el sitio de unión de CRP a mayor distancia corriente arriba del inicio de transcripción, generalmente depende de la participación de CRP y un segundo regulador, tal es el caso de los promotores de *araB*, *malE*, *papL*. En estos casos la participación de CRP puede considerarse como indirecta (Kolb et al., 1993). Crothers y Stetitz (1992) proponen un modelo para el mecanismo de activación directa de los promotores de *galP1* y *lacP1* con base en evidencias como: el doblamiento entre 90° y 130°, dependiente de la secuencia de unión de CRP, que sufre el ADN debido a su interacción con el complejo AMPc-CRP (Dripps y Wartell, 1987); la existencia de interacciones proteína-proteína entre CRP y la ARN polimerasa (Plinkney y Hoggett, 1988); y finalmente el doblamiento del ADN ligeramente mayor de 180° observado en complejos CRP-ARN polimerasa-ADN (Zinkel y Crothers, 1991). Tal modelo propone que inicialmente la ARN polimerasa localiza un complejo CRP-ADN e interactúa con éste para formar un complejo cerrado. Para esto se requiere que la polimerasa interactúe con el ADN corriente abajo del sitio de unión de CRP, probablemente en la región -10, y que posteriormente establezca contactos con CRP. Ambas interacciones contribuyen a que en la región corriente arriba del sitio de unión de CRP se forme una vuelta. El establecimiento de esta estructura intermedia es esencial para la formación del complejo abierto. La transición del complejo cerrado al complejo abierto es asistida probablemente por interacciones entre la polimerasa y CRP. En el complejo abierto se observa que la vuelta inicialmente formada se curva de forma tal que atrapa en su interior a CRP y a la polimerasa. Finalmente, la energía almacenada en el doblamiento, aunado a la propensión del ADN por extenderse, colaboran a desestabilizar los contactos CRP-ADN y CRP-polimerasa, contribuyendo de esta manera a que la polimerasa logre escapar del promotor.

Crothers y Stetitz (1992) concluyen que CRP activa la transcripción alterando uno o más parámetros del inicio de la transcripción; por ejemplo, al participar en la captura de la polimerasa, favorece la formación del complejo cerrado. Posteriormente, CRP acelera la isomerización del complejo cerrado al complejo abierto. Finalmente, al estimular la tasa de escape de la polimerasa, da paso a la formación de un complejo de inicio estable que se acompaña de la pérdida de la subunidad sigma. Kolb y colaboradores (1993) proponen que los distintos promotores son activados diferencialmente por CRP, es decir, que en ciertos casos CRP altera preferentemente algunos parámetros del inicio de transcripción que otros, dependiendo de la arquitectura global de la región promotora y de la distancia entre su sitio de unión al ADN y el inicio de transcripción del gen. De



esta forma se propone que CRP colabora en la captura de la polimerasa, al favorecer preferentemente la formación del complejo cerrado en aquellos promotores que presentan su sitio de unión centrado en -41 ó -65, más que en aquellos casos en que CRP se une en -70.

En la activación indirecta el complejo AMPc-CRP coopera con otras proteínas reguladoras en la activación de la expresión de ciertos genes. Un ejemplo de este tipo de activación se presenta en la expresión del regulón *mal* en *E. coli*. El regulón incluye al menos 5 operones (*malS*, *malZ*, *malP*, *malEFG*, *malK*, *LamB* y *malM*), los cuales codifican para proteínas requeridas para la utilización de maltosa y maltodextrinas como fuentes de carbono. El transporte de maltosa involucra al menos cinco proteínas, MalF, MalG, MalE, MalK, y LamB. El catabolismo de estos sustratos requiere dos enzimas específicas, la  $\alpha$ -amilomaltasa y la maltodextrina fosforilasa, codificadas por los genes *malQ* y *malP*, respectivamente (Schwartz, 1987). La inducción que ejerce la maltosa sobre la transcripción de los distintos operones es mediada por la proteína activadora, MalT. El gen *malT*, así como algunos otros miembros del regulón, dependen también de la activación mediada por el complejo CRP-AMPc. La cepas mutantes en los genes *cya*, *crp* y *malT*, son incapaces de crecer en maltosa, lo que indica que la expresión del regulón se controla a nivel transcripcional por los dos activadores. La activación de los promotores que pertenecen a los operones *malE* y *malK* dependen de CRP y MalT. Los promotores de *malE* y *malK* son divergentes y se encuentran separados por una región intergénica de 271 pb en la que se localizan 5 sitios de unión a MalT y tres sitios de unión a CRP, estos últimos localizados entre los sitios 2 y 3 de unión a MalT. Los sitios 1 y 2 de unión de MalT están cercanos al promotor de *malE*, mientras que los sitios 3, 4, y 5 se acercan al promotor de *malK*. Posterior al descubrimiento de los sitios 3, 4, y 5, se encontraron tres sitios más (de menor afinidad), que se solapaban con los anteriores, a los que llamaron 3', 4', y 5'. La presencia del complejo AMPc-CRP, ocupando los tres sitios correspondientes, tiene dos efectos: 1) Incrementa la unión de MalT a los sitios 1 y 2 cercanos al promotor de *malE*, y 2) Desplaza las tres proteínas MalT, que originalmente se encuentran unidas en los sitios 3, 4, y 5, ubicandolas en los sitios 3', 4', y 5', desde donde son capaces de activar el promotor del gen *malK*. En este caso el papel de CRP es la reubicación de MalT de un sitio inactivo a un sitio activo (Richet *et al.*, 1991).

### Represión

Los mecanismos de represión transcripcional mediados por el complejo AMPc-CRP pueden ser considerados de dos tipos: directos e indirectos. La represión directa ocurre cuando los sitios de unión del complejo AMPc-CRP se solapan con los sitios de unión de la ARN polimerasa, interfiriendo de esta forma con la unión de la polimerasa en la región promotora del operón en cuestión. Ejemplos de este tipo de represión se presenta en la expresión del gen *cya* y del operón *gal*. La región reguladora del gen *cya* de *E. coli* posee tres promotores, de los cuales el

promotor encargado de la expresión del gen (*galP2*) presenta en la región operadora una secuencia de unión para el complejo AMPc-CRP. Estudios de "footprinting" demostraron que el complejo se une en la región operadora del promotor cubriendo el ADN entre las posiciones -20 y +11, lo que impide que la polimerasa logre hacer contacto con la región promotora (Roy *et al.*, 1983). La expresión del operón *gal* de *E. coli* depende de dos promotores (*galP1* y *galP2*) ambos sujetos al control del complejo AMPc-CRP; mientras que *galP1* se activa, el *galP2* se reprime. El sitio de unión del complejo AMPc-CRP en la región reguladora del operón *gal* sobrelapa con el *galP2* bloqueando de esta manera el acceso de la polimerasa a la región -35 de este promotor (Adhya 1987).

La represión indirecta puede realizarse por distintos mecanismos, uno de ellos se presenta en la regulación del gen *crp* en *E. coli*. La expresión de *crp* se autoregula por el complejo AMPc-CRP. La región reguladora del gen posee dos promotores divergentes y un sitio de unión para CRP en la posición +42 en relación con el inicio de transcripción del ARNm de *crp*; el complejo AMPc-CRP al unirse a este sitio activa el promotor divergente, en la cadena opuesta del gen *crp*, generando la síntesis de un ARNm antisentido. Aparentemente existe una competencia entre los dos promotores por la unión de la ARN polimerasa, que ante la presencia de AMPc y CRP, se favorece la unión de la polimerasa en el promotor divergente en la cadena contraria al gen *crp* (Hanamura y Aiba, 1991).

Otro ejemplo de represión efectuada por el AMPc y CRP se presenta en la expresión de ciertos genes, involucrados con el catabolismo de nucleósidos, cuyos promotores se regulan negativamente por CytR. Todos los promotores dependientes de CytR presentan sitios de unión a CRP localizados a 40 pb "upstream" del inicio de transcripción. La transcripción de estos genes se reprime cooperativamente por la unión de CRP y CytR en secuencias cercanas a la región promotora. La unión de CRP favorece mediante interacciones proteína-proteína, que el represor directo CytR se una en la región operadora del gen reprimiendo su transcripción (Sogaard-Andersen *et al.*, 1991).

### **LAS FUNCIONES REGULADAS POR EL AMPc EN BACTERIAS ENTÉRICAS**

Si bien es cierto que al AMPc se le describió inicialmente por su papel en el control de la represión catabólica en *E. coli*, actualmente son cuantiosos los reportes en que involucran al complejo AMPc-CRP en la regulación de otros procesos celulares diferentes (Tabla 2). Cabe mencionar que algunos reportes acreditan al AMPc papeles independientes de CRP, por ejemplo: Unden y Guest (1984) describen que *E. coli* requiere de AMPc pero no de CRP cuando crece en condiciones de anaerobiosis en un medio con glucosa. Observan que mutantes deficientes en la síntesis de AMPc detienen su crecimiento bajo estas condiciones, mientras que mutantes defectivos en CRP continúan creciendo. Por otra parte, se reporta que el AMPc interactúa con la proteína DnaA modificandola

alostéricamente, estimulando su unión al origen de replicación (oriC) y favoreciendo la replicación del genoma de *E. coli* (Hughes *et al.*, 1988).

Tabla 2: Funciones reguladas por el AMPc en *E. coli* y *S. typhimurium*

Genes	Función	Criterio
<i>ansB</i>	L-Asparaginasa II	B, D, F, G
<i>appR</i>	Fosfatasa ácida	D
<i>cat</i>	Cloranfenicol acetiltransferasa	D
<i>ccdA</i>	Deoxicitidina deaminasa	F
<i>cldA</i>	Catabolismo de N-Acetilglucosamina	D
<i>ctr</i>	Receptor del colicina	D
<i>cpdB</i>	Fosfodiesterasa 2',3'-cíclica	A,F
<i>crp</i>	Proteína receptora del AMPc	A, B, C, D, E, F
<i>cup</i>	Transporte de carbohidratos	B
<i>cya</i>	Adenil ciclasa	A, B, C, D, E, F
<i>dnaA</i>	Regulación de la replicación	E
<i>exuT</i>	Metabolismo de galactosidos	D
<i>fadBC</i>	Utilización de ácidos grasos	B, F, G
<i>fic</i>	Filamentación	D
<i>flaAB</i>	Síntesis de flagelo	D
<i>flaD</i>	Síntesis de flagelo	D
<i>fru</i>	Expresión del regulón de la fructosa	D
<i>fur</i>	Expresión del regulón para la toma de fierro	D, F, G
<i>glpD</i>	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	B, F
<i>glcC</i>	Síntesis de glucógeno	E, G
<i>guaA</i>	Expresión de la treonina desaminasa	D, F, G
<i>guaB</i>	Acetohidroxiácido sintasa I	D
<i>melR</i>	Síntesis del activador de la melibiosa	E, F
<i>pck</i>	Expresión de la PEP Carboxilasa	A, B, G
<i>sdh</i>	Operón de la succinato deshidrogenasa	F, G
<i>speC</i>	Ornitina descarboxilasa	B, E
<i>tdc</i>	Treonina deshidratasa	B
<i>toxAB</i>	Producción de enterotoxinas	A, B, D, F, G
<i>tra</i>	Genes de transferencia en el plásmido F	C
<i>tsx</i>	Proteína de la membrana exterior	D, C, G
<i>ubiG</i>	Síntesis de la ubiquinona	A, D, G
<i>waa CA</i>	Metabolismo de galactosidos	D
	Respuesta al "Heat shock"	C
	Promotor P4 del pBR322	A, B
	Número de copias del plásmido P4	B
	Formación del pill	D, F
	Reducción del tiosulfato	A

Esta tabla es una modificación de la Tabla 1 presentada por Botsford y Harman (1992).  
 Criterios: A. Función sensible a represión catabólica; B. Función afectada por la adición de AMPc; C. Cuantificación de nucleótidos cíclicos; D. Evidencias genéticas apartir de cepas mutantes *cyaR* y *crp*; E. Evidencias bioquímicas "in vitro"; F. Sitios de unión para CRP presentes en las regiones promotoras; G. Estudios con fusiones de genes reporteros.

### La represión catabólica

En el termino "Represión catabólica" originalmente propuesto por Magasanik (1961) se presuponia que como producto del metabolismo de la glucosa se producían elevados niveles de intermediarios metabólicos, algunos de cuales podrían causar alguna represión en la síntesis de enzimas catabólicas de fuentes secundarias de carbono en *E. coli*. Actualmente en distintos grupos de bacterias no

entéricas se han descrito numerosas proteínas cuya expresión está sujeta al fenómeno de la represión catabólica, ejercida por fuentes de carbono diferentes a la glucosa. En estas bacterias las funciones sujetas a represión catabólica se relacionan con diversos fenómenos como la bioluminiscencia, la fotosíntesis, la esporulación, la motilidad, la biosíntesis de toxinas y la biosíntesis de pigmentos, etc.

En *E. coli*, la represión catabólica describe la represión permanente de la síntesis de enzimas catabólicas aún en la presencia de sus inductores apropiados por efecto del metabolismo de la glucosa. Para activar la síntesis de enzimas que intervienen en el catabolismo de fuentes secundarias de carbono, se requiere de la activación de los promotores pertenecientes a aquellos operones miembros de la red AMPc-CRP por medio del mecanismo descrito en la sección "activación".

La presencia de glucosa en el medio interfiere en la síntesis de AMPc en bacterias entéricas de la siguiente manera: como se ha mencionado anteriormente, la síntesis del AMPc se lleva a cabo por la enzima AC, mientras que la degradación corre a cargo de una fosfodiesterasa de AMPc. La AC es una enzima que se encuentra adosada a la membrana y cuya actividad se modula por una segunda proteína membranar denominada proteína III<sup>Glc</sup>, también conocida como proteína IIA (producto del gen *crr*). Tal proteína es componente del sistema de la fosfotransferasa (PTS) del complejo fosfoenolpiruvato (PEP) y tiene por función introducir glucosa a la célula (Figura 2).

Se han propuesto al menos dos teorías para explicar la activación de la AC por la proteína III<sup>Glc</sup>. La primera teoría propone que durante el transporte de la glucosa, la proteína III<sup>Glc</sup> fosforilada (III<sup>Glc</sup>-P) cede su grupo fosfato a las moléculas de glucosa entrantes, quedando dicha proteína en un estado desfosforilado, lo cual trae como consecuencia que la AC se inactive, debido a que aparentemente la AC se activa alostéricamente por la proteína III<sup>Glc</sup>-P (Neidhardt *et al.*, 1990). La segunda teoría propone que tanto la AC como la glucosa se fosforilan diferencialmente por la proteína III<sup>Glc</sup>. En ausencia de glucosa en el medio, la AC tras ser fosforilada se activa e inicia la síntesis del AMPc. Por otra parte, en presencia de glucosa en el medio, la proteína III<sup>Glc</sup> fosforila preferencialmente al azúcar entrante, quedando la AC desfosforilada e inactiva (Saier, 1989). Sin importar cual sea el mecanismo existente en la activación de la AC, la concentración de glucosa en el medio celular interfiere determinadamente en la actividad de la enzima y por ende en los niveles celulares del AMPc. Finalmente, cuando la concentración de glucosa en el medio es nula o muy baja, se induce la actividad de la AC, incrementando los niveles de AMPc celular y la formación del complejo AMPc-CRP. El complejo AMPc-CRP puede entonces activar la síntesis de los operones miembros de la red en la presencia de sus inductores específicos (Saier, 1989).

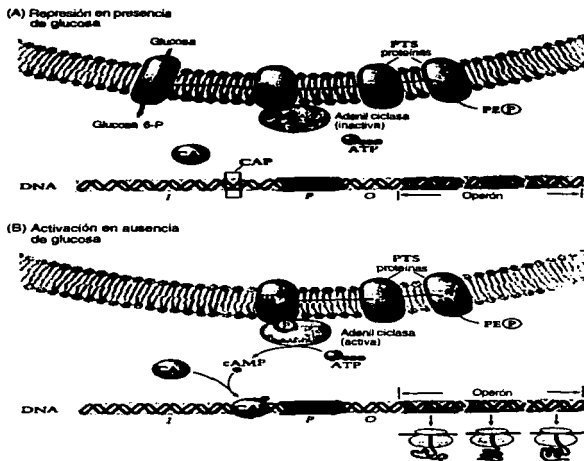


Figura 2: Modelo propuesto por Sater (1989) que esquematiza como la glucosa, al interferir en la síntesis del AMPc, regula indirectamente la expresión de enzimas catabólicas de fuentes de carbono secundarias (Tomado de Neidhardt et al., 1990).

(A) En presencia de glucosa, la adenil ciclasa se encuentra inactiva, no se sintetiza AMPc y por lo tanto no hay formación de complejos AMPc-CRP, lo que impide la activación de los operones blanco.

(B) En ausencia de glucosa, la adenil ciclasa sintetiza AMPc, se forman complejos AMPc-CRP que se unen en secuencias específicas en el ADN, para activar la transcripción de los operones blanco.

