

# COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSTGRADO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES EN  
LA REGIÓN glnA DEL CROMOSOMA DE Escherichia coli K12

T B S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A

SUSANA BROM KLANNER

México, D. F.

1980



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.

OBTENCION Y CARACTERIZACION DE  
MUTACIONES EN LA REGION glnA DEL  
CROMOSOMA DE Escherichia coli K12

INTRODUCCION

La incorporación del nitrógeno a macromoléculas, es un evento esencial para el crecimiento de enterobacterias y de cualquier sistema biológico en general.

En enterobacterias, como Escherichia coli por ejemplo, los principales donadores de grupos nitrogenados para la síntesis de compuestos del metabolismo intermedio son la glutamina y el ácido glutámico. La glutamina cede su grupo amido para la biosíntesis de aminoácidos, purinas y pirimidinas, mientras que el glutamato cede su grupo amino para la biosíntesis de algunos aminoácidos, mediante procesos de transaminación (1).

El ácido glutámico se sintetiza a partir de amonio y ácido alfa-cetoglutarico en una reacción catalizada por la deshidrogenasa glutámica o alterna-

tivamente, puede sintetizarse también en una reacción catalizada por la glutamato sintasa, por medio de la cual se sintetizan dos moléculas de ácido glutámico a partir de una molécula de glutamina y una de ácido alfa ceto-glutárico.

Solamente existe una vía para biosintetizar glutamina, consistente en una reacción catalizada por la enzima glutamino sintetasa (GS), la cual utiliza amonio y ácido glutámico como sustratos.

Dado que la glutamina tiene un papel central en la asimilación y distribución del nitrógeno celular, el estudio de la enzima responsable de la biosíntesis de éste aminoácido es de capital importancia.

En bacterias Gram negativas se sabe que la GS está sujeta a represión por altas concentraciones de amonio; además, su actividad está sujeta a un control por modificación enzimática; en condiciones de represión (alta concentración de amonio) la enzima se encuentra mayormente adenilada (biosintéticamente inactiva) mientras que en condiciones de inducción la enzima se encuentra en estado no adenilado, es decir, biosintéticamente activa (16).

Las reacciones de adenilación y desadenilación de GS están catalizadas por la adenililtransferasa (ATasa), la proteína PII estimula la adeni-

lación cuando no se encuentra uridilada y la reacción inversa cuando está uridilada; la uridilación de la proteína PII está catalizada por la uridililtransferasa (Ufasa); ésta enzima es activada por ácido alfa ceto-glutárico e inhibida por glutamina, dando como resultado que el estado de adenilación de la GS depende de la relación ácido alfa ceto-glutárico/ glutamina presente en la célula (3).

Por otro lado, existe evidencia que sugiere que la GS está involucrada en la regulación de su propia síntesis, ya que mutantes regulatorias de GS que dan como resultado la síntesis constitutiva de la enzima ( $GlnC^+$ ) se han localizado dentro del gene estructural de GS (glnA) por cruza de tres puntos (4). Otra evidencia que apoya ésta hipótesis es que se ha reportado que mutaciones en genes que intervienen en la adenilación y desadenilación de la GS resultan en niveles de GS de diferente magnitud a la normal (5).

Recientemente se ha descrito la existencia de un gene, glnF, cuyo producto se requiere para la síntesis de la enzima GS. Este gene se localiza en el mapa cromosómico en un lugar lejano de donde se encuentra el gene glnA y de los sitios en los que se localizan los genes que codifican para las enzimas

ejos...  
pueblo hasta  
nacional. Esta  
ayos tratos era  
el constante  
instituciones  
necesario moder-

repetir la paz  
o permanentemente.  
a la paz social  
za, con falta de  
levantamiento  
es expresadas  
no opio por el  
ente ideológico  
un parte de la  
ente ideológico  
partir de 1880;

anes acceren de  
ades reales de  
el cambio de  
puestas por la  
o por Gabino  
ión clave para  
en México.

discrepancias  
receptones se  
no social", pro-  
liberalismo que  
ararizar los  
ción idian en un  
una adecuada  
cambio reinar

del sistema de adenilación-desadenilación (8,9). En la Fig. 1 se puede observar la localización de los diferentes genes involucrados en la síntesis y regulación de GS en el mapa cromosómico de E. coli.

También se han publicado datos que sugieren que la GS no solamente tiene la función de sintetizar glutamina, sino que también participa directamente en la regulación de la expresión de operones catabólicos de metabolitos que pueden servir como fuente de nitrógeno accesoria para las células, tales como: histidina, prolina, etc. (10).

Recientemente se ha comunicado la existencia de otro gene, denominado glnG en E. coli (6) y glnR en Salmonella typhimurium (7), el cual se encuentra altamente ligado a glnA y que está involucrado en la regulación de la síntesis de GS. Cepas con mutaciones en el gene glnG presentan un nivel bajo constitutivo de GS, es decir, la actividad de ésta enzima no se incrementa cuando las células se encuentran deprivadas de nitrógeno, como ocurre en la cepa silvestre. Por otro lado éstas mutantes presentan el fenotipo  $Reg^-$ , que consiste en la incapacidad de éstas cepas de utilizar aminoácidos tales como arginina o prolina

como única fuente de nitrógeno.

La hipótesis de que la GS se encuentra sujeta a una regulación autógena no se ha descartado totalmente, pero existe actualmente una seria duda de donde mapean las mutaciones  $GlnC^m$ , si en glnA, glnG o en algún otro gene no descrito hasta la fecha, proponiéndose como una alternativa que los productos de los genes glnP y glnG son los responsables de activar la síntesis de GS y no la enzima misma como se había propuesto anteriormente.

Dada la importancia de la GS en el metabolismo celular, nos propusimos iniciar un estudio genético de la enzima en Escherichia coli; dicho estudio podría ser útil para tratar de dilucidar algunos de los mecanismos regulatorios que afectan la expresión de ésta enzima.

El objetivo de éste trabajo consiste en:

- 1) Localización del gene glnA en el mapa cromosómico de E. coli-K12.
- 2) La obtención de cepas con el bacteriófago  $\lambda$  integrado en o cerca del gene glnA, ya que éstas cepas nos servirán posteriormente para aislar mutantes que presenten deleciones de éste gene y para la obtención de fagos transductantes  $\lambda$ glnA. De lograrse éstos propósitos, los resultados nos

servirían para hacer un mapeo fino del gene glnA.

El enfoque experimental que se utilizó para obtener las cepas con inserciones del bacteriófago  $\lambda$  en la región de glnA consistió básicamente en la lisogenización de cepas a las cuales se les había integrado previamente el transposón Tn5 ( $\text{kan}^R$ ), con el bacteriófago  $\lambda_{\text{kan2}}$ , ya que las cepas utilizadas como receptoras para la lisogenización carecían del sitio normal de integración de  $\lambda$  ( $\text{att}\lambda$ ), el único sitio de homología entre el DNA del fago y el cromosoma bacteriano resultó ser el Tn5. Esto permitió la integración específica del bacteriófago en el sitio donde se encontraba previamente integrado el Tn5.

En el presente trabajo se describe la localización de glnA en el cromosoma de E. coli K12 y la obtención y caracterización de algunas mutaciones en la región glnA, obtenidas por inserción de Tn5 o del bacteriófago  $\lambda$  y por escisión de  $\lambda$  integrado en ésta región del cromosoma.



## MATERIAL Y METODOS

### 1. Cepas bacterianas y bacteriófagos.

Las cepas bacterianas y los fagos utilizados en éste trabajo se encuentran descritos en la Tabla 1.

### 2. Cultivo de bacterias.

Para la realización de los experimentos, las cepas bacterianas se crecieron hasta fase exponencial (40 unidades klett) en medio Luria (19) (bacto-triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, cloruro de sodio 1%) o en medio mínimo NN (20) ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  14.9 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.835 mM,  $\text{CaCl}_2$  0.901 mM,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.018 mM) suplementado con 0.2% de glucosa como fuente de carbono y 15 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  o 1mg/ml de glutamina como fuente de nitrógeno. Los demás requerimientos de las cepas (aminoácidos y vitaminas) se agregaron a una concentración final de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

### 3. Obtención de lisados de P1.

#### A) Preparación de lisados por lisis confluyente:

Se mezclaron 0.5 ml de la cepa donadora, crecida hasta fase exponencial en medio Luria,

con 0.1 ml de P1 ( $10^7$  pfu/ml); la mezcla se vació sobre cajas con medio LCTG (Luria +  $\text{CaCl}_2$  25mM + timina 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  + glucosa 0.2%) con ayuda de agar suave (agar 0.75%). Después de doce horas de incubación a 30 o 37°C según el caso, se raspó el agar suave de la superficie de las cajas, se añadió cloroformo en la relación de 1 ml de cloroformo por cada 20 ml de suspensión fágica y se agitó vigorosamente. La suspensión de fagos se decantó y se guardó a 4°C (21).

B) Preparación de lisados por termoinducción:

Las cepas lisogenizadas con el bacteriófago P1 CMclr100 se crecieron en medio Luria hasta fase exponencial a 30°C, después de concentrar el cultivo cinco veces por centrifugación, se incubó dos horas a 42°C y posteriormente 90 min a 37°C. Después de centrifugar y cloroformar como se describió anteriormente, los lisados se mantuvieron a 4°C.

Los lisados se titularon en medio LCTG utilizando la cepa AB1157 de E. coli como cepa sensible.

4. Obtención de lisados de  $\lambda$ .

Las cepas lisogenizadas con  $\lambda_{kan2}$  se crecieron en medio Luria a 30°C hasta fase expo-

nencial. Los cultivos se incubaron a 42°C por 40 min y a 37°C por 90-210 min; posteriormente los lisados se cloroformaron y centrifugaron y finalmente se mantuvieron a 4°C.

Para titular los lisados de  $\lambda$  se utilizó la cepa OSE25 de E. coli y placas con medio TBMM (bacto-triptona 1%, maltosa 0.2%,  $MgSO_4$  10 mM).

#### 5. Transducciones con P1.

Las cepas receptoras se crecieron en medio Luria hasta fase exponencial, se concentraron 10 veces y se les añadió el lisado de P1 a una multiplicidad de 0.05 (1 fago/20 bacterias) en presencia de  $CaCl_2$  0.015 M y  $MgSO_4$  0.03M. Después de incubar 20 min para permitir la adsorción del fago, las mezclas se plaquearon sobre cajas de petri conteniendo medio selectivo. Las placas se incubaron a 30 o 37°C, según el caso y los resultados se registraron a las 48 horas de incubación.

#### 6. Lisogenización con $\lambda_{kan2}$ .

La cepa receptora se creció en medio Luria suplementado con  $MgSO_4$  0.01 M y maltosa al 0.2% hasta fase exponencial. La infección se llevó a cabo a una multiplicidad de 10; la mezcla

de infección se incubó 15 min para permitir la adsorción del fago y se diluyó 10 veces en el mismo medio, incubándose aproximadamente 3 horas. Posteriormente la mezcla se plaqueó sobre cajas de petri con medio Luria suplementado con glutamina, efectuándose todo el procedimiento a 30°C. Se aislaron como lisógenas las colonias que fueron temperatura sensibles y  $\lambda$ inmunes, comprobándose la inmunidad a por la resistencia de las cepas a  $\lambda$ kan2 y sensibilidad a  $\lambda$ vir.

7. Aislamiento de deleciones en la región glnA del cromosoma de E. coli por tratamiento con pulsos de calor de la cepa MX752.