### Virulencia

Se obtuvieron mutantes *cya*<sup>-</sup> y *crp*<sup>-</sup> de *S. typhimurium* mediante inserciones del Tn10. Ambas cepas mutantes crecieron más lentamente que la cepa silvestre y son completamente avirulentas en células intestinales de ratón en cultivo. Esto indica que se requiere del complejo AMPc-CRP para el desarrollo de la virulencia en esta especie (Curtiss y Kelly, 1987).

### **Motilidad**

Se ha demostrado que en bacterias entéricas el complejo AMPc-CRP activa la expresión del operón *flaAB* y del gen *flaD*, cuyos productos se encargan de la síntesis del flagelo. Cepas mutantes deficientes en la síntesis de AMPc o CRP son inmóviles ya que no forman flagelos (Kutsukake *et al.*, 1990).

### **Anaerobiosis**

Cuando *E. coli* crece en condiciones anaeróbicas expresa *de novo* más de 50 proteínas específicas, algunas de ellas están relacionadas con la respiración anaeróbica y las otras son específicas del metabolismo fermentativo. Se ha demostrado la participación del AMPc y CRP en la expresión de algunas de estas proteínas, por ejemplo: la enzima L-asparaginasa II dependiente de FNR también depende de AMPc y CRP, puesto que mutantes *cya*<sup>-</sup> o *crp*<sup>-</sup> alteran su expresión (Russell y Yamazaki, 1978).

### **División Celular**

Distintos reportes proponen que el AMP y CRP intervienen en el proceso de la división celular en *E. coli*, ya que se ha visto que la expresión de genes vitales involucrados en este proceso, tales como *sflA*, *sflC* y *fts*, requieren del complejo AMPc-CRP (Holtje y Nanninga, 1984; Kumar *et al.*, 1981).

### **Fase Estacionaria**

Las bacterias entran en fase estacionaria cuando se encuentran en condiciones ambientales adversas, como lo es la limitación de algún nutriente esencial. En esta fase las bacterias presentan cambios morfofisiológicos relacionados con modificaciones en el patrón de la expresión génica. En *E. coli* la limitación de un determinado nutriente induce una respuesta específica. Los sistemas de regulación involucrados (AMPc/CRP para carbono, NtrB/NtrC/ $\sigma^{54}$  para nitrógeno, y PhoR/PhoB para fósforo), controlan la síntesis de una gran cantidad de proteínas específicas para cada tipo de privación (Hengge-Aronis, 1993). Durante la privación de carbono se induce la síntesis de novo de treinta proteínas con distintos patrones temporales de expresión, algunas de las cuales han mostrado ser de importancia para la sobrevivencia de la bacteria. Veinte de estas proteínas están bajo el control del complejo AMPc-CRP. Los genes que codifican a estas proteínas se han llamado genes *est*. Se piensa que están relacionados con la preparación de la bacteria para escaparse de la privación, puesto que muchos de estos genes codifican para proteínas catabólicas y transportadoras de fuentes de carbono (Siegle y Kolter, 1992).

### **EL AMPc EN BACTERIAS NO ENTÉRICAS**

En 1985 Biville y Guiso presentan evidencias de la existencia de AMPc en doce diferentes bacterias Gram negativas, algunas de las cuales no son entéricas y reportan que la regulación de la concentración del AMPc en función de las condiciones del crecimiento, es similar a la descrita para *E. coli*. También, mediante

el empleo de ensayos radioinmunológicos, describen la presencia de CRP en algunas de las bacterias empleadas en su estudio. Por otra parte, pese a que el AMPc se ha detectado en una amplia variedad de bacterias, con pocas excepciones se ha estudiado a fondo el papel del nucleótido en los distintos procesos celulares en los que se le ha involucrado. Así mismo, no se ha logrado establecer categóricamente si es que el AMPc actúa en combinación con CRP en la regulación de estos fenómenos (Tabla 3). Excepcionalmente en bacterias no entéricas como *Haemophilus influenzae* y *Vibrio fischeri* al complejo AMPc-CRP, más que relacionarlo con el fenómeno de la represión catabólica, se ha acreditado su participación en el desarrollo de la competencia y en la luminiscencia, respectivamente.

Tabla 3: El AMPc en bacterias

Bacteria	Función	Criterio
<i>Salmonella typhimurium</i>	Virulencia	A, B, C, D, E, F
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Expresión de la pectato liasa	A, B
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Regulación del desarrollo	B
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Inducción del operón <i>hut</i>	B, E
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Metabolismo de nitrógeno y regulación de enzimas del ciclo de Krebs	A, B
<i>Serratia marcescens</i>	Catabolismo de carbono	B, C
<i>Bordetella pertussis</i>	Patogenicidad	D
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Patogenicidad	D
<i>Bacillus anthracis</i>	Patogenicidad	D
<i>Legionella pneumophila</i>	Desarrollo celular	B
<i>Vibrio spp.</i>	Bioluminiscencia y producción de proteasas	A, B, C, D
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Producción de antibióticos	A, B
<i>Rhodocyclus gelatinosus</i>	Regulación de genes fotosintéticos	B, C
<i>Anabaena spp.</i>	Formación del aparato fotosintético	B, C, D
<i>Streptomyces spp.</i>	Esporulación y síntesis de celulosa	B, C
<i>Thermomonospora curvata</i>	Producción de celulosa	B, C
<i>Clostridium botulinum</i>	Esporulación	A, B, C
<i>Photobacterium spp.</i>	Expresión del gen <i>ompH</i>	A, B
<i>Spirulina platensis</i>	Movilidad	B, C
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Represión catabólica	B, C, D
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Síntesis de ácidos grasos	B
<i>Nocardia salmonicida</i>	Regulación de la isocitrato liasa	B, C
<i>Alcaligenes eutrophicus</i>	Expresión de la hidrogenasa	B
<i>Arthobacter crystallopoietes</i>	Morfogénesis	B, C
Myxobacterias	Formación de esporas y del cuerpo fructífero	B, C
<i>Noctoc mucorum</i>	Morfogénesis	B

Esta tabla es una modificación de la Tabla 2 presentada por Botsford y Harman (1992).

Criterios: A. La glucosa reprime la síntesis de enzimas; B. Función afectada por la adición de AMPc; C. Cuantificación de nucleótidos cíclicos; D. Evidencias genéticas, locus *cya* y/o aparentes mutantes *cya*<sup>-</sup> y *crp*<sup>-</sup>; E. Evidencias de la expresión de genes "in vitro"; F. Sitios de unión para CRP presentes en las regiones promotoras.

### Luminiscencia

Cepas mutantes de *V. fischeri cya*<sup>-</sup> o *crp*<sup>-</sup> producen niveles reducidos de luminiscencia. Adicionalmente, el análisis de secuencia de la región reguladora del los genes *lux* (encargados de la luminiscencia) revelan un posible sitio de unión de CRP, evidenciando que el complejo AMPc-CRP regula el desarrollo de la luminiscencia en esta bacteria (Dunlap, 1989).

## **Desarrollo de la Competencia**

*H. influenzae* es una bacteria Gram negativa capaz de desarrollar competencia y ser transformable de manera natural. Mutantes de *H. influenzae* deficientes en la síntesis de AMPc o CRP no desarrollan competencia, además de que presentan un fenotipo pleiotrópico en la fermentación de carbohidratos (Dorocicz, 1993).

## **Motilidad**

En la cianobacteria filamentosa *S. platensis*, el AMPc adicionado de manera exógena funciona como un factor que estimula la motilidad celular al participar directamente en la formación de la capa mucilaginoso que permite el deslizamiento de la bacteria (Ohmori *et al.*, 1993)

## **Patogénesis**

Algunas bacterias patógenas como *B. pertussis*, causante de la tosferina, y *B. anthracis*, responsable de la enfermedad conocida como ántrax, sintetizan una adenil ciclasa tóxica. La AC es liberada y posteriormente internalizada en las células hospederas, aumentando indiscriminadamente los niveles de AMPc que desajustan distintos procesos en las células eucariotas. Mutantes de *B. pertussis* en la síntesis de la adenil ciclasa son avirulentas. Por otra parte, no se ha definido si el AMPc tiene algún papel en la fisiología de estas bacterias (Danchin, 1993 A).

## **Fotosíntesis**

En la bacteria fotosintética *Rhodocyclus gelatinosus* el AMPc reduce la cantidad de pigmentos involucrados en la fotosíntesis, sugiriendo que el nucleótido participa en la regulación de la expresión de genes involucrados con el proceso fotosintético (Murray *et al.*, 1988). En la cianobacteria *Anabaena cylindrica* los niveles de AMPc se incrementan notablemente cuando las células crecidas en condiciones de luz son cambiadas a oscuridad (Ohmori *et al.*, 1988). En otros reportes se describe como el AMPc interfiere con la formación de aparato fotosintético en *Anabaena variabilis* (Smith *et al.*, 1981).

## **Síntesis de Celulasa**

*Thermomonospora curvata* es una bacteria termófila que produce celulasa. Una mutante sobreproductora de la celulasa produce elevados niveles de AMPc. Por otra parte, cuando el AMPc se adiciona de forma exógena a células en cultivo, estimula la producción de la celulasa, sugiriendo que el AMPc está involucrado en la síntesis de esta enzima (Wood *et al.*, 1984).

## **Morfogénesis**

Bacterias del género *Arthrobacter* presenta formas circulares cuando crecen en fase exponencial y cambian su morfología a bastones al entrar en fase estacionaria. El AMPc inhibe este cambio de morfología cuando se adiciona de forma exógena (Hamilton *et al.*, 1977). Concomitantemente, mutantes que no presentan esta transición de morfología producen reducidos niveles de AMPc. Tales evidencias sugieren que el AMPc participa en la regulación de la morfología en este género de bacterias (Hamilton *et al.*, 1978).



## **ANTECEDENTES**

### **La Fijación Biológica de Nitrógeno**

La fijación biológica del nitrógeno es el proceso mediante el cual el nitrógeno atmosférico es reducido a amonio, por la acción de la enzima nitrogenasa. Sólo algunas bacterias son capaces de fijar nitrógeno y pueden hacerlo en vida libre (*Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter*) o en simbiosis con plantas (bacterias *Rhizobiaceas*). En este último caso, las bacterias reducen el nitrógeno mediante asociaciones simbióticas con plantas leguminosas. Este proceso requiere de la formación de estructuras radicales denominadas nódulos en las cuales se albergan las formas bacteroidales directamente encargadas de la fijación del nitrógeno.

### **La Represión Catabólica en *Rhizobiaceas***

En vida libre las distintas especies de *Rhizobium* se encuentran confrontadas con una enorme variedad de fuentes de carbono cuya cantidad y calidad puede ser un factor limitante para su crecimiento. Dada la disponibilidad de diferentes fuentes de carbono en el suelo, el control de la represión catabólica en estas bacterias es de gran importancia. Existen evidencias de fenómenos similares al de la represión catabólica descrito para *E. coli* en varias especies de *Rhizobium*, con la diferencia de que en la mayoría de los casos reportados son los ácidos dicarboxílicos como el succinato, en lugar de la glucosa, los encargados de ejercer el efecto represor.

Ucker y Signer (1978) reportan por primera vez para una especie de *Rhizobium*, la existencia de un fenómeno similar a la represión catabólica, demostrando que en *R. meliloti* el succinato causa una inmediata reducción en la actividad de  $\beta$ -galactosidasa cuando se adiciona a células crecidas en lactosa. Arias y colaboradores (1982) reportan que ácidos dicarboxílicos, como el succinato y malato, reprimen el catabolismo de la manosa en *R. meliloti*. Rohm y colaboradores (1985) demuestran que el succinato reprime la respiración de fenol de células en vida libre y bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum*. Stowers y Elkan (1985) describen que el succinato regula los niveles de distintas enzimas catabólicas de hexosas pertenecientes a las rutas metabólicas de ED (Entner-Doudoroff) y EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) en *B. japonicum*. Las enzimas encargadas de la utilización del formato (formato deshidrogenasa y RuBP carboxilasa) en *B. japonicum* están sujetas a represión catabólica por ácidos dicarboxílicos, según reportes de Simpson (1979) y Manian (1982). En las investigaciones realizadas por McGetrick (1985 A) se plantea que distintas fuentes de carbono, entre ellas intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, ejercen represión sobre la fijación de CO<sub>2</sub> al reducir la actividad de la enzima RuBP carboxilasa en *R. meliloti*. Mandal (1993 A) reporta que las enzimas de las rutas ED y EMP encargadas del metabolismo de hexosas en *R. ciceri* son inducibles por la glucosa y están sujetas a represión catabólica por el succinato.

### **El AMPc en *Rhizobium***

Durante la fijación de nitrógeno el patrón de la expresión génica en ambos organismos sufre cambios drásticos. La naturaleza de las señales involucradas en este proceso diferencial de la expresión génica no están del todo aclaradas. Diversos procesos celulares su regulados por el complejo AMPc y CRP en bacterias Gram negativas como *E. coli*. El AMPc ha sido detectado en algunas especies de *Rhizobium*, incluso en el estado de bacteroide, implicándolo en el control de funciones celulares tales como: la regulación de la asimilación de amonio durante la simbiosis, la represtión catabólica y la regulación del metabolismo de hidrógeno.

Durante la simbiosis los bacteroides activan la síntesis de la nitrogenasa, al mismo tiempo que reprimen la síntesis de las enzimas encargadas de asimilar el amonio. Upchurch y Elkan (1978) proponen que el AMPc intervenga en la regulación de la asimilación de amonio en *B. japonicum*, ya que la adición de 1 mM de AMPc a un medio de cultivo adicionado con NH<sub>4</sub>Cl, reprime hasta cinco veces la expresión de las tres enzimas involucradas con éste proceso (glutamino sintetasa, glutamato sintasa y glutamato deshidrogenasa). Esto indica que el AMPc podría tener un papel en la simbiosis puesto que modula la actividad de las enzimas involucradas en la asimilación de amonio (Upchurch y Elkan, 1978).

Por otra parte, se ha reportado que en bacteroides de *B. japonicum* la AC y la fosfodiesterasa presentan patrones de actividad temporalmente distintos, es decir, al cuantificar la actividad de ambas enzimas en el bacteroide, se encontró que la actividad de la fosfodiesterasa disminuye conforme el nódulo se desarrolla, a la vez que la actividad de la AC se incrementa. Lo anterior sugiere que el AMPc tiene un papel durante la simbiosis (Cateneze *et al.*, 1989).

Lim y Shanmugam (1979) reportan que en *B. japonicum* algunos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, como el malato o el succinato, reducen la utilización de hidrógeno molecular (H<sub>2</sub>). Cuando se agrega AMPc a células creciendo en medios de cultivo con malato como única fuente de carbono, se supera la inhibición ejercida por el malato sobre la toma de H<sub>2</sub>, lo cual indica que posiblemente el AMPc tiene algún papel en la regulación del metabolismo del H<sub>2</sub>. En el mismo reporte también se demuestra que las pozas del AMPc intracelular varían dependiendo de la fuente de carbono disponible, de forma similar a como ocurre en *E. coli*. Los niveles del nucleótido fueron bajos cuando las células se crecieron en malato, pero altos cuando se crecían en presencia de glutamato. Posteriormente MacGetrick (1985 A) demuestra que se logra aliviar el efecto represor del malato sobre la toma de H<sub>2</sub> incrementando la dosis génica, es decir, introduciendo una copia extra del gen *cya* de *R. meliloti* en su cepa de *B. japonicum*.

Cuando se crece en acetato a *R. ciceri* la adición de succinato causa represión sobre la actividad de la isocitrato liasa, enzima de la ruta del glicoxilato. La adición de AMPc exógeno alivia substancialmente la represión ejercida por el succinato (Mandal y Chakrabarty, 1993 B).

### **Las AC en *Rhizobium***

Mediante la complementación de cepas mutantes de *E. coli cya*<sup>-</sup> se han logrado clonar los genes que codifican para las adenilatos ciclasas de *R. meliloti* (Kleij, 1983 y Archdeacon *et al.*, 1995) y *B. japonicum* (Guerinot y Chelm, 1984). En el caso de *R. meliloti*, se han descrito dos adenil ciclasas distintas (AC1 y AC2), codificadas por los genes *cya1* y *cya2*, respectivamente. Estas proteínas no muestran gran similitud entre ellas ni con su homóloga en *E. coli*. La AC1 de *R. meliloti* es una proteína de 193 residuos de aminoácidos, mientras que la AC2 es una proteína de 363 residuos de aminoácidos, ambas son significativamente más pequeñas que la correspondiente en *E. coli*, la cual es de 848 residuos de aminoácidos (Roy y Danchin, 1982). Por otra parte, mediante experimentos de hibridación se comprobó que el gen que codifica para la AC en *B. japonicum* no muestra similitud con el gen *cya* de *E. coli*.

Los alineamientos de las secuencias de distintas AC demostraron, sorprendentemente, que las proteínas de *R. meliloti* son más parecidas a las adenil y guanil ciclasas descritas en eucariontes, que a las enterobacterianas (Beauve *et al.*, 1990 y Archdeacon *et al.*, 1995), razón por la cual se encuentran clasificadas, junto con las ciclasas de eucariontes y de algunas procariontes, en la clase III.