Cultivos de la cepa  $\lambda$ lisogénica MX752 se crecieron en medio NH suplementado con glucosa y glutamina hasta fase exponencial a 30°C. Tras exponerlos a pulsos de calor de 6 min a 42°C, se dejaron expresar aproximadamente 12 horas en el mismo medio. Los cultivos se sometieron a dos ciclos de enriquecimiento con penicilina en presencia de amonio fuente de nitrógeno, recuperándose finalmente aquellas colonias que crecieron bien en presencia de glutamina pero no lo hicieron o crecieron pobremente en amonio como fuente de nitrógeno.

#### 8. Medición de actividad enzimática de GS.

Para la determinación de actividad de GS, los cultivos se crecieron en medio NN con glucosa y amonio o glutamina como fuente de nitrógeno. La actividad de GS se midió según el ensayo reportado por Shapiro y Stadtman (11) con las modificaciones introducidas por Bender y Magasanik (22). El estado de adenilación de la GS se midió agregando 60 mM  $MgCl_2$  a la mezcla de reacción, ya que el  $Mg^{2+}$  inhibe solamente la actividad de las subunidades adeniladas (Stadtman et al., 1970).

Las determinaciones de proteína se efectuaron según el método descrito por Lowry (12), utilizando la fracción V de la albúmina de suero bovino como referencia. La actividad específica está expresada en unidades de enzima por mg de proteína.

#### 9. Preparación de anticuerpos.\*

Para preparar anticuerpos antiGS, se inyectaron conejos con 250  $\mu$ g de GS purificada a partir de la cepa RR1 (glnA<sup>+</sup>) de E. coli, en adyuvante completo de Freund. Los animales se inyectaron dos veces en un intervalo de 15 días con las mismas dosis de GS. Los conejos se sangraron por la oreja una vez a la semana durante tres

meses, comenzando una semana después de la segunda inyección de GS. El suero obtenido de los diferentes sangrados se utilizó para preparar la fracción total de  $\gamma$ -globulinas por tres precipitaciones con sulfato de amonio al 40% de saturación. El precipitado final se disolvió en buffer fosfatos 10 mM pH 7.2, se dializó contra el mismo buffer y se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### 10. Immunoprecipitación de GS.

La immunoelectroforésis de rocket se llevó a cabo según el método descrito por Weeke (15) utilizando un gel de agarosa 1% conteniendo 0.5% de la fracción de  $\gamma$ -globulinas de un suero anti-GS. El buffer utilizado fue barbital de sodio 25 mM pH 8.6 conteniendo 0.025% de azida de sodio. El gel se corrió por 15 horas a 5 volts/cm. Al final de la electroforésis el gel se lavó y secó, tificándose posteriormente con azul brillante de Coomassie R-250.

\*El suero anti-GS utilizado en éste trabajo fue preparado por Susana López y Rafael Palacios; a quienes agradezco atentamente el haberme lo facilitado.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### I. Localización cromosómica del gene glnA en el cromosoma de Escherichia coli K12.

El gene glnA que codifica para la proteína estructural de la GS, ha sido localizado en el minuto 85 del cromosoma de E. coli (13) y en la región homóloga del cromosoma de Klebsiella aerogenes (2), flanqueado por los genes old (que codifican para la utilización de oleato como fuente de carbono) y rha (que codifican para la utilización de rhamnosa como fuente de carbono). Recientemente Tyler (17) ha demostrado que polA se encuentra altamente ligado a glnA.

En base a éstos antecedentes, se hicieron experimentos de cruzas de dos y tres puntos entre cepas que presentaban los marcadores old, rha, chlB, glnA y polA. Los resultados de éstos experimentos (Tabla 2) nos indican que glnA está flanqueado por polA y chlB ya que son los marcadores con que glnA cotransduce a mayor frecuencia (60 y 20% respectivamente), rha y old se encuentran a una distancia que corresponde a 7 y 45% de cotransducción con glnA respectivamente y están a diferentes lados de éste gene ya que la frecuencia

de cotransducción entre ellos es solamente de 2.5%. Por otro lado, se puede observar que la frecuencia de cotransducción entre rha y chlB es de 45% lo cual implica que chlB se encuentra entre glnA y rha. En la Tabla 3 se pueden observar las frecuencias de cotransducción entre los distintos marcadores y la distancia en minutos a que se encuentran, calculado según la fórmula de Wu (18). El orden de los genes en ésta región del cromosoma se encuentra esquematizado en la Fig.2.

## II. Obtención de cepas con inserciones del transposón Tn5 en glnA.

Para la obtención de mutantes con el bacteriófago  $\lambda$  insertado en glnA, la estrategia utilizada fue lisogenizar mutantes que tuvieran el transposón Tn5 (kan) integrado en glnA, con el fago  $\lambda$ kan2, esperando que el fago se integrara en glnA por recombinación entre el Tn5 del cromosoma y el gene que confiere resistencia a kanamicina portado por el fago.

Para poder llevar a cabo ésta lisogenización, se necesitaba previamente construir una cepa con las siguientes características:



1. Una deleción en el sitio normal de integraci3n de  $\lambda$  ( $att\lambda$ ), ya que se ha reportado anteriormente que en ausencia de 3ste sitio, el bacteriofago  $\lambda$  es capaz de integrarse en otros sitios del cromosoma, aunque a menor frecuencia (14).
2. Un transpos3n Tn5 integrado en o cerca de glnA que funcionar3 como sitio de homolog3a para la integraci3n del fago  $\lambda_{kan2}$ .
3. El supresor SuIII<sup>+</sup>, ya que el fago  $\lambda$  utilizado en 3ste trabajo lleva la mutaci3n S7, debido a la cual es incapaz de lisar a la bacteria a menos que el SuIII<sup>+</sup> se encuentre presente.

La estrategia utilizada para la obtenci3n de la cepa requerida para poder llevar a cabo la lisogenizaci3n, se encuentra esquematizada en la Fig. 3. Se parti3 de la cepa MX615, la cual posee una deleción en el sitio de  $att\lambda$ . Esta cepa se infect3 con el fago  $\lambda_{kan2}$  y se sometió a un ciclo de enriquecimiento con penicilina en presencia de amonio (15mM), seleccionando posteriormente los sobrevivientes en presencia de glutamina y kanamicina. De 3ste procedimiento se obtuvo la cepa MX727. Esta cepa requiere de glutamina para poder crecer y es resistente a kanamicina como puede observarse en la Tabla 4, se puede observar tambi3n que se obtuvo 100% de cotransducci3n entre la

resistencia a kanamicina y el requerimiento por glutamina (Tabla 5). La cepa MX727 no presenta actividad detectable de GS (Tabla 6) y tampoco presenta un antígeno precipitable con anticuerpos anti-GS (Fig. 6).

Ya que en la cepa MX727 el gene glnA se encuentra inactivado y ésta inactivación se encuentra 100% ligada a la resistencia a kanamicina que presenta la cepa, podemos concluir que en la cepa MX727 el gene glnA se encuentra interrumpido por la inserción de un transposón Tn5.

Por último para introducir la mutación  $SuIII^+$  en la cepa MX727, primeramente se utilizó como receptora en una transducción negativa con P1 crecido en la cepa MX295 (trpA540) las bacterias infectadas se sometieron a un ciclo de enriquecimiento con penicilina, recuperándose las sobrevivientes  $Trp^-$ . De ésta manera se aisló la cepa MX747, la cual presenta los mismos marcadores que la cepa MX727 y lleva además la mutación trpA540. A su vez, la cepa MX747 se utilizó como receptora en una transducción a  $Trp^+$ , con P1 crecido en la cepa CSH25 ( $Trp^+ SuIII^+$ ). El 48% de las transductantes  $Trp^+$  obtenidas presentaron el marcador  $SuIII^+$ ; se purificó una de éstas transductantes, denominada MX748, la cual presentó todas las características

necesarias para poder llevar a cabo la lisogenización con  $\lambda_{kan2}$ . En la Tabla 4 se observan las características fenotípicas de las cepas MX747 y MX748, ambas fueron resistentes a kanamicina y requirieron de glutamina para su crecimiento; se observa además, que la cepa MX748 resultó sensible al bacteriófago  $\lambda_{kan2}$  por llevar la mutación  $SuIII^+$ .

En la Tabla 5 se observa que en tanto en la cepa MX747 el Tn5 se encontró todavía altamente ligado al requerimiento por glutamina, indicando que el transposón se encuentra integrado en glnA al igual que en la cepa MX727, en la cepa MX748 solamente el 48% de las transductantes  $Gln^+$  adquirieron sensibilidad a kanamicina; lo cual parece indicar que ésta cepa ahora poseía dos transposones integrados, uno en glnA ya que como se observa en la Tabla 6 la cepa no ha recuperado su actividad de GS y otro a 0.43 min de glnA lo que corresponde a 48% de cotransducción. La duplicación del Tn5 puede haber ocurrido durante la transducción que se efectuó para introducir el supresor  $SuIII^+$  en la cepa MX747. La inserción del Tn5 duplicado a 0.43 min de glnA nos sugiere que posiblemente en éste lugar del cromosoma pudiera existir un sitio que tiene cierta homología con el Tn5, ya que se han encontrado en el

laboratorio otras mutantes que tienen inserciones de Tn5 a aproximadamente la misma distancia de glnA a la que se encuentra el nuevo transposón en la cepa MX748.

### III. Obtención de cepas con integración del bacteriófago $\lambda$ en el cromosoma de E. coli.

Para la obtención de cepas que portaran el bacteriófago  $\lambda$  integrado en o cerca de glnA, se lisogenizó la cepa MX748 con el fago  $\lambda$ kan2, como se describe en Material y Métodos. Ya que el fago  $\lambda$ kan2 lleva la mutación cI857, la cual confiere termosensibilidad a las cepas que lo porten, se aislaron como lisógenas aquellas cepas que presentaban termosensibilidad e inmunidad al bacteriófago  $\lambda$ .

La localización de  $\lambda$  con respecto a glnA en éstas cepas se llevó a cabo por transducción con F1, encontrándose que en la cepa MX750 el marcador de termosensibilidad conferido por el  $\lambda$  integrado se encontraba altamente ligado a glnA. A partir de la cepa MX750 se obtuvo una derivada resistente a  $\lambda$ vir (MX751), la cual se obtuvo para evitar posteriores lisogenizaciones en experimentos

subsecuentes. El fenotipo y la actividad de GS de las cepas MX750 y MX751 se presenta en las Tablas 4 y 6 respectivamente. Ninguna de las dos cepas presentó actividad detectable de GS; por consiguiente, ambas fueron auxótrofos de glutamina. El hecho de estar lisogenizadas con  $\lambda$ kan2 les confirió resistencia a kanamicina, inmunidad a  $\lambda$  y termosensibilidad.

En la Tabla 5 se observa que al transducir la cepa MX751 a  $Gln^+$  el 77% de las transductantes adquirieron termoresistencia, lo cual era indicativo de que habían perdido el bacteriófago. El 77% de cotransducción obtenido nos indicó que el fago se encontraba integrado aproximadamente a 0.16 min del Tn5 insertado en el gene glnA de la cepa MX751.