La clonación de los genes *cya* de *R. meliloti* y de *B. japonicum* propició la construcción de cepas mutantes *cya*<sup>-</sup> en estas bacterias. Tanto la mutante sencilla, como la doble mutante de *R. meliloti* reducen la producción de AMPc, pero no la abaten (Boesten *et al.*, 1988 y Archdeacon *et al.*, 1995). Una situación similar se presentó en el caso de la mutante *cya*<sup>-</sup> de *B. japonicum*. (Guerinot y Chelm, 1985). Lo anterior indica que estos organismos poseen mecanismos alternativos para la síntesis de AMPc, es decir, que posiblemente poseen más de dos copias del gen *cya*. (O'Regan *et al.*, 1989 y Archdeacon *et al.*, 1995). Por otra parte se desconocen los mecanismos que regulan la actividad de la AC en rhizobáceas. Se ha descrito que aparentemente carecen del sistema de fosfotransferasa (PTS), componente necesario en la regulación de la actividad de la AC en enterobacterias. Además dado el reducido tamaño de la AC1 de *R. meliloti*, es posible que ésta carezca del dominio para la regulación por PTS (Peterkofsky *et al.*, 1993).

### **El CRP en *Rhizobium***

Existen evidencias que indican la existencia de CRP en *Rhizobium*, por ejemplo, McGetrick (1985 B) demuestra que el operón de la lactosa de origen entérico puede expresarse tanto en *R. meliloti* como en *B. japonicum*. La expresión del operón *lac* se ensayó cuantificando los niveles de  $\beta$ -galactosidasa en cepas mutantes *lac*<sup>-</sup> de *R. meliloti* y *B. japonicum* crecidas en presencia de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido, inductor del operón).

Wang y colaboradores (1993) presentan evidencias que establecen que el complejo AMPc-CRP reprime la expresión de *dctA* de *R. meliloti* en un sistema heterólogo en *E. coli*. DctA es el transportador de ácidos dicarboxílicos y forma

parte del operón *DctABD*. En este experimento se monitorea la transcripción del gen *dctA* mediante una fusión con *dctA-lacZ*. La expresión de *dctA* se induce en la presencia de succinato (como en *Rhizobium*), pero también ante glucosa y maltosa, siendo mayor en presencia de glucosa que con maltosa o succinato, lo que indica que tal expresión diferencial es dependiente de la fuente de carbono empleada y que posiblemente el complejo AMPc-CRP juega un papel en la regulación de la expresión del promotor de *dctA*. Para demostrar esta hipótesis se monitoreó la expresión de *dctA* en cepas de *E. coli cya<sup>-</sup>* y en una doble mutante *cya<sup>-</sup> crp<sup>-</sup>*. En ambos fondos genéticos la expresión fue mayor que en la cepa silvestre, sin embargo, en la cepa *cya<sup>-</sup>* la expresión disminuyó ante la adición de AMPc exógeno. Estos resultados demuestran que el complejo AMPc-CRP tiene un efecto represor sobre la expresión del promotor de *dctA* y que este efecto es dependiente del nivel de AMPc. Posteriormente demuestran *in vitro*, mediante ensayos de retardo de la migración de ADN en un corrimiento electroforético, que el complejo AMPc-CRP se une directamente a la región promotora del gen *dctA* y que posiblemente interactúa con los mismos sitios de unión de DctD, el activador natural del operón.

#### **El AMPc en *Rhizobium etli***

*Rhizobium etli* es la bacteria endosimbótica más frecuentemente asociada a raíces de frijol aisladas de la región central de México (Martínez *et al.*, 1985). Son bacilos Gram negativos aeróbicos capaces de crecer en medio mínimo suplementados con ácidos dicarboxílicos como la mejor fuente de carbono. La cepa CE3, cepa tipo de ésta especie, se caracteriza por poseer seis plásmidos, cuyos tamaños varían entre 120 y 750 kb y por la presencia de dos copias de los genes *nifDK* y tres de *nifH* (Segovia *et al.*, 1993) los cuales codifican para las enzimas nitrogenasa y nitrogenasa reductasa, respectivamente.

Mora y colaboradores (1993 A) reportaron que distintas especies de *Rhizobium* disminuyen su crecimiento después de ser subcultivadas en medio mínimo, con un patrón característico de cada especie. *R. etli* CE3 al ser subcultivada en medio mínimo presenta un metabolismo que asemeja al fermentativo, en el cual, el contenido de O<sub>2</sub> se reduce, simultáneamente se excretan aminoácidos, ácidos orgánicos (algunos son intermediarios de ciclo de Krebs) y se acumula poli-B-hidroxibutirato. El crecimiento de *R. etli* se mantiene constante cuando se inocula a baja densidad o cuando se mantiene el O<sub>2</sub> al 20 %. De igual manera la adición de suplementos al medio mínimo como tiamina, biotina o AMPc permiten que *R. etli* CE3 continúe creciendo ininterrumpidamente. Estos datos permiten suponer que en *R. etli* el AMPc podría ser una señal involucrada con el cambio de metabolismo aeróbico a fermentativo.

Mora y colaboradores (1993 B) describen que en *R. etli*, el succinato reprime la utilización de glutamina en cultivos crecidos en presencia de ambas fuentes de carbono, y que la adición de AMPc en este medio de cultivo provoca que la

glutamina sea oxidada en mayor proporción que el succinato. Así mismo, los niveles de AMPc acumulados cuando se crece a *R. etli* en medio mínimo glutamina fueron seis veces mayores que cuando se crece en medio mínimo succinato-amonio, indicando que el AMPc puede ser una señal de privación de carbono en estas bacterias.

#### **OBJETIVO**

No obstante que el AMPc se ha implicado en el control de diversas funciones celulares en distintas especies de *Rhizobium*, la carencia de mutantes deficientes en la síntesis de AMPc ha impedido discernir en forma precisa el papel del nucleótido en estas bacterias. Por esta razón, con la finalidad de contribuir al esclarecimiento de la función del AMPc en bacterias *Rhizobiaceas*, el objetivo del presente trabajo se circunscribe a la clonación de los genes *cya* de *R. etli* y la consecuente generación de cepas mutantes.

## MÉTODOS

### Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo

En la tabla 4 se muestran los plásmidos y las cepas empleadas en este estudio. La cepas de *E. coli* se crecieron a 37°C en LB (Apéndice 1); medio mínimo M9 suplementado con la fuente de carbono elegida al 0.2 % (p/v) (Apéndice 2); y agar MacConkey adicionado con la fuente de carbono seleccionada a una concentración de 1 % (p/v) (Apéndice 3). Las cepas de *R. etli* se crecieron a 30°C en PY (Apéndice 4) o medio mínimo (Apéndice 5). Cuando fue necesario se utilizaron los siguientes antibióticos a las concentraciones indicadas: tetraciclina (Tc) a 10 µg/ml, carbenicilina (Cb) a 100 µg/ml, kanamicina (Km) a 30 µg/ml, estreptomictina (Sm) a 100 µg/ml, gentamicina (Gm) a 30 µg/ml, espectinomictina (Sp) a 100 µg/ml. El X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactósido) y el IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) se usaron a una concentración de 20 µg/ml. El AMPc se adicionó en concentraciones finales de 1 mM y la tiamina a 10 µg/ml. Los siguientes aminoácidos: serina, metionina, glicina y leucina, se adicionaron a la concentración final de 1 mM. Los cultivos en medios líquidos se mantuvieron a 30°C en agitación constante a 200 rpm para *R. etli* y a 37°C en agitación constante a 250 rpm para *E. coli*.

Tabla 4: Cepas bacterianas y plásmidos.

Cepas y Plásmidos	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i>		
HB101	F <sup>-</sup> , <i>hsdS20, leuB6, proA2, thyA1, lacY1, supE44, ara14, galK2, xyl5, psi20, recA13</i>	Boyer y Roullan-Dussoix (1969)
DH5α	F <sup>-</sup> , <i>hsdR17, thi-1, gyrA, Δ(lacZYA-argF), supE44, recA1, Δ(80dΔ lacZ M15), relA</i>	Hanahan (1983)
SP850	<i>relA1, spoT1, Δ(cya-1400)::kan, thi-1</i>	Shah et al. (1991)
CAB445-1	<i>relA1, spoT1, Δ(crp-45), thi-1</i>	Sauborn y Beckwith (1975)
W3110	Silvestre	
<i>R. etli</i>		
CE3	Silvestre CFN42, Sm <sup>r</sup>	Noel et al. (1984)
CON18	CE3 <i>cya</i> <sup>-</sup>	Este trabajo
CON22	CE3 <i>cya</i> <sup>-</sup>	Este trabajo
Plásmidos		
pLAFR1	Cósmido mobilizable RK2, Tc <sup>r</sup>	Friedman et al. (1982)
pSK	Replíción ColE1, Apr <sup>r</sup>	Stratagene
pRK2073	Plásmido ayudante, Sp <sup>r</sup>	Ditta et al. (1980)
pWS233	Replíción mobilizable ColE1, Gm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , <i>sacRB</i>	Selbitschka et al. (1993)
pKOK6	Interposón <i>lacZ</i> -Km <sup>r</sup> en pKOK4, Km <sup>r</sup> , Cb <sup>r</sup>	Kokotek et al. (1989)
pE2	pSK/frag. <i>EcoRI</i> de 2 kb del cósmido pTS933	Este trabajo
p193	pSK/frag. <i>EcoRI</i> de 2 kb del cósmido pTS1190	Este trabajo
p10	pSK/frag. <i>EcoRI</i> de 10 kb del cósmido pTS934	Este trabajo
p33.10	pSK/frag. <i>SaII</i> de 3 kb del cósmido pTS934	Este trabajo
pX6	pSK/frag. <i>SaII</i> de 6 kb del cósmido pTS1179	Este trabajo
pSX3.7	pSK/frag. <i>SaII/XhoI</i> de 3.7 kb del cos. pTS1179	Este trabajo

### **Conjugación bacteriana**

Se realizó una cruz triparental empleando como cepa receptora la mutante SP850 (*cyx*<sup>-</sup>) de *E. coli* y como donadoras las colonias HB101 de *E. coli* que albergan el banco genómico de la cepa CE3 de *R. etl*. El banco genómico lo constituyen 1200 cósmidos derivados del plásmido pLAFR1 que poseen insertos de una longitud promedio de 20 kb. El banco tiene representado tres veces el genoma de la cepa CE3. Se usó a el pRK2073 como plásmido ayudante.

Las cepas SP850 y HB101 (pRK2073) se cultivaron durante una noche en 5 ml de LB. Posteriormente se plaquearon conjuntamente 100 µl de cada uno de estos cultivos en placas de LB sin antibiótico. Las 1200 colonias que conforman el banco genómico se replicaron en estas placas y se incubaron a 37°C durante una noche. Las transconjugantes se seleccionaron en placas de medio mínimo M9 suplementado con lactosa como única fuente de carbono y los antibióticos Km y Tc.

### **Preparación de células competentes por Cloruro de Calcio**

Las cepas de interés se crecieron en 10 ml de LB en agitación a 37°C durante una noche. Posteriormente, 1 ml de cada cultivo se inoculó en 100 ml de LB y se creció en agitación a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.4 leída a 540 nm (D.O. 540 nm). El cultivo se centrifugó durante 5 minutos a 10,000 rpm en un rotor Beckman tipo JA-14, en seguida, las células se resuspendieron en 50 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M frío y se mantuvieron en hielo por 30 minutos. Posteriormente, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 10,000 rpm y se resuspendieron en 8.7 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M frío y 1.3 ml de glicerol al 100 %. Se alícuotó 200 µl de células y se mantuvieron en congelación a -70°C (Modificado de: Maniatis *et al.*, 1989).

### **Transformación de células competentes**

A 200 µl de células competentes, previamente descongeladas, se les agregó entre 100 y 200 ng del ADN plasmídico de interés, en seguida, se incubaron en hielo por 30 minutos y posteriormente se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 2 minutos. Se adicionó 1 ml de LB y se mantuvo en agitación a 37°C durante 1 hora. Posteriormente se plaqueó 200 µl de la mezcla de transformación en placas de LB con el antibiótico adecuado y se incubó a 37°C hasta obtener las colonias transformantes (Modificado de: Maniatis *et al.*, 1989 ).

### **Purificación de ADN genómico**

Se partió de un cultivo en fase logarítmica (14 hrs) de la cepa de interés, posteriormente se centrifugó el cultivo en tubos Eppendorf, durante 30 segundos y se descartó el sobrenadante. Las pastillas se resuspendieron en 1 ml de TE (Apéndice 6) y se centrifugó por 30 segundos y se descartó el sobrenadante. Las pastillas se resuspendieron en 0.4 ml de TE y se les agregó 0.4 ml de una solución

de RNAasa de 10mg/ml. En seguida se agrego 50 µl de SDS 10% y 50 µl de proteinasa K 2.5 mg/ml. La mezcla se incubó a 37°C durante 1 hr. El lisado claro resultante se pasó 3 veces a través de una jeringa insulínica. Se añadió 400 µl de fenol saturado y 400 µl de cloroformo, se agitó con ayuda del vortex durante 12 segundos y se centrifugó por 10 minutos a velocidad máxima. Se realizaron tres extracciones de la fase acuosa con 400 µl de fenol saturado y 400 µl de cloroformo. Después, la fase acuosa se extrajo con 2 volúmenes de cloroformo. A la fase acuosa se le agregó 1/10 del volumen de acetato de potasio 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Finalmente, la pastilla de ácidos nucleicos se secó utilizando una bomba de vacío y se disolvió en 500 µl de agua (Modificado de: Maniatis et al., 1989).

#### **Purificación de ADN plasmídico**

La purificación de plásmidos se realizó por el método de lisis alcalina, de la siguiente manera: se partió de un cultivo saturado de la cepa que porta el plásmido de interés, se transfirió 1.5 ml del cultivo a un tubo Eppendorf y se centrifugó a máxima velocidad durante 20 segundos, en seguida, se decantó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 0.5 ml de Buffer TE (50:20) (Apéndice 6), después se centrifugó a máxima velocidad durante 20 segundos y nuevamente se decantó el sobrenadante. La pastilla celular se resuspendió en 100 µl de la solución I (Apéndice 7) y después se le agregó 200 µl de la solución II (Apéndice 8). La mezcla se incubó en hielo durante 5 minutos y después se agregó 150 µl de la solución III (Apéndice 9), de nuevo se incubó en hielo durante 5 minutos. La mezcla se centrifugó a velocidad máxima por 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf. Al sobrenadante se le añadió 400 µl de fenol saturado y 400 µl de cloroformo, se agitó con ayuda del vortex durante 12 segundos y se centrifugó por 10 minutos a velocidad máxima. Con la fase acuosa se repitió la operación anterior. A la fase acuosa se le adicionó 1 ml de etanol absoluto y se mezcló agitando por inversión, posteriormente, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, en seguida, se centrifugó durante 10 minutos a velocidad máxima. Se desechó el sobrenadante y a la pastilla se le agregó 0.5 ml de etanol al 70 %, se agitó brevemente con ayuda del vortex y se centrifugó a velocidad máxima durante 5 minutos, después se desechó el sobrenadante. Finalmente, la pastilla de ácidos nucleicos se secó utilizando una bomba de vacío y se disolvió en 40 µl de agua (Modificado de: Maniatis et al., 1989).

#### **Experimentos de subclonación**

En la clonación de los distintos fragmentos de ADN se utilizó el vehículo pBluescriptISK(+) (pSK). Este plásmido de 2961 pares de bases (pb) contiene el gen de la β-lactamasa, que confiere resistencia a carbenicilina, posee tanto el origen de replicación fl del fago M13 como el origen colE1 que le permite replicarse en *E. coli*. Dado que el pSK contiene parte de *lacZ*, incluyendo su promotor, posibilita el tipo



de complementación  $\alpha$  en aquellas cepas de *E. coli* que poseen una mutación particular denominada *lacZ* $\Delta$ M15. En las cepas de este tipo que portan el pSK el fenotipo *lac*<sup>+</sup> se identifica fácilmente ya que forman colonias azules en placas de LB con IPTG y X-gal (substrato cromogénico). Debido a que el sitio múltiple de clonación se ubica dentro de *lacZ*, la inserción de fragmentos de ADN extraño en esta región resulta en la pérdida de la  $\alpha$ -complementación. Las bacterias portadoras de estos plásmidos recombinantes producen colonias blancas en placas de LB X-gal e IPTG.