El bacteriófago  $\lambda$  portado por la cepa MX751 no se encontró integrado en glnA. Este hecho nos permitió aislar una cepa que ya no requiriera glutamina para crecer y que sin embargo fuera  $\lambda$  lisogénica. La derivada  $Gln^+$  se obtuvo transduciendo la cepa MX751 a prototrofia para glutamina con P1 crecido en la cepa MX232 ( $Gln^+$ ). Todo el proceso se efectuó a 30°C y se aislaron transductantes que conservaron las características conferidas por la presencia del fago  $\lambda$ . De ésta

manera se aisló la cepa MX752 (zif: $\lambda$ kan2). Como se muestra en la Tabla 4, la cepa MX752 no requirió glutamina para crecer, pero resultó termosensible y  $\lambda^R$ . La actividad de GS de la cepa MX752 resultó comparable a la de la cepa silvestre MX615 (Tabla 6).

Se prepararon lisados de  $\lambda$  a partir de las cepas MX751 y MX752 por termoinducción. Estos resultados, presentados en la Tabla 7, nos indican que la producción de fago en éstas cepas resultó mucho menor que en una cepa lisogenizada en att $\lambda$ .

Esto puede deberse a que la integración del fago fue por recombinación entre el Tn5 de la bacteria receptora y el Tn5 portado por  $\lambda$  y no por recombinación integrativa al sitio att $\lambda$  convencional o a un sitio secundario, lo cual puede interferir con la expresión normal de los genes fágicos, ya que el arreglo lineal de éstos es diferente al integrarse el fago por recombinación en Tn5 que cuando se integra por recombinación en att $\lambda$ .

#### IV. Localización del profago $\lambda$ kan2 en la cepa MX751.

Por el uso que posteriormente se le daría

a la cepa MX752, nos interesaba saber de que lado de glnA se encontraba integrado el profago. Para dilucidar ésta cuestión se efectuó una cruce de cuatro puntos, utilizando como donadora de F1 la cepa JW164 (polA1 rha<sup>m</sup>) y como receptora la cepa MX751. Los resultados obtenidos (Tabla 8) nos indican que el  $\lambda$  parece estar integrado entre glnA y polA ya que el porcentaje de transductantes  $Gln^+$  que heredan al mismo tiempo la mutación polA1 y que adquieren termoresistencia es mayor que el de aquellas que siguen siendo termosensibles, lo cual concuerda con el orden previamente mencionado ya que es de esperarse que el tipo más frecuente de cotransductantes sean aquellas que sólo requirieran dos entrecruzamientos en tanto que para el menos frecuente es posible que se hallan requerido más de dos, i.e., cuatro. En la Fig. 4 se muestra un esquema de las diferentes proporciones de recombinantes que se esperarían si el fago  $\lambda$  se encuentra integrado a uno u otro lado de glnA.

#### V. Obtención y caracterización de cepas con deleciones en la región glnA del cromosoma de E. coli.

Para obtener deleciones que cubrieran

parcial o totalmente el gene glnA, se sometió la cepa MX752 a experimentos de curación de  $\lambda$  por pulsos de calor, esperándose que en ciertos casos la escisión del fago fuera incorrecta, lo que provocaría la producción de deleciones a uno u otro lado del sitio donde se encuentre integrado el fago en el cromosoma bacteriano. Posteriormente se efectuaron ciclos de enriquecimiento con penicilina para recuperar auxótrofos de glutamina, tal y como se describe en Material y Métodos.

De éste procedimiento se obtuvieron cinco mutantes. Con objeto de caracterizarlas se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

a) Caracterización fenotípica.-

Se llevaron a cabo experimentos de crecimiento de las cinco mutantes obtenidas en diferentes fuentes de nitrógeno. Los resultados se encuentran en la Fig. 5 y nos muestran que dos cepas, MX762 y MX764, solamente fueron capaces de crecer en presencia de glutamina. La cepa MX763 difiere de las dos anteriores ya que fue capaz de crecer en amonio como fuente de nitrógeno pero con una pendiente mucho menor que cuando se creció en presencia de glutamina. Las cepas MX768 y MX769 crecieron aproximadamente con la misma velocidad



en amonio o glutamina, solamente que la cepa MX768 requirió de una fase lag de 24 horas, para poder crecer en amonio.

Por otro lado, ya que la cepa MX752 de la cual se partió para obtener las deleciones, llevaba el fago lambda supuestamente flanqueado por dos transposones Tn5, las deleciones obtenidas pudieron generarse por eventos de recombinación entre  $\lambda$  y el cromosoma, lo cual da lugar a deleciones que eliminan parte del genoma de  $\lambda$  y se extienden a uno u otro lado del cromosoma. Esto dejaría uno de los Tn5 intacto y por consiguiente el fenotipo de la deleción resultante sería  $\text{kan}^R$  como ocurre en el caso de las cepas MX764, MX768 y MX769. Alternativamente, y ya que se sabe que a partir de los transposones también se generan deleciones (23), aquellas que se generaran a partir de uno de los dos transposones y que eliminaron todos los genes de  $\lambda$  y el otro Tn5 darían lugar a deleciones  $\text{kan}^S$ , i.e., MX762 y MX763.

Una característica típica de cualquier deleción es que éste tipo de mutaciones son incapaces de revertir al fenotipo original, ya que de las mutantes obtenidas, solamente dos: MX762 y MX764 fueron auxótrofos totales de glutamina la frecuencia de reversión a  $\text{Gln}^+$  únicamente se

pudo determinar en éstas cepas, encontrándose que fue  $4.55 \times 10^{-10}$ .

b) Actividad específica de GS.-

Posteriormente se procedió a determinar la actividad específica de GS que presentaban las mutantes obtenidas, crecidas en diferentes fuentes de nitrógeno, en comparación con la cepa silvestre. Los resultados (Tabla 9) nos indican que los dos auxótrofos totales, MX762 y MX764, no presentaron actividad detectable de GS, lo cual era de esperarse en vista de su incapacidad de crecer en amonio como fuente de nitrógeno, las cepas MX763 y MX769 presentaron una actividad baja constitutiva de GS, es decir, la actividad de GS fue la misma cuando las cepas se crecieron en una fuente limitante de nitrógeno (glutamina) o en exceso de nitrógeno (amonio 15 mM). La cepa MX768 difirió de todas las anteriores en que presentó una actividad de GS más alta cuando se creció en amonio que cuando se creció en glutamina, al contrario de lo que se observa en la cepa silvestre.

c) Inmunoprecipitación de GS.-

Con el objeto de determinar la capacidad de éstas cepas de producir un antígeno capaz de reaccionar con anticuerpo anti-GS, se llevó a cabo un experimento de inmunoprecipitación de

GS por la técnica de rocket, como se describe en Material y Métodos. En la Fig. 6 se muestra éste experimento, observándose que en tres de las mutantes: MX762, MX763 y MX764 no se encontró ningún antígeno detectable de GS. Este resultado se esperaba para las cepas MX762 y MX764 que no presentaron actividad de GS, pero no para la cepa MX763, ya que sabemos que ésta cepa sí presentó actividad de GS, aunque baja; existen dos posibles explicaciones para éste resultado: que el antígeno de GS presente en la cepa MX763 no sea suficiente como para ser detectado en éste tipo de ensayo o bien que la GS de ésta cepa haya quedado fusionada a otro producto, siendo la proteína total más grande e incapaz de reaccionar con anticuerpo anti-GS; para dilucidar entre éstas dos posibilidades es necesario purificar la GS de la cepa MX763 y determinar su peso molecular. Por otro lado se observa que la cepa MX768 presentó más antígeno de GS cuando se creció en amonio que cuando se creció en glutamina como fuente de nitrógeno, al contrario de lo que se observa en la cepa silvestre, éstos resultados están en concordancia con la actividad específica de GS detectada en ésta cepa. Una posible explicación para la regulación alterada de GS y el lag de crecimiento en amonio que se observa

en la cepa MX768, es que ésta cepa tenga alterada su capacidad de captar amonio del medio de cultivo, de tal manera que la célula sufre una privación de nitrógeno aparente e induce su GS; esto implicaría que en ésta cepa la regulación de GS no está alterada como tal, sino que lo que se observa es un efecto secundario de la capacidad disminuida de la célula para captar amonio. Por último se observa que la cepa MX769 sí presentó antígeno de GS con el mismo patrón que la cepa silvestre, o sea, mayor cantidad cuando las cepas fueron crecidas en glutamina que cuando fueron crecidas en presencia de amonio, aunque presentó una menor cantidad de antígeno de GS que la cepa silvestre, como se puede observar en la Fig. 6.

d) Fenotipo Reg.-

Ya que el gene glnG descrito por Tyler en E. coli (6) se encuentra localizado entre glnA y polA, al igual que el  $\lambda$  integrado en la cepa MX752 de la cual se partió para la obtención de las deleciones, existe la posibilidad de que algunas de nuestras deleciones cubrieran el gene glnG y glnA total o parcialmente. En vista de que el fenotipo de mutaciones en glnG reportado (6,7) involucra tanto un nivel bajo constitutivo de GS como la incapacidad de éstas mutantes de utilizar

aminoácidos tales como arginina o prolina como fuente de nitrógeno (fenotipo Reg<sup>+</sup>) procedimos a determinar la capacidad de nuestras mutantes de crecer en arginina como fuente de nitrógeno. Los resultados (Fig. 7) nos indican que todas las mutantes, a excepción de la MX769, presentaron el fenotipo Reg<sup>-</sup>. El hecho de que únicamente la cepa MX769 sea Reg<sup>+</sup>, a pesar de poseer un nivel bajo constitutivo de GS, sugiere la posibilidad de que éstos dos fenotipos se deban a productos de dos genes contiguos pero diferentes, siendo uno de ellos el responsable de la regulación de la síntesis de GS (junto con glnF) e interviniendo el otro en la utilización de otros aminoácidos como fuente de nitrógeno.

e) Mapeo por deleciones.-

Por último, con el objeto de determinar el tamaño de las diferentes deleciones, se efectuó el mapeo por deleciones entre las cepas que presentaban las distintas deleciones y dos mutantes puntuales en glnA. Los resultados se encuentran en la Tabla 10 y nos indican en primer lugar que las dos mutaciones puntuales se localizan en sitios diferentes dentro de glnA ya que pudieron obtenerse recombinantes Gln<sup>+</sup> entre ellas. En cuanto a las deleciones, la más grande parece ser la de la

cepa MX764 ya que ésta cepa no fue capaz de recombinar con ninguna de las dos mutantes puntuales utilizadas en las cruzas. Le sigue en tamaño la MX762, la cual sí fue capaz de recombinar con las dos mutantes puntuales, aunque sabemos que no presenta antígeno ni actividad de GS. Las cepas MX763 y MX769 también fueron capaces de recombinar con las dos mutantes puntuales y ambas presentaron un nivel bajo constitutivo de GS pero difirieron en que la primera es Reg<sup>-</sup> y la segunda Reg<sup>+</sup>. A partir de éstos datos podemos pensar que las deleciones presentes en éstas cepas no penetran al gene glnA pero sí a glnG, existiendo la posibilidad de que los fenotipos atribuidos a glnG sean la manifestación de dos diferentes genes cubriendo la deleción de la cepa MX769 solamente uno de ellos. También se observó que las cepas MX763 y MX769 fueron capaces de cruzar con las deleciones presentes en las cepas MX762 y MX764, esto no debería de suceder ya que todas las deleciones deben de cubrir la misma región debido a que todas fueron obtenidas a partir de la misma cepa. La explicación más simple para éstos resultados es que en éstas cruzas se están sustituyendo las deleciones más grandes por las más pequeñas, las cuales sí permiten el crecimiento de las cepas

en amonio como fuente de nitrógeno.