La clonación de los fragmentos de ADN se realizó de la siguiente manera: 1) Inicialmente se digirieron con la misma enzima de restricción, o con enzimas compatibles, el ADN del vehículo y de la clona que contiene los fragmentos de interés. Usualmente 1  $\mu$ g de ADN se digería con 5 unidades de enzima en un volumen final de 20  $\mu$ l durante 4 horas. Cuando se realizaron digestiones parciales generalmente se digirió por separado 1  $\mu$ g de ADN con 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, y 1 unidad de enzima durante 10 minutos, posteriormente, deteníamos la reacción inactivando la enzima a 70°C por 15 minutos. Las digestiones se analizaron en corrimientos electroforéticos en geles de agarosa al 1 % TAE (Buffer Tris-Acetato-EDTA) (Apéndice 10). Cuando fue necesario, los fragmentos de ADN de interés se purificaron directamente del gel empleando el kit "DNA Purification System" de Promega. 2) Posteriormente, ambas digestiones se ligaron en reacciones de 50  $\mu$ l, usando una unidad de enzima ligasa de ADN T4. Usualmente, las concentraciones de ADN del vector y del inserto fueron de 100 y 500 ng, respectivamente. Las condiciones para las reacciones de digestión y de ligación dependieron de las especificaciones que recomiendan los fabricantes de las enzimas. Generalmente, las reacciones de ligasa se precipitaron con 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto, en seguida, el ADN precipitado se lavó con etanol al 70 % y se secó empleando una bomba de vacío. El ADN se resuspendió en 10  $\mu$ l de agua y se tomó parte para transformar la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*. Se seleccionaron en estos casos colonias blancas que crecieron en placas de LB Cb, X-gal e IPTG. A estas colonias se les extrajo el ADN plasmídico y se analizó su patrón de restricción con la enzima correspondiente.

### Ensayos de hibridación

Los filtros de nitrocelulosa se prepararon rutinariamente de acuerdo al protocolo descrito por Maniatis y colaboradores (1982). Para el marcaje radioactivo (dCTP,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P) de la sonda se empleó el kit "Megaprime DNA Labelling system" de Amersham. Los fragmentos de ADN empleados como sondas se purificaron utilizando el kit "DNA Purification System" de Promega. Se hibridó durante una noche a 65°C con el buffer "Rapid-Hyb" (Amersham) y posteriormente se lavaron los filtros a 65°C con una solución salina citratos (SSC) al 0.1 X (Apéndice 11) y SDS al 1 %. Las placas autoradiográficas se expusieron por 12 horas antes de revelar.

### **Determinación de proteína**

La concentración de proteína total en los cultivos se determinó por el método de Lowry y colaboradores (1951), usando albúmina sérica bovina como estándar.

### **Dinámicas de crecimiento**

Las cepas se crecieron durante una noche en 100 ml de LB con los antibióticos correspondientes. Los cultivos se centrifugaron por 10 minutos a 10,000 rpm en un rotor Beckman tipo JA-14, posteriormente se lavaron las células un par de ocasiones, con solución salina estéril, para eliminar el medio rico restante. En seguida, las células se resuspendieron en 10 ml de solución salina estéril y se cuantificó la D.O.  $540\text{ nm}$  de una dilución 1:10 del concentrado celular. Los medios para realizar las dinámicas de crecimiento se inocularon a una D. O. inicial de 0.05.

El volumen de cultivo requerido para inocular se calcula con la siguiente fórmula: volumen requerido =  $((0.05)(0.1)/D.O.) \times 100$ , donde:

0.05 = D. O. a la que se desea inocular.

0.1 = volumen expresado en ml que se tomo para medir la D.O. del cultivo concentrado.

D.O. = densidad óptica a la que se encuentra el cultivo concentrado.

100 = volumen expresado en ml del medio a inocular.

Una vez inoculados los medios deseados se procedió a tomar una muestra de 1 ml y se cuantificó la D. O. inicial. A distintos intervalos de tiempo se tomaron muestras de 1 ml de los cultivos y se cuantificó su D. O.

### **Cuantificación del AMPc**

El AMPc total acumulado por las distintas cepas se cuantificó utilizando el Kit "Cyclic AMP [ $^3\text{H}$ ] assay system" (Amersham) que se basa en el ensayo radioinmunológico descrito por Steiner y colaboradores (1969). En este método, moléculas de AMPc radioactivo (en una concentración fija) y no radioactivo se unen competitivamente a una proteína que tiene gran afinidad y especificidad por el nucleótido. La cantidad del complejo formado por la proteína y el AMPc radioactivo es inversamente proporcional a la cantidad de AMPc no radioactivo del ensayo en la muestra problema. De tal manera que cuantificando la radioactividad secuestrada por la proteína es posible calcular la cantidad de AMPc de la muestra.

Cada cepa fue precrecida en LB durante una noche, y posteriormente se inoculó, a una D. O.  $540\text{ nm}$  de 0.05, en medio fresco M9-lactosa adicionado con casaminoácidos al 0.1 %. Los cultivos se crecieron en agitación constante hasta alcanzar una D. O.  $540\text{ nm}$  de 0.7, en seguida se cosecharon 10 ml y se mantuvieron en agua hirviendo por 10 minutos. Las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 5,000 rpm para remover restos celulares, posteriormente, se liofilizaron 2 ml del

sobrenadante. Cada muestra se resuspendió en 200  $\mu$ l de buffer del ensayo (Apéndice 12) y se procedió a cuantificar la concentración de AMPc de acuerdo con el protocolo del kit.

#### **Secuenciación y análisis del ADN**

Distintas delecciones de los fragmentos de ADN a secuenciar se subclonaron en el vehículo pSK. La secuencia nucleotídica se determinó en ambas cadenas, utilizando el secuenciador automático 373A de Applied Biosystems y el kit de secuencia "Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" de Perkin Elmer. La secuencia se generó a partir de los primeros universales del pSK y de primeros diseñados en base a la secuencia obtenida. Para el diseño de primeros se empleó el programa Oligo versión 4. En el análisis de las secuencias de ADN empleamos los programas de GCG versión 8.1 (Genetics Computer Group) y el paquete computacional GeneWorks versión 7.5 IntelliGenetics.

## RESULTADOS

### **Aislamiento e identificación de fragmentos de ADN de *R. etli* que complementan una cepa mutante *cya*<sup>-</sup> de *E. coli***

La estrategia empleada para identificar los genes *cya* de *R. etli* consistió en complementar la cepa mutante de *E. coli* SP850 (*cya*<sup>-</sup>) con cósmidos provenientes del banco genómico de la cepa CE3 de *R. etli*. Esta mutante no puede crecer en fuentes de carbono alternativas como la lactosa debido a que la expresión del operón *lac*, requerido para su utilización, está bajo el control positivo del complejo AMPc-CRP. Mediante una cruz triparental se introdujeron los 1200 cósmidos del banco en la cepa de *E. coli* SP850 y se seleccionaron cepas capaces de crecer en lactosa. De esta forma se identificaron cuatro cósmidos que complementan el crecimiento de la mutante en lactosa, a los cuales denominamos pTS934, pTS933, pTS1179 y pTS1190.

### **Caracterización de las cepas *cya*<sup>-</sup> complementadas**

Debido a que la mutación en el gen *cya* tiene un efecto pleotrópico en *E. coli* y con la finalidad de determinar si las cepas complementantes portan genes homólogos para la AC de *R. etli*, se analizaron distintos fenotipos cuya dependencia por el complejo AMPc-CRP ha sido ampliamente documentada. Los fenotipos examinados fueron: 1) El crecimiento en distintas fuentes de carbono utilizando placas de medio mínimo M9; 2) Fermentación de azúcares en placas de agar MacConkey; 3) Sensibilidad a la fosfomicina; 4) Sensibilidad a una mezcla de aminoácidos que inhiben el crecimiento de *E. coli*; y 5) Motilidad.

#### **1) Crecimiento en distintas fuentes de carbono**

Como se ha mencionado anteriormente, en *E. coli* el catabolismo de fuentes de carbono alternativas como la lactosa, maltosa, galactosa, etc., dependen del complejo AMPc-CRP. Por esta razón se examinó la capacidad de las cepas mutantes *cya*<sup>-</sup> complementadas para crecer en placas de medio mínimo M9 suplementado con lactosa y maltosa como únicas fuentes de carbono. Las cuatro cepas complementadas crecieron en el medio con lactosa y sólo las mutantes que portan los cósmidos pTS933 y pTS1190 crecieron en el medio con maltosa (Tabla 5).

#### **2) Fermentación de azúcares en placas de agar MacConkey**

Se examinó la fermentación de distintos azúcares en placas de agar MacConkey. El agar MacConkey es un medio rico que contiene el colorante rojo neutro y carece de un azúcar particular. Tal colorante funciona en bacterias como un indicador de la fermentación de azúcares, debido a que vira de color en respuesta a la acidez del medio, generada por productos de la fermentación. Con este medio es posible monitorear cualitativamente la capacidad de una cepa para fermentar un azúcar en particular. Las bacterias capaces de utilizar la fuente de carbono suplementada se tornan rojas en contraste con aquellas que no lo logran que se mantienen doradas. El agar MacConkey se suplementó con los siguientes azúcares:

lactosa, maltosa, galactosa, arabinosa y xilosa. Las cuatro cepas complementadas fermentaron lactosa y únicamente las cepas que tienen los cósmidos pTS933 y pTS1190 fermentaron maltosa y galactosa. Ninguna de las cepas fermentó arabinosa, ni xilosa (Tabla 5).

### 2) Sensibilidad a fosfomicina

Antibióticos como la fosfomicina o el ácido nalidíxico se introducen a *E. coli* por mecanismos de transporte propios de fuentes de carbono (Alper y Ames, 1978). La fosfomicina inhibe la síntesis de pared celular y se transporta a la célula a través de sistemas que normalmente transportan L- $\alpha$ -glicerolfosfato y hexosas fosfato, ambos regulados positivamente por el complejo AMPc-CRP (Koch et al., 1964; Winkler et al., 1970). Consecuentemente, las mutantes de *E. coli cya*<sup>-</sup> son resistentes al antibiótico en bajas concentraciones. La sensibilidad a la fosfomicina de las cepas mutantes complementadas se examinó en placas de agar MacConkey adicionado con lactosa y el antibiótico a una concentración final de 25  $\mu$ g/ml. Las cepas complementadas fueron sensibles a la fosfomicina, mientras que la cepa mutante fue resistente (Tabla 5).

### 3) Sensibilidad a serina

Uzan y Danchin (1976) observaron que el crecimiento de *E. coli* se inhibe en presencia de concentraciones elevadas de serina y que el mismo efecto se incrementa cuando se confronta a *E. coli* con una mezcla de aminoácidos que incluye: serina, metionina, leucina y glicina. El efecto preciso de la serina en el crecimiento de *E. coli* no se ha aclarado del todo. Uzan y Danchin proponen que existe alguna interrelación entre las rutas metabólicas que sintetizan los distintos aminoácidos. En este sentido, la serina podría desbalancear la síntesis de aminoácidos de cadenas ramificadas (i. e. isoleucina, valina, etc.), provocando la auxotrofia de alguno de estos aminoácidos. Daniel y Danchin (1979) sugieren que el complejo AMPc-CRP participa en la respuesta de *E. coli* hacia la serina. Observan que mutantes *cya*<sup>-</sup> o *crp*<sup>-</sup> son resistentes a la inhibición del crecimiento por serina. Demuestran que el complejo regula positivamente la expresión de la acetolactato sintasa y que mutantes *cya*<sup>-</sup> o *crp*<sup>-</sup>, que no presentan esta actividad, acumulan el 2-cetobutirato precursor de la isoleucina. La sensibilidad a la serina de las cepas *cya*<sup>-</sup> complementadas se examinó en placas de medio mínimo M9 adicionado con glucosa, como única fuente de carbono y una mezcla de los siguientes aminoácidos: serina, metionina, glicina y leucina. El crecimiento de las cepas complementadas se inhibió por la serina (Tabla 5).

### 4) Motilidad

En bacterias entéricas el complejo AMPc-CRP regula la expresión del operón *flaAB*, que codifica para proteínas estructurales del flagelo. Por esta razón, cepas de *E. coli cya*<sup>-</sup> o *crp*<sup>-</sup> no son móviles. La motilidad de las cepas complementadas se examinó en placas de agar suave (Apéndice 13). Todas las cepas complementadas fueron móviles, mientras que la mutante permaneció inmóvil (Tabla 5).

Tabla 5: Complementación de la cepa mutante *cya*<sup>-</sup> de *E. coli*

Cepas	Medios empleados										
	Lactosa		Agar MacConkey				M9		Fosfomicina	Serina	Motilidad
	Lactosa	Maltosa	Galactosa	Arabinosa	Xilosa	Maltosa	Lactosa				
SP850	D	D	D	D	D	-	-	+	+	-	
SP850/pLAFRI	D	D	D	D	D	-	-	+	+	-	
SP850/pTS933	R	R	R	D	D	+	-	-	-	+	
SP850/pTS934	R	D	D	D	D	-	+	-	-	+	
SP850/pTS1179	R	D	D	D	D	-	-	-	-	+	
SP850/pTS1190	R	R	R	D	D	+	+	-	-	+	
SP850/pSK	D	D	D	D	D	-	-	+	+	-	
SP850/p33.10	R	D	D	D	D	-	+	-	-	+	
SP850/pE2	R	R	R	D	D	+	-	-	-	+	
SP850/pX6	R	D	D	D	D	-	+	-	-	+	

D colonias doradas, R colonias rojas, + crecimiento, - no crecimiento

Las cepas fueron crecidas en placas de M9 y agar MacConkey adicionando las fuentes de carbono listadas a una concentración final de 0.2% (M9) y 1% (agar MacConkey).

La sensibilidad a la fosfomicina se examinó en placas de agar MacConkey adicionado con lactosa al 1% y 25 mg por litro del antibiótico.

El efecto de la serina fue examinado en placas de M9 adicionado con glucosa y una mezcla de distintos aminoácidos (serina, metionina, glicina y leucina) a una concentración final de 1mM.

La motilidad fue examinada en placas de agar suave.

#### Análisis de los cósmidos complementantes.

Debido a que los distintos cósmidos presentan diferentes capacidades para complementar a las cepa mutante y con la finalidad de establecer si existe similitud entre ellos, analizamos el perfil de restricción de las cuatro clonas con distintas endonucleasas. Los cuatro cósmidos presentan patrones de restricción distintos con diferentes nucleasas, no obstante, con algunas enzimas presentan fragmentos comunes de diferentes pesos moleculares. Tal es el caso del perfil de restricción obtenido con la enzima *EcoRI*, en el cual, los cósmidos pTS933, pTS1179 y pTS1190 tienen en común un fragmento de 1.1 kb, mientras que los cósmidos pTS1179 y pTS1190 comparten al menos dos fragmentos más, de 1.7, y 2.6 kb. El plásmido pTS934 posee en común con el plásmido pTS1190 fragmentos de 1.5, 2.2, y 10 kb. Por su parte, los plásmidos pTS933 y pTS1190 presentan fragmentos comunes de 1.2 y 2.1 kb.

Para determinar si los cósmidos aislados son distintos o si realmente comparten fragmentos *EcoRI* que podrían corresponder a la misma zona genómica, se realizaron hibridaciones cruzadas, utilizando como sonda a cada uno de los cósmidos e hibridando contra el resto de ellos y contra el genoma total de *R. etli* C.E3. Al emplear como sonda al cósmido pTS934 encontramos que éste no hibrida con el resto de los cósmidos. Lo mismo ocurre cuando utilizamos al cósmido pTS1179 como sonda. Sin embargo, cuando utilizamos como sonda al cósmido pTS933 o al pTS1190, observamos que ambos cósmidos comparten dos fragmentos

*EcoRI* de 2.1 y 1.2 kb (Figura 3). Por lo que suponemos que los cósmidos pTS933 y pTS1190, aparentemente sobrelapados, son distintos a los cósmidos pTS1179 y pTS934. De tal modo que podríamos hablar de tres grupos de complementación distintos. Así también podríamos afirmar por estos experimentos que los distintos cósmidos se encuentran representados en el genoma de la cepa CE3 de *R. etli*.

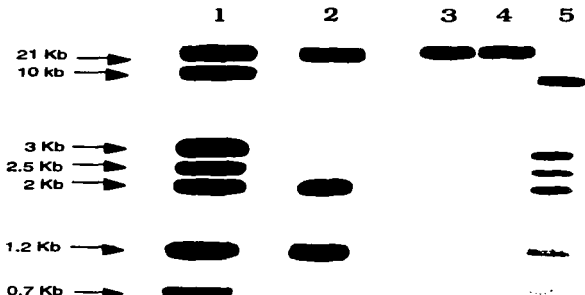


Figura 3: La digestión *EcoRI* del cósmido pTS933 fue hibridado contra sí misma (carril 1), contra las digestiones *EcoRI* de los cósmidos pTS1190, pTS934, y pTS1179 (carriles 2, 3 y 4, respectivamente) y contra la digestión *EcoRI* del genoma total de la cepa CE3 de *R. etli* (carril 5). La señal de 21 kb que comparten los cuatro cósmidos corresponde al vector.

**Delimitación del fragmento responsables de complementar a la mutante *cyo*<sup>-</sup> de *E. coli*, apartir de los cósmidos pTS934, pTS933, pTS1179 y pTS1190**

La delimitación de los genes contenidos en los distintos cósmidos que complementan a la mutante de *E. coli cyo*<sup>-</sup>, y que potencialmente codifican para las AC de *R. etli*, se realizó complementando la misma mutante con subclonas derivadas de los cósmidos aislados.