En resumen, en éste trabajo se presenta la obtención de mutantes en la región de los genes glnA y glnG del cromosoma de E. coli. Estas mutantes presentaron alteraciones en la actividad y regulación de la GS y posiblemente en el transporte y utilización de compuestos nitrogenados y de amonio. La obtención de un mayor número de deleciones y de mutantes puntuales, sobre todo en glnG nos permitirán efectuar pruebas de complementación cis-trans así como extender el mapeo por deleciones mediante análisis recombinacional, lo cual será de gran ayuda para el estudio de la regulación genética de la enzima GS y del metabolismo nitrogenado celular.

## BIBLIOGRAFIA

1. Tyler, B., "Regulation of the assimilation of nitrogen compounds", *Ann. Rev. Biochem.*, 47:1127, (1978).
2. Magasanik, B., Prival, K. J., Branchley, J. E., Tyler, B., DeLeo, A. B., Streicher, S. J., Bender, R. A. y Paris, C. G., "Glutamine synthetase as a regulator of enzyme synthesis", *Curr. Topics in Cell. Reg.*, 8:119, (1974).
3. Ginsburg, A., Stadtman, E. R., "Regulation of glutamine synthetase in *E. coli*", p. 9. En S. Prusiner, E. Stadtman (ed.) *The enzymes of glutamine metabolism*. Academic Press, Inc. N. Y. (1973).
4. Streicher, S. J., Bender, R. A., Magasanik, B., "Genetic control of glutamine synthetase in *K. aerogenes*", *J. of Bacteriol.*, 121:320, (1975).
5. Poor, F., Janseen, K. A., Magasanik, B., "Regulation of synthesis of glutamine synthetase by adenylylated glutamine synthetase", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 72:4844, (1975).
6. Pahel, G., Tyler, B., "A new *glnA* linked regulatory gene for glutamine synthetase in *E. coli*", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76:4544, (1979).
7. Kustu, S., Burton, D., Garcia, E., McCarter, L., McFarland, K., "Nitrogen control in *Salmonella*: regulation by the *glnR*-and *glnF* gene products", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76:4576, (1979).
8. Garcia, E., Bancroft, S., Rhee, S. G., Kustu, S., "The



- product of a newly identified gene, glnF is required for synthesis of glutamine synthetase in Salmonella", Proc.Natl.Acad.Sci., 74:1662, (1977).
9. Gaillardin, C.M., Magasanik, B., "Involvement of the product of the glnF gene in the autogenous regulation of glutamine synthetase formation in E.aerogenes", J.of Bacteriol., 133:1329, (1978).
10. Tyler, B., DeLeo, A.B., Magasanik, B., "Activation of transcription of hut DNA by glutamine synthetase", Proc.Natl.Acad.Sci., 71:225, (1974).
11. Shapiro, B.M., Stadtman, E.R., "Glutamine synthetase (E.coli). En: Methods in enzymology (H. Tabor y C.W. Tabor, eds.) vol. 17A, p.910, N.Y., Academic Press, (1970).
12. Lowry, O.H., Rosebrogh, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., "Protein measurements with the Folin phenol reagent", J.Biol.Chem., 193:265, (1951).
13. Mayer, E.F., Smith, C.H., Fredricks, W.W., McKinney, M.A. "The isolation and characterization of glutamine-requiring strains of E.coli", Molec.Gen.Gen., 137: 131, (1975).
14. Shimada, K., Weiberg, R.A., Gottesman, M.E., "Prophage  $\lambda$  at unusual chromosomal locations I. Location of the secondary attachment sites and the properties of lysogens", J.Mol.Biol., 63:483, (1972).
15. Weeks, B., "Rocket immunoelectrophoresis" In: A manual of quantitative immunoelectrophoresis (B.K. Axelsen, J.Kroll, B.Wecke, eds.) p.37. Oslo: Universitetsforlaget, (1973).

16. Stadtman, E. R., "Mechanisms of enzyme regulation in metabolism", p. 397, In: The enzymes, vol. 1, Boyer, P. D. (ed.), Academic Press, Inc., N. Y., (1970).
17. Pahel, G., Bloom, F. R., Tyler, B., "Deletion mapping of the polA-metE region of the E. coli chromosome", J. of Bacteriol., 138:653, (1979).
18. Wu, T. T., "A model for three-point analysis of random general transduction", Genetics, 54:405, (1966).
19. Miller, J. H., Experiments in molecular genetics, 2<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., (1972).
20. Covarrubias, A. A., Sánchez-Pescador, R., Osorio, A., Bolívar, P., Bastarrachea, F., "Col E1 hybrid plasmids containing E. coli genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine", 3, (1980), en prensa.
21. Swanstrom, M., Adams, M. H., "Agar layer method for production of high titer phage stocks", Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 78:372, (1951).
22. Bender, R. A., Janssen, K. A., Resnick, A. D., Blumenberg, M., Foor, F., Magasanik, B., "Biochemical parameters of glutamine synthetase from I. aerogenes", J. of Bacteriol., 129:1001, (1977).
23. Kleckner, N., Roth, J., Botstein, D., "Genetic engineering in vivo using translocatable drug-resistance elements", New methods in Bacterial Genetics, (1977).