**A) Obtención del plásmido p33.10 a partir del cósmido pTS934**

En el caso del cósmido pTS934, inicialmente se subclonaron todos los fragmentos de ADN de la digestión con *EcoRI* en el vector pSK; en seguida, se examinó la capacidad de las cepas *cyo*<sup>-</sup> transformadas con las distintas clonas, para crecer en lactosa como única fuente de carbono. La cepa *cyo*<sup>-</sup> que porta la clona llamada pE10 logró crecer en lactosa, esta clona contiene un fragmento de ADN de aproximadamente 10 kb. Posteriormente se realizaron digestiones parciales

de la clona pE10 con la enzima *Sall* y se religaron en el mismo vehículo para obtener clonas derivadas que perdieran algún fragmento *Sall*, con tal reacción se transformó la cepa *cya*<sup>-</sup>. Las colonias que poseen plásmidos que conservan el fragmento de ADN que le permite a la cepa *cya*<sup>-</sup> utilizar lactosa son azules en placas de M9 lactosa, peptona de caseína y X-gal; mientras que aquellas colonias que poseen plásmidos que perdieron tal fragmento son totalmente blancas. Se extrajó ADN plasmídico de 5 colonias azules y 5 colonias blancas. El patrón de restricción con *Sall* de los plásmidos que portan las colonias azules presentan en común un fragmento de aproximadamente 3 kb; éste fragmento no se encuentra en ninguno de los plásmidos que portan las colonias blancas. El fragmento *Sall* de 3 kb se subclonó en el vehículo pSK para formar la clona p33.10. Con esta clona se transformó la cepa *cya*<sup>-</sup> y las bacterias transformantes fueron azules en placas de medio mínimo M9 lactosa, peptona de caseína y Xgal. En resumen, la clona p33.10 le confiere a la cepa mutante de *E. coli cya*<sup>-</sup> la capacidad de utilizar lactosa.

**B) Obtención del plásmido pE2 a partir del cósmido pTS933**

Los fragmentos obtenidos de la digestión *EcoRI* del cósmido pTS933 se subclonaron en el vehículo pSK. Las clonas resultantes se usaron para transformar la mutante *cya*<sup>-</sup>, posteriormente se examinó la capacidad de las transformantes para fermentar lactosa en placas de agar MacConkey. Únicamente la clona llamada pE2, que porta un inserto *EcoRI* de 2.1 kb, le permitió a la mutante fermentar lactosa.

**C) Obtención del plásmido p193 a partir del cósmido pTS1190**

El fragmento *EcoRI* de 2.1 kb, procedente del cósmido pTS1190, se clonó en el vector pSK generando la clona p193. Esta clona se empleó para transformar la mutante *cya*<sup>-</sup>. Las transformantes crecidas en placas de agar MacConkey-lactosa fueron capaces de fermentar el azúcar. Por los datos de hibridación de los cósmidos y el perfil de restricción de las clonas pE2 y p193, suponemos que este fragmento *EcoRI*, responsable del fenotipo *lac*<sup>+</sup> en la mutante, corresponde a la misma zona genómica compartida por los plásmidos pTS1190 y pTS933.

**D) Obtención del plásmido pXS3.7 a partir del cósmido pTS1179**

Los fragmentos obtenidos de la digestión *XhoI* del cósmido pTS1179 se ligaron al vehículo pSK. Con esta reacción se transformó la mutante *cya*<sup>-</sup>. Las colonias transformantes se crecieron en placas de agar MacConkey-lactosa, para posteriormente seleccionar 5 colonias doradas y 5 colonias rojas. A estas colonias se les extrajó el ADN plasmídico y se analizó su perfil de restricción con *XhoI*. Las colonias doradas poseían plásmidos con distintos fragmentos, mientras que las colonias rojas contenían plásmidos idénticos, constituidos de un único fragmento *XhoI* de 6.7 kb. Esta clona, llamada pX6, se digirió con *SmaI* y se religó en el mismo vehículo generando la clona pXS3.7, la cual conserva un fragmento *SmaI-XhoI* de 3.7 kb que le confiere a la mutante la capacidad de fermentar lactosa.



#### Análisis de los plásmidos pE2, p33.10, y pSX3.7

Con la finalidad de determinar si las distintas clonas delimitadas a partir de los cósmidos complementantes presentan alguna homología entre sí, se realizó una hibridación en condiciones estrictas utilizando como sonda a la clona pE2, e hibridando contra el resto de las clonas y contra el genoma total de *R. etli* CE3. En la figura 4 observamos que el fragmento E2 no presenta homología con ninguna de las clonas. Estos resultados coinciden con los experimentos de hibridación de los cósmidos, por lo que podemos afirmar que a partir del genoma total de *R. etli* CE3 hemos delimitado tres fragmentos distintos de ADN que complementan una cepa *cyd*<sup>-</sup> de *E. coli*.

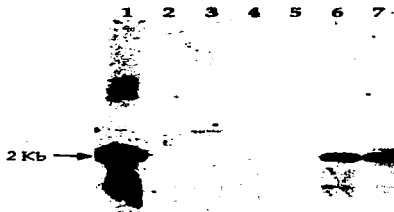


Figura 4: El fragmento E2 fue hibridado contra sí mismo (carril 1), contra las clonas p10, p33.10, pX6, pXS3.7 y pTS933 (carriles 2 al 6, respectivamente) y contra una digestión *EcoRI* del genoma total de la cepa CE3 de *Rhizobium etli* (carril 7).

#### Caracterización de las cepas mutantes complementadas con los plásmidos pE2, p33.10 y pX63.7

Las cepas mutantes *cyd*<sup>-</sup> de *E. coli* complementadas con los plásmidos pE2, pX6, y p33.10 se caracterizaron bajo los criterios ya descritos, es decir, se analizaron distintos fenotipos que dependen del complejo AMPc-CRP. Las cepas complementadas con las clonas pE2, pX6, y p33.10 crecieron en placas de medio mínimo M9 suplementadas con lactosa, mientras que en placas de medio mínimo M9 suplementadas con maltosa sólo la cepa que porta la clona pE2 fue capaz de crecer (Tabla 5). En placas de agar MacConkey las cepas complementadas con las distintas clonas fermentaron lactosa mientras que la cepa portadora de la clona pE2 fermentó maltosa y galactosa. Ninguna de las cepas fermentó arabinosa ni

xilosa (Tabla 5). Las cepas complementadas, a diferencia de la cepa mutante, fueron sensibles a la fosfomicina (Tabla 5). Concentraciones elevadas de la mezcla de distintos aminoácidos no tienen efecto en el crecimiento de la cepa mutante, pero inhiben el crecimiento de las cepas complementadas (Tabla 5). Finalmente, en placas de agar suave las cepas complementadas fueron móviles, no así la mutante (Tabla 5).

#### **Dinámica de crecimiento de las cepas complementadas**

Se realizaron dinámicas de crecimiento de las cepas complementadas con los plásmidos pE2, p33.10 y pX6 en medio mínimo M9 adicionado con lactosa, maltosa o galactosa como únicas fuentes de carbono. Se tomaron registros del crecimiento en los siguientes intervalos de tiempo: primer muestra a las 3 hrs, segunda muestra a las 6 hrs, tercer muestra a las 12 hrs y cuarta muestra a las 24 hrs de iniciada la dinámica de crecimiento. Debido a que no contamos con la cepa de *E. coli* silvestre isogénica, empleamos como control positivo a la mutante *cya<sup>-</sup>* crecida en presencia de 1 mM de AMPc.

La figura 5 muestra las dinámicas de crecimiento de la cepa mutante y de las cepas complementadas crecidas en medio mínimo M9 adicionado con lactosa, maltosa y galactosa como únicas fuentes de carbono. En medio mínimo lactosa la cepa mutante es incapaz de crecer mientras que el resto de las cepas alcanzan densidades ópticas cercanas a 1 en 24 horas. Particularmente la cepa que porta el plásmido pE2 crece tan bien como la mutante en presencia de AMPc. Ambas cepas después de 12 horas de crecimiento alcanzan una D.O. de 1.0, mientras que las cepas complementadas con las clonas p33.10 y pX6 en 12 horas alcanza una D.O. aproximada de 0.3 y 0.2, respectivamente. Después de 24 horas de crecimiento, el rendimiento final de las cepas complementadas y de la cepa mutante crecida en presencia de AMPc es 10 veces mayor al rendimiento que alcanza la cepa mutante *cya<sup>-</sup>*. En medio mínimo maltosa la cepa complementada con la clona pE2 y la mutante crecida en presencia de AMPc logran crecer, mientras que las cepas complementadas con las clonas p33.10 y pX6, al igual que la cepa mutante, son incapaces de crecer en este medio. El crecimiento de la cepa complementada con la clona pE2 presenta una fase lag que se prolonga al menos doce horas; a partir de este punto aparentemente inicia su crecimiento exponencial, alcanzando después de 24 horas densidades ópticas similares a las alcanzadas por la cepa mutante crecida en presencia de AMPc. En el caso del crecimiento en medio mínimo galactosa, nuevamente la cepa que porta la clona pE2 crece tan eficientemente como la cepa mutante en presencia de AMPc, a 12 horas de iniciada la dinámica la cepa complementada alcanza una D. O. de 0.4, mientras que la cepa mutante complementada con AMPc ha crecido a una D. O. de 0.5, finalmente a las 24 horas ambas cepas presentan densidades ópticas cercanas a 1. Por su parte, tanto la cepa mutante como las cepas complementadas con las clonas p33.10 y pX6 no logran crecer en este medio aún después de 24 horas.

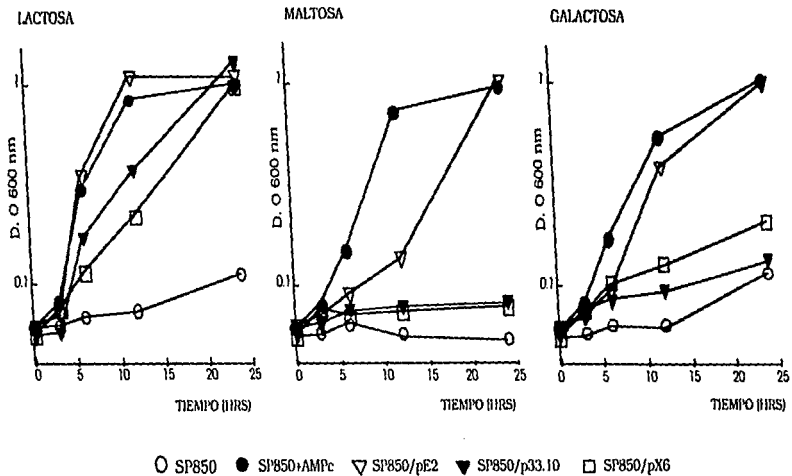


Figura 5: Curvas de crecimiento de la cepa de *E. coli cya<sup>-</sup>* y de las cepas complementadas crecidas en medio mínimo M9 adicionado con distintas fuentes de carbono.

### Complementación de una cepa mutante *crp* de *E. coli*.

En 1990 de Crecy-Lagard y colaboradores describen una proteína de *Xanthomonas campestris*, llamada CLP (por su parecido con la proteína CRP), involucrada con la patogenicidad de esta bacteria. Tal proteína complementa parcialmente el fenotipo pleiotrópico de una cepa doble mutante de *E. coli cya*<sup>-</sup> *crp*<sup>-</sup>, debido a que funciona como un activador transcripcional que no requiere de AMPc para activar la transcripción de algunos operones dependientes del complejo AMPc-CRP en *E. coli*. Con finalidad de establecer si las clonas de *R. etli* codifican una proteína similar a la CLP de *X. campestris*, introdujimos los plásmidos pE2, pX6 y p33.10 en la cepa de *E. coli* CA8445-1 (*crp*<sup>-</sup>). Ninguna de las clonas complemento a la cepa mutante.

#### Cuantificación de los niveles de AMPc en las cepas complementadas

Se cuantificaron los niveles totales de AMPc en las cepas mutantes complementadas con los plásmidos pE2, pX6 y p33.10. Se midieron las pozas de AMPc de crecimientos en fase exponencial en medio mínimo M9 suplementado con lactosa y casaminoácidos. Debido a que la cepa *cya*<sup>-</sup> no puede utilizar lactosa como fuente de carbono, adicionamos casaminoácidos para sustentar el crecimiento de la mutante. Mientras que las cepas complementadas acumularon diferentes cantidades del AMPc, en la cepa mutante no se detectó el nucleótido. Ninguna de las cepas complementadas acumuló tanto AMPc como la cepa silvestre W3110. La mutante transformada con la clona pX6 presentó mayor acumulación de AMPc, 82.7 % de lo cuantificado para la cepa silvestre. Por su parte, las cepas que portan los plásmidos p33.10 y pE2 sólo acumularon el 51.6 % y 25 %, del AMPc acumulado por la cepa silvestre, respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6: Niveles de AMPc en las cepas de *E. coli cya*<sup>-</sup> complementadas

Cepas	Niveles de AMPc (pmol/mg de prot)
SP850 ( <i>cya</i> <sup>-</sup> )	ND
SP850/pE2	19.09 +/- 0.67
SP850/p33.10	38.80 +/- 4.11
SP850/pX6	62.18 +/- 11.5
W3110 (silvestre)	76.12 +/- 16.32

Cada valor es el promedio de tres experimentos independientes

ND= no detectado

#### Secuencia nucleotídica del fragmento E2 y secuencia proteica deducida

Distintas deleciones y subclonas obtenidas del plásmido pE2 fueron secuenciadas en ambas cadenas a partir de los primeros universales del vehículo pSK y de primeros internos diseñados en base a la secuencia obtenida (Figura 6).

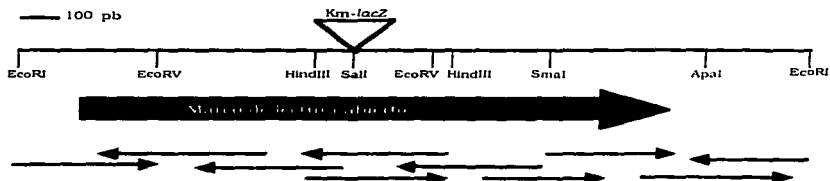


Figura 6: Mapa de restricción del fragmento E2, estrategia de secuencia y marco de lectura abierto que presenta homología con la proteína CYA2 de *R. metiloti*. Se indica el sitio de inserción del cassette Km-lacZ empleado en la generación de las mutantes de *R. etli*.

El análisis de la secuencia nucleotídica del fragmento E2 muestra un marco de lectura abierto que codifica una proteína de 354 residuos de aminoácidos que tiene una similitud del 74 % y una identidad del 54 % con el gen *cya2* de *R. metiloti*, además de presentar cuatro motivos conservados entre las adenil y guanil ciclasas de la clase III (Beuve *et al.*, 1993)(Figura 7).

A	MREISPTQNWILIVIVLAASGVVYDSMPFYSQTAVIGAIQFLGFIGMPILA	50
B	MWRWFSTLEITILLLLVAVGSGVAYAVVVVGG. GCLIGATVALFMCMPILA	49
A	FERKVLFRGLYRRIQKLPPIFFITTELG...NLRNPDEHRLWPAQCCSR	97
B	FERHIIIFRLLYRRIHSGPTPAFLSSAVYFFIVNVG...VAAAGLLLLH	95
A	AIGVLKPSLLDLVIMPFEVFLYALAVCSALNFILRVRELVGREVFSML	147
B	VAGVYRESR. TDAMPLSLNVLVALATSGPIFFVLVRELLGRDVLSL	144
A	ISRYRNFVREE [REDACTED] AEHGDLR [REDACTED] AEPVR	197
B	TQRYRKFVQEE [REDACTED] AERFGDLR [REDACTED] AEPVL	194
A	RH [REDACTED] LARGVKDARCVCRCIFDILADIDANAAGWRKN	247
B	RY [REDACTED] YDRAVADAACICVFDILEQIEADHRWQKD	244
A	YGOV [REDACTED]	297
B	YGEV [REDACTED]	294
A	QVLISAEIARRMIFPDDISCCDDI [REDACTED] SRAV....	342
B	QVLISADRLRRLRPPVFPVRAEDI [REDACTED] AGSLSGDGA	344
A	.....TVLNTPAVVVHLHG 354	
B	TEPAGETVRSPAEAPTS 362	

Figura 7: Alineamiento de la proteína CYA de *R. etli* codificada en el fragmento E2 (A) y la proteína CYA2 de *R. metiloti* (B), utilizando el programa Bestfit (GCG). Los aminoácidos idénticos están señalados con líneas (|) y los similares con dos puntos (:). Las zonas sombreadas denotan el probable sitio de unión a ATP (gris) y cuatro motivos conservados en las adenil y guanil ciclasas (negro).

### Secuencia nucleotídica del fragmento 33.10

Al igual que en el caso de la clona pE2, se generaron delecciones y subclonas del plásmido p33.10 que posteriormente fueron secuenciadas en ambas cadenas a partir de los primeros universales del vehículo pSK y de primeros diseñados en base a la secuencia obtenida (Figura 8).

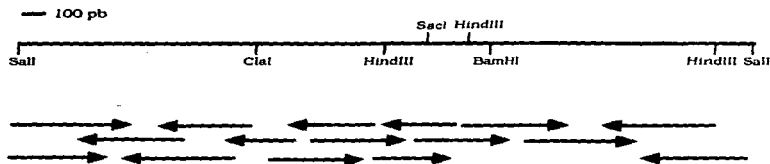


Figura 8: Mapa de restricción de la clona p33.10 y estrategia de secuencia

No obstante que la clona p33.10 se ha secuenciado en su totalidad, aún no logramos identificar un marco de lectura abierto, debido quizás a que la secuencia presenta ambigüedades que estamos depurando. Por otra parte, análisis de tipo BLAST o FASTA aún no denotan homología del fragmento 33.10 con alguna secuencia reportada en las bases de datos. Así mismo, no hemos identificado los motivos, descritos por Beuve y colaboradores (1993), que se conservan en las adenil y guanil ciclasas de la clase III. Sin embargo, en el primer marco de lectura identificamos, por medio del programa MOTIFS de GCG, un motivo de unión a ATP/GTP similar al que presentan las adenil ciclasas de la clase II.

### Generación de una cepa mutante *cya*<sup>-</sup> de *R. etli*

Con la finalidad de generar una cepa mutante *cya*<sup>-</sup> de *R. etli*, el fragmento E2 se subclonó en el vehículo movilizable pWS233 suicida en *Rhizobium* (Selbitschka et al., 1993), generando la clona pWSE2. Esta clona se utilizó para interrumpir el gen *cya* insertando, en ambos sentidos de la transcripción, un cassette Km-*lacZ* (Kokotek y Lanz, 1989), que forma fusiones transcripcionales, dando lugar a las clonas pWSE2K61 y pWSE2K62 (Figura 9 y 6). Dichas inserciones abaten la capacidad de esta clona para complementar a la mutante de *E. coli*. Ambas construcciones se emplearon en la obtención de las respectivas cepas mutantes (CON18 y CON22) *cya*<sup>-</sup> de *R. etli*. Mediante experimentos de hibridación nos percatamos de que ambas mutantes presentan la inserción del cassette Km-*lacZ* en el fragmento E2. En la figura 10 se muestra la hibridación del fragmento E2 contra genomas totales de las cepas CE3, CON18 y CON22 digeridos con *EcoRI*.

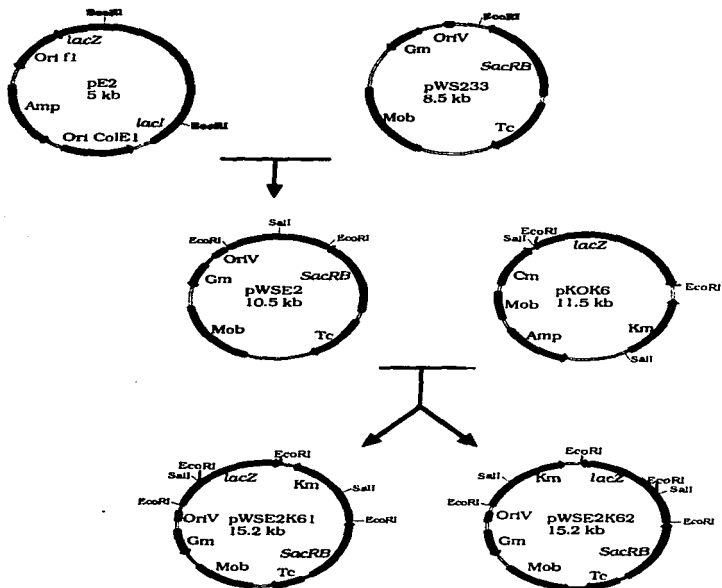


Figura 9: Construcción de los plásmidos pWSE2K61 y pWSE2K62 empleados en la generación de las cepas *cya*<sup>-</sup> de *R. etli* CON18 y CON22, respectivamente.

Fragmento E2      Cassette Km-lacZ

Ambas mutantes no presentaron diferencias con la cepa silvestre de *R. etli* CE3 en lo referente al crecimiento en distintas fuentes de carbono y nitrógeno, además de que fueron tan móviles como la cepa silvestre.

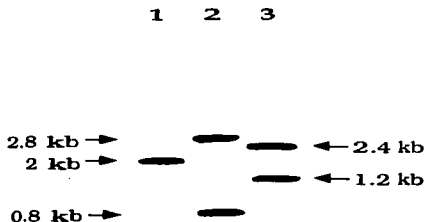


Figura 10: El fragmento E2 fue hibridado contra digestiones *EcoRI* de genomas totales de las cepas de *R. etli* CE3 (carril 1), CON18 (carril 2) y CON22 (carril 3). La señal del carril 1 corresponde al fragmento E2, mientras que las señales de los carriles 2 y 3 corresponden al fragmento E2 interrumpido con las inserciones del cassette *Km-lacZ* integrado en ambos sentidos de la transcripción. Los genomas mutantes (carril 2 y 3) presentan dos señales debido a que el cassette posee dos sitios *EcoRI* internos. Todas las señales corresponden en tamaño con los fragmentos esperados (ver figura 9).



## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En bacterias de la familia *Rhizobiaceae*, el AMPc ha sido involucrado en el control de diversos fenómenos tanto en vida libre (Upchurch y Elkan, 1978; Lim y Shanmugam, 1979) como en simbiosis (Blanchini *et al.*, 1993). Sin embargo, no se han logrado obtener cepas mutantes de *Rhizobium* deficientes en la síntesis de AMPc o CRP que permitan establecer en forma precisa el papel del nucleótido en la fisiología de estas bacterias.

Con la finalidad de obtener cepas de *Rhizobium* deficientes en la síntesis de AMPc, en el presente trabajo describimos la clonación de tres genes distintos que putativamente codifican para adenil ciclasa en *R. etli*. La estrategia empleada consistió en complementar el crecimiento de una cepa de *E. coli cya<sup>-</sup>*, incapaz de sintetizar AMPc, con cósmidos de un banco genómico de la cepa CE3 de *R. etli*. Utilizando esta estrategia logramos aislar los cósmidos pTS933, pTS934, pTS1179 y pTS1190; que le confieren a la cepa *cya<sup>-</sup>* de *E. coli* la capacidad de catabolizar lactosa, es decir, las clonas complementan el fenotipo *lac<sup>-</sup>*. Debido a que las cepas complementadas con los distintos cósmidos exhibieron fenotipos no seleccionados propios de cepas *cya<sup>+</sup>* tales como motilidad, sensibilidad a fosfomicina y a serina; descartamos la posibilidad de que estas clonas codificaran proteínas con la capacidad exclusiva de catabolizar lactosa. Así mismo, al reintroducir los cósmidos aislados en la cepa mutante constatamos que estas clonas fueron las responsables del fenotipo de complementación observado, descartando de esta forma el efecto de una segunda mutación que suprimiera la mutación inicial. Por otra parte, experimentos de hibridación evidenciaron que los cósmidos pTS933 y pTS1190 son sobrelapantes, ya que tienen en común dos fragmentos EcoRI de 2.1 y 1.2 Kb.

Mediante deleciones y subclonaciones de los cósmidos pTS933, pTS1190, pTS1179, y pTS934 se obtuvieron las clonas pE2, p193, pXS3.7 y p33.10, respectivamente, las cuales contienen las secuencias responsables de complementar a la cepa *cya<sup>-</sup>* de *E. coli*. No obstante que las clonas delimitadas se mantienen en multicopia complementaron, al igual que los cósmidos, sólo parcialmente el fenotipo pleiotropico de la mutante *cya<sup>-</sup>*.

El análisis de hibridación de las clonas delimitadas confirmó que los fragmentos E2 y 193, que representan parte de la zona genómica que comparten los cósmidos pTS933 y pTS1190, son idénticos entre sí y que no muestran homología con las clonas p33.10 y pXS3.7. El mapa de restricción de las clonas p33.10 y pXS3.7 es totalmente distinto, ratificando los resultados obtenidos en los experimentos de hibridación de los cósmidos.

Ninguna de las clonas fue capaz de complementar una mutante *crp<sup>-</sup>* de *E. coli*, excluyendo la posibilidad de que las clonas aisladas codificaran una proteína reguladora homóloga a CRP y cuya actividad sea independiente de AMPc (CRP<sup>+</sup>), como la descrita en *X. campestris* (de Crecy-Lagar *et al.*, 1990).

Las cepas complementadas con las clonas pE2, pXS3.7 y p33.10, a diferencia de la cepa mutante, fueron capaces de sintetizar y acumular AMPc en condiciones de medio mínimo M9 suplementado con lactosa y casaminoácidos. Las evidencias anteriores indican claramente que *R. etli* posee al menos tres sistemas genéticamente distintos para la síntesis de AMPc.

Se han logrado clonar los genes *cya* de *R. meliloti* (Kiely and O'Gara, 1983; Archdeacon et al.: 1995) y *B. japonicum* (Guerinot and Chelm, 1984) mediante la complementación de cepas mutantes de *E. coli* deficientes en la síntesis de AMPc. En el caso de *R. meliloti*, se han clonado dos genes distintos (*cya1* y *cya2*), ambos genes complementaron parcialmente a la mutante de *E. coli*. El gen *cya1* le confirió a la cepa complementada la capacidad para utilizar lactosa, maltosa, y manitol; no así arabinosa, xilosa, ni ribosa; mientras que el gen *cya2* le permitió a la mutante catabolizar maltosa, arabinosa, manitol, xilosa, ribosa y glicerol. Por su parte, el gen *cya* de *B. japonicum* le permite a una mutante *cya<sup>-</sup>* de *E. coli* fermentar maltosa, arabinosa, ribosa, xilosa, y manitol, fue sensible a la fosfomicina e incluso recobró parcialmente la motilidad. Al igual que en los casos anteriores, los tres genes *cya* de *R. etli* complementaron también parcialmente el fenotipo pleiotrópico de la mutante *cya<sup>-</sup>*. La razón por la que los distintos genes de *Rhizobium* descritos complementan solo parcialmente a las cepas *cya<sup>-</sup>* de *E. coli*, puede vislumbrarse desde dos puntos de vista distintos: 1) Porque los niveles de AMPc producidos por las distintas clonas no son suficientes para activar todos los operones dependientes del complejo AMPc-CRP en *E. coli*; 2) Porque las condiciones de crecimiento en las que se examinan los fenotipos de complementación interfieren en los niveles de AMPc que producen las distintas clonas en *E. coli*.

Los operones dependientes del complejo AMPc-CRP presentan en su región promotora uno o varios sitios de unión a CRP, a los cuales se une el complejo para activar su transcripción. La diferente afinidad de estos sitios por el complejo AMPc-CRP, jerarquiza la expresión de los distintos operones (Pyles and Lee., 1996). En este sentido es probable que los niveles de AMPc que producen las AC de *Rhizobium* sean bajos y que por esta razón no se activen todos los operones dependientes del complejo. Bajos niveles de AMPc podrían explicarse como resultado de: A) Un reducido nivel de expresión de los genes *cya* de *Rhizobium* en *E. coli*, dado probablemente por diferencias en los mecanismos de transcripción en ambos grupos de bacterias; B) Posiblemente las adenil ciclasas de *Rhizobium* presentan actividades disminuidas en *E. coli*, incluso podríamos pensar que tanto la expresión como la actividad de las distintas adenil ciclasas en su fondo genético original sea baja.

Guerinot and Chelm (1984) proponen que la diferencia en el espectro de complementación que presentan las cepas complementadas con los genes *cya1* de *R. meliloti* y *cya* de *B. japonicum*, se debe a que los vectores en que se ubican ambos genes se mantienen en *E. coli* en distinto número de copias. Mientras que la clona

de *R. mellotti* se encontraba clonado en un vehículo de bajo número de copias (pRK290), el gen *cya* de *B. japonicum* estaba clonado en un vector de mediano número de copias (pBR322). Por esta razón, las cepas complementadas con el gen de *B. japonicum* posiblemente producían mayores niveles de AMPc que les permitía revertir un mayor número de fenotipos que aquellas mutantes que portaban la clona de *R. mellotti*. El gen *cya2* de *R. mellotti*, clonado en un vehículo multicopia (pUC18), complementó un mayor número de fenotipos que el *cya1*. No obstante que los niveles de AMPc acumulados por las cepas complementadas con las clonas de *R. mellotti* y *B. japonicum* se cuantificaron, no es posible hacer comparaciones ya que tanto las condiciones del ensayo como las cepas complementadas son distintas.

Por otra parte, las tres clonas de *R. etli* complementaron los mismos fenotipos cuando se mantenían en un vehículo de bajo número de copias (pLAFR1) o cuando se subclonaron en un vehículo multicopia (pSK). Por lo que suponemos que el incremento en la dosis génica no tiene efecto sobre el espectro de fenotipos complementados en la mutante de *E. coli*. Excepcionalmente, al evaluar la motilidad de las distintas cepas observamos que las mutantes complementadas con las clonas delimitadas presentaban un radio de motilidad mayor comparado al que exhibieron las mutantes complementadas con los cósmidos enteros. Por lo que podríamos inferir que al menos en este fenotipo la dosis génica tuvo algún efecto.

Al cuantificar los niveles de AMPc totales en las cepas complementadas observamos que: 1) Las cepas complementadas con las clonas pE2, p33.10 y pXS3.7 acumulan diferentes concentraciones AMPc, sin embargo, ninguna acumuló tanto AMPc como la cepa silvestre; 2) La mutante que porta la clona pE2, que complementa los fenotipos *mal'* y *gal'*, acumula menos AMPc que las mutantes complementadas con las clonas p33.10 y pXS3.7, que no complementan los fenotipos *mal'* y *gal'*. Así mismo, las curvas de crecimiento muestran que en el medio suplementado con lactosa la cepa complementada con la clona pE2 crece como la mutante en presencia de AMPc; mientras que las mutantes complementadas con las clonas p33.10 y pXS3.7 presentan tiempos de duplicación mayores. ¿Por qué las cepas que portan las clonas p33.10 y pXS3.7 no complementan los fenotipos *mal'* y *gal'* de la mutante si producen mayores cantidades de AMPc que la cepa que porta la clona pE2?. Una alternativa a considerar es que posiblemente las condiciones de crecimiento y en particular las fuentes de carbono como maltosa y galactosa, regulan los niveles de AMPc producidos por las cepas complementadas con las clonas p33.10 y pXS3.7.

Debido a que las cepas complementadas con las tres clonas son mótils en placas que tiene peptona como fuente de carbono, suponemos en primer instancia que la síntesis de AMPc producida por las clonas pE2, p33.10 y pXS3.7 no depende de la fuente de carbono. Sin embargo, existe la posibilidad de que la maltosa o la galactosa repriman la síntesis de AMPc producido por las clonas p33.10 y XS3.7, sin tener efecto en los niveles de AMPc producidos por la clona pE2. En este sentido,

sería interesante elaborar dinámicas de crecimiento de las cepas complementadas con las clonas p33.10 y pXS3.7 en medios suplementados con lactosa y maltosa o con lactosa y galactosa, para observar si el crecimiento de las distintas cepas se inhibe en estas condiciones, lo que corroboraría el efecto represor de la maltosa o la galactosa en los niveles de AMPc producidos por las clonas p33.10 y pXS3.7. Esta observación sugiere que *E. coli* posee proteínas que en presencia de maltosa o galactosa reprimen la transcripción de los genes contenidos en las clonas p33.10 y pXS3.7. En *E. coli*, la presencia de maltosa en el medio es monitoreada por la proteína MalT, activador del operon *mal* (requerido para el catabolismo de maltosa), mientras que la galactosa es monitoreada por las proteínas reguladoras GalR y GalS, que regulan el catabolismo de galactosa. En este sentido, es posible que la presencia de maltosa o galactosa en el medio active a las proteínas MalT y GalR o GalS, para que éstas repriman la expresión de los genes contenidos en las clonas p33.10 y pXS3.7. Por otra parte cabría la posibilidad de que la maltosa o la galactosa, incluso algún metabolito producto del catabolismo de estos azúcares, inactiven mediante una modificación alostérica a las AC codificadas en las clonas p33.10 y pXS3.7.

Por otro lado, el hecho de que las cepas complementadas con las clonas pE2, p33.10, y pXS3.7 son móviles en placas que carecen de una fuente de carbono como lactosa, maltosa o galactosa, sugiere que los genes contenidos en las distintas clonas se expresan en *E. coli* a un cierto nivel y que esta expresión es independiente de la fuente de carbono empleada. Del mismo modo puede considerarse que no obstante que el AMPc sintetizado a partir de las clonas p33.10 y pXS3.7 es suficiente para activar la expresión del operón *flaAB*, es insuficiente para activar los operones catabólicos de maltosa y galactosa. Sin embargo, dado que los distintos genes se encuentran clonados en el vehículo pSK, es probable que en presencia de lactosa, la transcripción de las clonas p33.10 y pXS3.7 esté dirigida por el promotor del operón *lac* (*Plac*) del vehículo. Cabría mencionar que el AMPc acumulado por las distintas cepas se cuantificó en presencia de lactosa y que probablemente por esta razón los niveles de AMPc acumulados por las cepas que portan las clonas p33.10 y pXS3.7, son mayores que los niveles producidos por la cepa que porta la clona pE2. Esto explicaría porqué las cepas que portan las clonas p33.10 y pXS3.7, aún cuando producen AMPc en presencia de lactosa, no catabolizan maltosa y galactosa. Para determinar si el *Plac* está transcribiendo los genes contenidos en las clonas p33.10 y pXS3.7, podríamos reclonar los fragmentos 33.10 y XS3.7 en ambos sentidos en el pSK y posteriormente realizar dinámicas de crecimiento de las cepas complementadas con las clonas p33.10 y pXS3.7 y sus derivadas en medio mínimo suplementado con IPTG (inductor gratuito del operon *lac*) y maltosa o galactosa como únicas fuentes de carbono.

No obstante que el AMPc está involucrado en numerosos procesos celulares en *Rhizobium*, poco se conoce acerca del mecanismo que regula los niveles de AMPc en este grupo de bacterias. En *E. coli*, los niveles extracelulares de glucosa regulan las pozas de AMPc a través del PTS, sin embargo, en *Rhizobium* no se ha descrito un sistema homólogo. Incluso mediante la comparación de secuencias de la AC1 de *R. meliloti* y la AC de *E. coli*, Peterkofsky y colaboradores (1993) proponen que la ciclasa de *R. meliloti* carece de un dominio para la regulación por PTS. Por esta razón sería interesante analizar si fuentes de carbono como la galactosa y la maltosa están involucrados en regular los niveles de AMPc en *R. etli*.

La secuencia nucleotídica de la clona pE2 nos permitió identificar un marco de lectura abierto que codifica una proteína que tiene una similitud del 74% y una identidad del 54% con el gen *cya2* de *R. meliloti*. El péptido de 354 residuos de aminoácidos es ligeramente más pequeño que la AC2 de *R. meliloti*, que mide 363 residuos de aminoácidos, y a su vez, mayor que la AC1 de *R. meliloti*, que mide 193 residuos de aminoácidos. El análisis de hidrofobicidad de la AC2 de *R. meliloti* reportado por Archdeacon y colaboradores (1995) muestra que esta proteína presenta en la región amino terminal tres posibles dominios transmembranales que están conservados en la proteína codificada en la AC de *R. etli*. Tales dominios podrían estar involucrados con censar estímulos ambientales que eventualmente mediaran su actividad (Archdeacon *et al.*, 1995). En el dominio carboxilo terminal se encuentra el centro catalítico propuesto por Peterkofsky y colaboradores (1993) (Figura 8), representado por un sitio de unión a ATP, que conservan las AC1 y 2 de *R. meliloti* y la AC de *R. etli*. Beuve y colaboradores (1993) definen cuatro motivos altamente conservados en las adenil ciclasas de la clase III. Tales motivos se encuentran conservados en la AC de *R. etli* (Figura 8), por lo que podríamos afirmar que la AC de *R. etli* es un miembro de esta clase de ciclasas.

En el caso de la clona p33.10, la secuencia obtenida aún presenta ambigüedades que estamos depurando y que por el momento nos han impedido realizar un análisis concluyente. Distintos análisis de tipo BLAST o FASTA aún no indican homología del fragmento 33.10 con alguna secuencia reportada en las bases de datos. Sin embargo, por medio del programa MOTIFS de GCG, logramos identificar en el primer marco de lectura un motivo de unión a ATP/GTP, similar al que presentan las AC de la clase II, lo que podría indicar la presencia de una AC en esta clona.

La clonación de los genes *cya1* y *cya2* de *R. meliloti* permitió la generación de una cepa doble mutante *cya1<sup>-</sup>cya2<sup>-</sup>*. Esta mutante acumula AMPc en concentraciones similares a los niveles alcanzados por la cepa silvestre y demostró que los genes *cya1* y *cya2* no son esenciales para el desarrollo de *R. meliloti* en vida libre ni en simbiosis (Archdeacon *et al.*, 1995). En ese trabajo también se sugirió la existencia de un tercer locus involucrado en la síntesis de AMPc en *R. meliloti*. Al parecer la misma situación se presenta en *R. etli*, ya que la mutante *cya<sup>-</sup>* obtenida

en este trabajo, no presenta alteraciones en su crecimiento en vida libre, quedando por establecer su fenotipo en simbiosis. La identificación de tres genes *cya* de *R. etli* posibilita la obtención de cepas mutantes de *Rhizobium* deficientes totales en la síntesis de AMPc, que permitirán establecer en forma precisa el papel del AMPc en este importante grupo de bacterias.

La identificación de distintas proteínas encargadas de sintetizar AMPc en *R. mellott* y *R. etli* obliga a cuestionarse: ¿Porqué *Rhizobium* presenta tres, o quizás más, adenil ciclasas distintas?. *Rhizobium* no es el único género de bacterias que presenta más de una AC. En *Stigmatella aurantiaca* se han descrito dos genes que codifican para AC distintas que pertenecen a las ciclasas de la clase III (Danchin, 1993 A). En la cianobacteria *Spirulina platensis* se identificaron, mediante la complementación de una cepa de *E. coli cya*<sup>-</sup>, tres clones distintas que codifican para adenil ciclasas. La secuencia de una de ellas describe una proteína con las características de las ciclasas de la clase III (Yashiro *et al.*, 1996). En la cianobacteria *Anabaena sp.* cepa PCC7120 se describieron recientemente cinco AC codificadas por genes *cya* distintos. Las cinco proteínas aparentemente pertenecen a las ciclasas de la clase III (Katayama y Ohmori, 1997). No obstante, en ninguna de estas bacterias, incluyendo a *Rhizobium*, se ha logrado involucrar a las distintas AC con una función en particular. Dada la relevancia del AMPc en el control de diversos procesos celulares en *Rhizobium*, asumimos que los niveles de AMPc deben de estar rigurosamente regulados en esta bacteria. Una alternativa a este problema podría ser tener distintas AC con diferentes capacidades para sintetizar AMPc, que se activaran en condiciones de crecimiento particulares. *Rhizobium* es una bacteria que tiene la capacidad de diferenciarse a bacteroide cuando entra en simbiosis con una planta leguminosa. Este doble tipo de vida requiere de mecanismos específicos que le permitan adecuar su metabolismo a las exigencias del medio. En este sentido, no es arriesgado suponer que las distintas AC de *Rhizobium* le permiten contender y regular diferentes procesos en distintas condiciones de crecimiento. En el presente trabajo describimos la existencia de tres sistemas genéticamente distintos para la síntesis de AMPc en *R. etli*. Sin duda la generación de la cepa triple mutante nos ayudará a comprender el papel del AMPc en *Rhizobium*, además que nos permitirá definir si *R. etli* posee más de tres sistemas alternativos para sintetizar AMPc.

#### **PERSPECTIVAS**

Continuando con el desarrollo del proyecto se realizarán los siguientes experimentos:

Depurar y analizar la secuencia del fragmento 33.10.

Secuenciar el fragmento XS3.7 y realizar el análisis correspondiente.

Para determinar si existe un patrón diferencial de expresión de los genes *cya* de *R. etli*, se construirán fusiones transcripcionales en las clonas p33.10 y pSX3.7 con el reportero *lacZ*; éstas se emplearán para generar cepas mutantes *cya*<sup>-</sup> de *R. etli*. Se cuantificará la expresión de los distintos genes en diferentes condiciones de crecimiento, en distintas fuentes de carbono y nitrógeno, para definir su papel en la represión catabólica, en fase estacionaria y en la simbiosis.

Construcción de una cepa triple mutante de *R. etli*, cuantificación de sus niveles de AMPc, caracterización fisiológica y evaluación de su fenotipo simbiótico.

## REFERENCIAS

- Adhya, S. (1987) The Galactose Operon. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, Neidhardt, F. (ed). Washington, D. C.: American Society for Microbiology, pp. 1718-1725.
- Adhya, S., and S. Gargos, (1982) How the Cyclic AMP and its Receptor Protein Act in *Escherichia coli*. *Cell* 29: 287-289.
- Alba, H., Fujimoto, S., and N. Ozaki. (1982) Molecular cloning and sequencing of the gene for *E. coli* cAMP receptor protein. *Nucleic Acids Res.* 10: 1345-1361.
- Alba, H. (1983) Autoregulation of the *Escherichia coli* *crp* gene: CRP is a transcriptional repressor of its own gene. *Cell* 32: 141-149.
- Alper, M., and N. Ames. (1978) Transport of antibiotics and metabolites analogs by systems under cAMP control: positive selection of *Salmonella typhimurium* *cya* and *crp* mutants. *J. Bacteriol.* 133: 149-157.
- Anderson, W. B., Schnoider, A., Emmer, M., Perlman, R., and I. Pastan. (1971) Purification of and properties of the cyclic AMP receptor protein which mediates cyclic AMP dependent gene transcription in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 246: 5929-5937.
- Archdeacon, J., Talty, J., Boesten, B., Danchin, A., and F. O'gara. (1995) Cloning of the second adenylate cyclase gene (*cya2*) from *Rhizobium meliloti* F34: Sequence similarity to eukaryotic cyclases. *FEMS Microbiology Lett.* 128: 177-184.
- Arias, A., Gardiol, A. and G. Martínez-Drets. (1982) Transport and catabolism of D-mannose in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 151:1069-1072.
- Berg, O. G., and P. H. von Hippel. (1988) Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. The binding specificity of cAMP receptor protein to recognition sites. *J. Mol. Biol.* 200: 709-723.
- Barzu, O., and A. Danchin. (1994) Adenylyl cyclase: A heterogeneous class of ATP-utilizing enzymes. *Prog. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol.* 49: 241-483.
- Betsou, F., Sismeyro O., Danchin A., and N. Guiso. (1995) Cloning and sequence of the *Bordetella bronchiseptica* adenylate cyclase hemolysin encoding gene: comparison with the *Bordetella pertussis* gene. *Gene* 162: 165-166.
- Beuve, A., Boesten, B., Crasnier, A., Danchin, A., and F. O'gara. (1990) *Rhizobium meliloti* adenylate cyclase is related to eukaryotic adenylate cyclase and guanylate cyclase. *J. Bacteriol.* 172: 2614-2621.
- Beuve, A., and A. Danchin. (1992) From adenylate cyclase to guanylate cyclase mutational analysis of a change in substrate specificity. *J. Mol. Biol.* 225: 933-938.
- Beuve, A., Kirm, E., and A. Danchin. (1993) *Rhizobium meliloti* adenylate cyclase: probing of a NTP-binding site common to cation transporters. *Acad. Sci. Paris* 316: 553-559.
- Bianchini, G., Carricarte, V., Flawia, M., and C. Sánchez-Rivas. (1993) Isolation of adenylate cyclase mutants from *Rhizobium meliloti* deficient in nodulation. *World J. Microb. and Biotech.* 9: 168-173.
- Bivelle, F., and N. Guiso. (1985) Evidence for the presence of cAMP. cAMP protein receptor and transcription termination factor *rho* in gram negative bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 131: 2953-2960.
- Boesten, B., Kiely, B., O'Reagan, M., Danchin, A., and F. O'Gara. (1988) Genetic analysis of an adenylate cyclase gene from *Rhizobium meliloti* F34, in Proceedings of the 7th International Congress on Nitrogen Fixation (Bothe, H., de Bruijn, F. J. and Newton, W. E., eds.), p. 554. Gustav Fisher, Stuttgart, New York.



- Botsford, J. L. (1981) Cyclic nucleotides in prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 45: 620-642.
- Botsford, J. L., and J. Harman. (1992) Cyclic AMP in Prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 56: 100-122.
- Boyer, H., and D. Roulland-Dustux. (1969) A complementation analysis of restriction and modification in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472.
- Catenese, C., Emerich, D., and V. Zahler. (1989) Adenylate cyclase and cAMP phosphodiesterase in *Bradyrhizobium japonicum* bacterioids. *J. Bacteriol.* 171: 4531-4536.
- Chandler, M. S. (1992) The gene encoding the cAMP receptor protein is required for competence development in *Haemophilus influenzae* Rd. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1626-1630.
- Collado-Vides, J., Magasanik, B., and J. Gralla. (1991) Control site location transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 55: 371-394.
- Cossart, P., and B. Gicquel-Sanzey. (1982) Cloning and sequencing of the *cya* gene of *Escherichia coli* K12. *Nucleic Acids Res.* 10: 1363-1378.
- Crothers, D. and T. Steiz. (1992) Transcriptional activation by *Escherichia coli* CAP protein. In *Transcriptional Regulation*. McKnight, S. L. and Yakamoto, K. R. (eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 504-534.
- Curtis, R., and M. Kelley. (1987) *Salmonella typhimurium* deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor are avirulent and immunogenic. *Infect. Immun.* 55: 3035-3043.
- Danchin A., and Lenzen G. (1988) Structure and evolution of bacterial adenylate cyclase: comparison between *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi*. *Adv. Second Messengers Phosphoproteins* 12: 7-28.
- Danchin, A. (1993 A) Phylogeny of adenyl cyclases. *Adv. Second Messenger Phoprotein Res.* 27: 109-162.
- Danchin A., Pidoux J., Krin E., Thompson C., and A. Ullmann. (1993 B) The adenylate cyclase catalytic domain of *Streptomyces coelicolor* is carboxy-terminal. *FEMS Microbiol. Lett.* 114:145-151.
- Daniel, J., and A. Danchin. (1979) Involvement of cAMP and CRP in the Sensivity of *Escherichia coli* K12 towards Serine. *Molec. Gen. Genet.* 176: 343-350.
- de Crecy-Lagard, V., Glaser, P., Lejeune, P., Sismeiro, O., Barber, C., Daniels, M., and A. Danchin. (1990) A *Xanthomonas campestris* pv *campestris* protein similar to catabolite activation factor is involved in regulation of phytopathogenicity. *J. Bacteriol.* 172: 5877-5883.
- Dilworth, M., McKay, D., Franklin, M., and A. Glenn. (1983) Catabolite effects on enzyme induction and substrate utilization in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 129: 359-366.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., and D. Helinski. (1980) Broad host range DNA cloning system for gr.am-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium mlotilli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7347-7351.
- Dorocicz, I., Williams, M., and R. Redfield. (1993) The *Haemophilus influenzae* adenylate cyclase gene: cloning, sequence and essential role in competence. *J. Bacteriol.* 175: 7142-7149.
- Dripps, D., and R. Wartell. (1987) DNA bending induced by the catabolite activator protein allows ring formation of a 144 bp DNA. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 5: 1-13.

- Dunlap, V. (1989) Regulation of luminescence by Cyclic AMP in *cya*-like and *crp*-like Mutants of *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.* 171: 1199-1202.
- Emmer, M., de Crombrughe, I., Paastan, R., and R. Perlman. (1970) Cyclic AMP receptor protein of *E. coli*: Its role in the synthesis of inducible enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 66: 480-487.
- Escuyer V., Duflot, D., Sezer, S., Danchin, A., and M. Mock. (1988) Structural homology between virulence-associated bacterial adenylate cyclases. *Gene* 71: 293-298.
- Fried, M., and D. Crothers. (1984) Equilibria studies of the cAMP receptor protein-DNA interaction. *J. Mol. Biol.* 172: 241-262.
- Friedman, M., Sharon, R., Brown, S., Bulkema J., and F. Ausubel. (1982) Construction of a broad range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene* 18: 289-296.
- Goldhammer, A., and A. Wolff. (1982) Assay of calmodulin with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *Annal Biochem.* 124:45-52.
- Glaser, P., Danchin, A., Ladant, D., Barzu, O., and A. Ullmann. (1988) *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: the gene and the protein. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 13: 239-252.
- Guerinot, M., and B. Chelm. (1984) Isolation and expression of the *Bradyrhizobium japonicum* adenylate cyclase gene (*cyaI*) in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 159: 1068-1071.
- Guerinot, M., and B. Chelm. (1985) Bacterial cAMP and heme in the *Bradyrhizobium japonicum*/soybean symbiosis. In *Nitrogen Fixation Reserch Progress* (Evans, H. J., Bottmley, P. J. and Newton, W. E., eds.), p220, Martinus Nijhoff, Dordrecht.
- Hamilton, R., Archberger, E., and E. Kolenbrander. (1977) Control of morphogenesis in *Arthrobacter crystallopoietes* effect of cyclic 3'5'-AMP. *J. Bacteriol.* 129: 874-879.
- Hamilton, R., and E. Kolenbrander. (1978) Regulation of cyclic 3'5'-AMP in *Arthrobacter crystallopoietes* an a morphogenic mutant. *J. Bacteriol.* 134: 1064-1073.
- Hanahan, D. (1983) Studies of transformation of the *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-560.
- Hanamura, A., and H. Alba. (1991) Molecular mechanism of negative autoregulation of *Escherichia coli crp* gene. *Nucleic Acids Res.* 19: 4413-4419.
- Hanski, E., and Z. Forfel. (1985) *Bordetella pertussis* invasive adenylate cyclase: partial penetration and properties of cellular penetration. *J. Biol. Chem.* 260: 5526-5532.
- Hengge-Aronis, R. (1993) Survival of Hunger and Stress: The role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell* 72: 165-168.
- Heyduk, T. and J. Lee. (1989) *Escherichia coli* cAMP receptor protein: Evidence for three protein conformational states with different promoter affinities. *Biochemistry* 28: 6914-6924.
- Holtje, J., and N. Nanninga. (1964) The intracellular concentration of cyclic adenosin 3',5'-monophosphate is constant throughout the cell cycle of *Escherichia coli*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 22: 189-192.
- Hughes, P., Landoulsi, A., and M. Kohiyama. (1988) A novel role for cAMP in the control of the activity of the *E. coli* chromosome replication initiator protein. *DNA. Cell* 55: 343-350.
- Katayama, M., Wada, Y., and Y. Ohmori. (1995) Molecular cloning of the cyanobacterial adenylate cyclase gene from the filamentous cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *J. Bacteriol.* 177: 3873-3878.

- Kiely, B., and F. O'Gara. (1983) Cyclic 3'-5'-adenosin monophosphate synthesis in *Rhizobium*: identification of a cloned sequence from *Rhizobium meliloti* coding for adenylyl cyclase. *Mol. Gen. Genet.* 192: 230-234.
- Koch, J., Hayashi, S., and E. Lin. (1964) The control of dissimilation of glycerol and L- $\alpha$ -glycerophosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 125: 545-555.
- Kokotek, W., and W. Lotz. (1989) Construction of a lacZ-Kanamycin-resistance cassette, useful for site-directed mutagenesis and as a promoter probe. *Gene* 84: 467-471.
- Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S., and S. Adhya. (1993) Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 749-795.
- Kumar, S., Agarwal K., and S. Zalela. (1981) Regulation of envelope-growth in *Escherichia coli*. Horizontal envelope growth by a process under cAMP control. *Indian J. Exp. Biol.* 19: 640-642.
- Kutsukake, K., Ohya, Y. and T. Lino. (1990) Transcriptional analysis of flagellar region of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 172: 741-747.
- Kypr, J., and J. Mrazek. (1985) Possible mechanism of the allosteric activation of cAMP receptor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131: 780-785.
- Lepia S. H. (1982) Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic cAMP concentration in eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:3162-3166.
- Lim, S., and K. Shanmugam. (1979) Regulation of hydrogen utilisation in *Rhizobium japonicum* by cyclic AMP. *Biochim. Biophys. Acta* 584: 479-492.
- Lowry, O., Rosebrough, J., Farr, A., and R. Randall. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Magasanik, B., and F. Neidhard. (1987) Regulation of carbon and nitrogen utilization. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F. (ed). Washington, D. C.: American Society for Microbiology, pp. 1318-1325.
- Mandal, N., and P. Chakrabarty. (1993 A) Succinate mediated catabolite repression of enzymes of glucose metabolism in root nodule bacteria. *Current Microbiol.* 26: 247-251.
- Mandal, N., and P. Chakrabarty. (1993 B) Regulation of enzymes of glyoxylate pathway in root nodule bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 38: 417-427.
- Manian, S., Gumbleton, R., and F. O'Gara. (1982) The role of formate metabolism in nitrogen fixation in *Rhizobium* spp. *Arch. Microbiol.* 133: 312-317.
- Maniatis, T., Fritsch, E., and J. Sambrook. (1989) *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Magasanik, B. (1961) Cold Spring Harbor Symp. *Quant. Biol.* 26: 249-256.
- Martínez, E., Pardo, A. M., Palacios, R., and M. A. Cevallos. (1985) Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* 131:1779-1786.
- Matin, A. (1991) The molecular basis of carbon-starvation-induced general resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5: 3-10.
- McKay, D., Weber, I., and T. Stultz. (1982) Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution: incorporation of amino acid sequence and interactions with cAMP. *J. Biol. Chem.* 257: 9518-9524.
- McGetrick, A., Goulding, C., Sudaram, S., and F. O'Gara. (1985 A) Catabolite repression and role of cyclic AMP in CO<sub>2</sub> fixation and H<sub>2</sub> metabolism in *Rhizobium* spp. *J. Bacteriol.* 163: 1282-1284.
- McGetrick, A., O'Regan, M., and F. O' Gara. (1985 B) Expression and regulation of lactose transposon Tn951 in *Rhizobium* spp. *FEMS Microbiol. Letts.* 29: 27-33.

- Mock, M., Crasnter, M., Duflot, E., Dumay, V., and A. Danchin. (1991) Structural and functional relationships between *Pasteurella multocida* and enterobacterial adenylate cyclases. *J. Bacteriol.* 173: 6265-6269.
- Mora, J., Encarnación, S., Salgado, M., Mora, Y., Mendoza, A., and A. Leija (1993) Carbon and Nitrogen Metabolism in *Rhizobium*. In R. Palacios, J. Mora, and W. E. Newton (ed.) *New horizons in nitrogen fixation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Mora, J., Encarnación, S., Calderón, J., Gelbard, A. S., and A. Cooper (1993) Glutamine cycling and the utilization of carbon by different species of *Rhizobium*. In R. Palacios, J. Mora, and W. E. Newton (ed.) *New horizons in nitrogen fixation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Murray, P., and R. Uffen. (1988) Influence of cAMP on the growth response and anaerobic metabolism in *Rhodocyclops gelatinosus*. *Arch. Microbiol.* 149: 312-316.
- Noel, K., Sánchez, A., Fernández, L., Leemans, J., and M. Cevallos. (1984) *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* 158: 148-155.
- Neidhardt, F., Ingraham J., and M. Schaechter. (1990) Regulation of gene expression: Multigene Systems and Global Regulation. In *Physiology of the Bacterial cell*, (ed) SINAUER, pp. 351-385.
- Ohmori, M., Ohmori, K., and K. Hasunuma. (1988) Rapid change in cyclic 3'S'-AMP concentration triggered by a light-off or light-on signal in cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 150: 203-204.
- Ohmori, K., Hirose, M., and M. Ohmori. (1993) An increase in the intracellular concentration of cAMP triggers formation of an algal mat by the cyanobacteria *Spirulina platensis* *Plant Cell Physiol.* 34: 169-171.
- O'Regan, M., Kiely, B., and F. O'Gara. (1989) Expression of the adenyl cyclase encoding gene *cya* of *Rhizobium meliloti* F43: existence of two *cya* genes? *Gene* 83: 243-249.
- Peters E., Wilderspin A., Wood S., Zvelebil M., Sezer O., and A. Danchin. (1991) A pyruvate-stimulated adenylate cyclase has a sequence related to the *fec*/*lps* oncogenes and to eukaryotic cyclases. *Mol. Microbiol.* 5:1175-1181.
- Peterkofsky, A., Retzer, A., Retzer, J., Gollop, N., and N. Amin. (1993) Bacterial Adenylyl Cyclases. *Prog. Nuc. Ac. Res. Mol. Biol.* 44: 31-65.
- Pinkey, M., and J. Hogget. (1988) Binding of the cyclic AMP receptor protein in *Escherichia coli* to RNA polymerase. *Biochem. J.* 250: 897-902.
- Pyles E., and J. Lee. (1996) Mode of selectivity in cyclic AMP receptor protein-dependent promoters in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 30, 35:4, 1162-72.
- Richet, E., Vidal-Ingilard, D., and O. Raibaud. (1991) A new mechanism for coactivation of transcription initiation: repositioning of an activator triggered by the binding of a second activator. *Cell* 66: 1185-1195.
- Röhm, M., and D. Werner. (1985) Regulation of the  $\beta$ -ketoadipate pathway in *Rhizobium japonicum* and bacteroids by succinate. *Arch. Microbiol.* 140: 375-379.
- Roy, A., Haziza C., and A. Danchin. (1983) Regulation of adenylate cyclase synthesis in *Escherichia coli* nucleotide sequence of the control region. *EMBO J.* 2: 791-797.
- Roy, A., and A. Danchin. (1982) The *cya* locus of *Escherichia coli* K12 organization and gene products. *Mol. Gen. Genet.* 188: 465-471.
- Russell, L., and H. Yamazaki. (1978) The dependence of *Escherichia coli* asparaginase II on cyclic AMP and CRP. *Can. J. Microbiol.* 24: 629-631.

- Saier, M. H., jr. (1989) Protein phosphorylation and allosteric control of inducer exclusion and catabolite repression by the bacteria phosphoenol pyruvate: sugar phosphotransferase represson. *Microbiol. Rev.* 53: 109-111.
- Saier, M. H., jr. (1991) A multiplicity of potential carbon catabolite repression mechanisms in prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *The New Biologist.* 12: 1137-1147.
- Saubornin, D., and J. Beskwith. (1975) Deletion of the *Escherichia coli* *crp* Gene. *J. Bacteriol.* 122: 338-340.
- Segovia, L., Young, J., and E. Martinez-Romero. (1993) Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* biovar phasecoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:374-377.
- Selbitschka, W., Niemann, S., and A. Puhler. (1993) Construction of the gene replacement vectors for gr- $\mu$ m negative bacteria using a genetically modified *sacRB* gene as a positive selection marker. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 615-618.
- Simpson, F., Mater, R., and H. Evans. (1979) Hydrogen stimulated CO<sub>2</sub> fixation and coordinated induction of hydrogenase and ribulose biophosphate carboxylase in a H<sub>2</sub> uptake positive strain of *Rhizobium japonicum* Arch. *Microbiol.* 123: 1-8.
- Schultz, E., Latzer, G., and A. Martin. (1988) Differential Regulation by Cyclic AMP of Starvation Protein Synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170: 3903-3909.
- Schultz, S., Shields, G., and T. Steitz. (1990) Crystallization of *E. coli* catabolite gene activator protein with its DNA binding site. *J. Mol. Biol.* 213: 159-166.
- Schwartz, M. (1987) The Maltose regulon. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology (Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magazantk, B., Schaechter, M. and Umberger, H. E., eds) pp. 1482-1502. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Shah, S., and A. Peterkofsky. (1991) Characterization and Generation of *Escherichia coli* Adenylyl Cyclase Deletion Mutants. *J. Bacteriol.* 173: 3238-3242.
- Siegele, D., and R. Kolter. (1992) Life After Log. *J. Bacteriol.* 174: 345-348.
- Smith, G., and J. Ownby. (1981) cAMP interferes with pattern formation in the cyanobacteria *Anabaena uvaabitis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 11: 175-180.
- Sogard-Andersen, L., Martinussen, J., Mollegaard, N., Douth-Waite, R., and P. Valentinn-Hensen. (1990) The CytR repressor antagonizes cyclic AMP-cyclic AMP receptor protein activation of the deoCp2 promoter of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 172: 5706-5713.
- Steiner, A., Kipnis, D., Utiger, R., and C. Parker. (1969) Radioimmuno-assay for the measurement of adenosine 3'5'-cyclic phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64: 367-373.
- Stetz, T., Ohlendorf, D., McKay, D., Anderson, W., and W. Mathews. (1982) Structural similarity in the DNA binding domains of catabolite gene activator and Cro repressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 3097-3100.
- Stowers, M., and H. Elkan. (1985) Regulation of hexose catabolism in *Rhizobium sp.* 32H1. *FEMS Microbiol. Lett.* 26: 45-48.
- Stratagene. (1990) Stratagene cloning systems: Product Catalog, 208 pp.
- Tippett, M., and D. Robertson. (1988) Molecular cloning and expression of the *Bacillus anthracis* edema factor toxin gene: a calmodulin-dependent adenylyl cyclase. *J. Bacteriol.* 70: 2663-2666.
- Ucker, D., and E. Singer. (1978) Catabolite repression like phenomenon in *Rhizobium melliottii*. *J. Bacteriol.* 126: 1197-1200.

- Uden, G., and J. Guest. (1984) Cyclic AMP and anaerobic gene expression in *E. coli*. FEBS Lett. 170: 321-325.
- Upchurch, R., and G. Elkan. (1978) The role of ammonia, L-glutamate, and cAMP in the regulation of ammonia assimilation in *Rhizobium japonicum*. Biochem Biophys Acta 538: 244-249
- Uzan, M., and A. Danchin. (1976) A rapid test for the *relA*<sup>-</sup> mutation in *E. coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 69: 751-756.
- Wang J., Clegg, O., and D. Koshland. (1981) Molecular cloning and amplification of the adenylate cyclase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4684-4688.
- Wang, Y., Giblin, L., Boesten, B., and F. O'Gara. (1993) The *Escherichia coli* cAMP receptor protein (CRP) represses the *Rhizobium meliloti* *dctA* promoter in a cAMP dependent fashion. Mol. Microbiol. 8: 253-259.
- Weber, I., Tokio, K., Titani, K., and T. Steitz. (1987) Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å resolution. J. Mol. Biol. 198: 311-327.
- Weiss, A., and E. Hewlett. (1986) Virulence factors of *Bordetella pertussis*. Annu. Rev. Microbiol. 40: 661-668.
- Winkler, H. (1970) Compartmentation in the induction of the hexosa-6-phosphate transport system *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 101: 470-475.
- Wood, D., Neubauer, G., and F. Stutzenberger. (1984) Cyclic AMP levels during induction and repression of cellulase biosynthesis in *Thermomonospora curvata*. J. Bacteriol. 160: 1047-1054.
- Yashiro, K., Sakamoto, T., and M. Ohmori. (1996) Molecular characterization of an adenylate cyclase gene of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. Plant. Mol. Biol. 31: 175-181.
- Zinkel, S. and D. Crothers. (1991) Catabolite activator protein-induced DNA bending in transcription initiation. J. Mol. Biol. 209: 201-215.
- Zubay, G., Schwartz, D., and J. Beckwith. (1970) Mechanism of activation of catabolite sensitive genes: a positive control system. Proc. Natl. Acad. Sci. 66: 104-110.

## APÉNDICES

### 1 LB

Peptona de Caseína	10 gr.
Extracto de Levadura	5 gr.
NaCl	10 gr.
Agua c.b.p.	1000 ml
(Sólido: agar bacteriológico 15 gr.)	

### 2 M9

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 gr.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 gr.
NaCl	0.5 gr.
NH <sub>4</sub> Cl	1 gr.
Agar	15 gr.
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (1 M)	1 ml
*Glucosa 20% (w/v)	10 ml
Agua c.b.p.	1000 ml
** Tiamina 1 mg/ml	1 ml

(Sólido: agar bacteriológico 15 gr.)

\* La glucosa puede ser sustituida por la fuente de carbono deseada en la misma concentración.

\*\* la tiamina (ésteril por filtración) se adiciona después de autoclavar.

### 3 Agar MacConkey

Peptona de Caseína	17 gr.
Sales Biliares	1.5 gr.
NaCl	5 gr.
Rojo Neutro	0.03 gr.
Cristal Violeta	0.001 gr.
Agar Bacteriológico	13.5 gr.
Agua c.b.p.	1000 ml

### 4 FY

Peptona de Caseína	5 gr.
Extracto de Levadura	3 gr.
Agua c.b.p.	1000 ml
(Sólido: agar bacteriológico 15 gr.)	

**5 Medio Mínimo Rhizobium**

MgSO <sub>4</sub>	0.1	gr	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.22	gr	
Ac. Succínico	1.18	gr	
Agua c.b.p.	983	ml	
Ajustar el pH	6.8		
Autoclavear			
Agregar:			
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (1M)			1 ml
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O (0.005 mg / ml)			1ml
NH <sub>4</sub> Cl (10%)			4.87 ml
(Sólido: agar bacteriológico 15 gr.)			

**6 Buffer TE (50:20)**

Tris-HCl (pH 8) 2 M	2.5	ml
EDTA (pH 8) 0.5 M	4	ml
Agua	93.5	ml

**7 Solución I**

Glucosa 0.5 M	10	ml
EDTA (pH 8) 0.5 M	2	ml
Tris-HCl (pH 8) 2 M	1.2	ml
Agua	86.7	ml

**8 Solución II**

NaOH 10 N	2	ml
SDS 20 % (w/v)	5	ml
Agua	93	ml

**9 Solución III**

Acetato de Potasio 5 M	60	ml
Agua	40	ml

**10 TAE**

Trizma-base	4.8	gr.
Ácido acético	1.1	ml
EDTA (pH 8) 0.5 M	20	ml
Agua c.b.p.	1000	ml



### **11 SSC**

#### **Solución 20X**

NaCl	175.3 gr.
Citrato de sodio	88.2 gr.
Agua c.b.p.	1000 ml
(Ajustar el pH a 7 con NaOH)	

### **12 Buffer de Ensayo para la cuantificación del AMPc**

Tris-HCl (pH7.5) 1 M	5 ml
EDTA (pH 7.5) 0.5 M	0.8 ml
Agua c.b.p.	100 ml

### **13 Placas de Agar Suave**

Peptona de Caseína	1%
Cloruro de Sodio	0.8%
Agar	0.3%

Las cajas de petri se llenan casi hasta el borde.