TABLA 1

CEPAS BACTERIANAS Y BACTERIOFAGOS

<u>Cepa</u>	<u>Genotipo relevante</u>
C127	<u>chlB</u>
K184	<u>old5 rha4</u>
JW164	<u>polA1 rha</u>
CSH25	<u>SuIII<sup>+</sup></u>
MX232	silvestre
MX295	<u>trpA540</u>
MX705	<u>glnA20</u>
MX615	( <u>gal</u> <u>psl</u> <u>attλ bio</u> )
MX727	igual a MX615, con <u>glnA21::Tn5</u>
MX747	igual a MX727, -con <u>trpA540</u>
MX748	igual a MX727, con <u>SuIII<sup>+</sup></u> y <u>Tn5</u> duplicado en otra región del cromosoma.
MX750	MX748 lisogenizada con <u>λkan2</u>
MX751	derivada <u>λvir<sup>R</sup></u> de MX750
MX752	derivada <u>Gln<sup>+</sup></u> de MX751
MX762	derivadas <u>Gln<sup>-</sup></u> obtenidas por curación de <u>λ</u> por pulsos de calor de MX752
MX763	
MX764	
MX768	
MX769	

Bacteriófagos

P1	CM clr 100
P1	vir
<u>λkan2</u>	<u>b512 b518 c1857 S7</u>
<u>λ</u>	vir

TABLA 2

MAPA POR TRANSDUCCION DEL GENE glnA CON  
RESPECTO A old, polA, chlB y rha

Donador P1	Receptor	Selección	No col. probadas	% de			
				<u>Gln</u> <sup>-</sup>	<u>Pol</u> <sup>-</sup>	<u>Chl</u> <sup>R</sup>	<u>Rha</u> <sup>-</sup>
C127 ( <u>chlB</u> )	KX705 ( <u>glnA20</u> )	<u>Gln</u> <sup>+</sup>	200	-	-	20	-
K184 ( <u>old rha</u> )	KX705	<u>Gln</u> <sup>+</sup>	344	52	-	-	7
JR164 ( <u>polA rha</u> )	KX705	<u>Gln</u> <sup>+</sup>	208	-	60	-	-
C127	K184	<u>Rha</u> <sup>+</sup>	98	97	-	45	-



TABLA 3

FRECUENCIAS DE COTRANSDUCCION E INTERVALOS DE  
 MAPA ENTRE GENES LIGADOS EN LA REGION DEL GENE  
glnA EN EL CROMOSOMA DE Escherichia coli

GENES	FRECUENCIA DE COTRANSDUCCION (%)	DISTANCIA ENTRE LOS GENES (min)
<u>glnA-old</u>	46	0.46
<u>glnA-rha</u>	7	1.15
<u>glnA-chiB</u>	20	0.82
<u>old-rha</u>	2.5	1.41
<u>rha-chiB</u>	45	0.47
<u>glnA-polA</u>	60	0.31

TABLA 4

CARACTERIZACION FENOTIPICA DE MUTANTES QUE  
REQUIEREN GLUTAMINA PARA CRECER

	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> kan		gln		gln kan		Akan2
	30°	42°	30°	42°	30°	42°	30°	42°	
MX615	+	+	-	-	+	+	-	-	
MX727	-	-	-	-	+	+	+	+	
MX747	-	-	-	-	+	+	+	+	
MX748	-	-	-	-	+	+	+	+	
MX750	-	-	-	-	+	-	+	-	imm
MX751	-	-	-	-	+	-	+	-	imm, resist.
MX752	+	-	+	-	+	-	+	-	imm, resist.

TABLA 5

LOCALIZACION DE Tn5 POR TRANSDUCCION

Donador P1	Receptor	Selección	No col. probadas	% de Kan <sup>S</sup> Temp. <sup>R</sup>
MX232	MX727	Gln <sup>+</sup>	104	100
MX232	MX747	Gln <sup>+</sup>	50	98
MX232	MX748	Gln <sup>+</sup>	104	48
MX232	MX751	Gln <sup>+</sup>	104	76 77

TABLA 6

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE  
GLUTAMINO SINTETASA

CEPA	FUENTE DE NIT.	TEMP.	-Mg	+Mg
MX655	glutamina	37°	0.52	0.3
MX727	glutamina	37°	<0.01	<0.01
MX747	glutamina	37°	<0.01	<0.01
MX748	glutamina	37°	<0.01	<0.01
MX750	glutamina	30°	<0.01	<0.01
MX615	amonio	30°	0.082	0.027
MX615	glutamina	30°	0.27	0.18
MX752	amonio	30°	0.099	0.017
MX752	glutamina	30°	0.43	0.018



TABLA 7

OBTENCION DE LISADOS DE  $\lambda$  A  
PARTIR DE CEPAS LISOGENIZADAS  
CON  $\lambda$ Kan2

---

CEPA	TITULO (pfu/ml)
MX751	$6.7 \times 10^5$
MX752	$3.8 \times 10^5$
$\lambda$ Kan2*	$1.62 \times 10^{10}$

---

\*cepa lisogenizada en att $\lambda$

TABLA 8

LOCALIZACION DE  $\lambda$  EN LA CEPA MX751

	<u>polA</u>	<u>t<sup>R</sup></u>	<u>glnA</u>	<u>rha</u>
Donador P1 JW164	-	+	+	-
Receptor MX751	+	-	-	+

<u>polA</u>	<u>t<sup>R</sup></u>	<u>glnA</u>	<u>rha</u>	No transd.
-	+	+	-	8
-	-	+	-	7
-	+	+	+	43
-	-	+	+	16
+	+	+	+	20
+	-	+	+	4
+	+	+	-	4
+	-	+	-	<u>2</u>
				104

No de transductantes que heredaron los

caractéres del donador:

Seleccionado: Gln<sup>+</sup>, 104

No seleccionado: PolA<sup>-</sup>, 74

t<sup>R</sup>, 75

Rha<sup>-</sup>, 21

TABLA 2

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE  
GLUTAMINO SINTETASA

CEPA	FENOTIPO	FUENTE DE		
		NITROGENO	-Mg	+Mg
MX615	silvestre	amonio	0.08	0.03
		glutamina	0.52	0.3
MX762	auxótrofo	glutamina	<0.01	<0.01
MX763	bradítrofo	amonio	0.04	0.01
		glutamina	0.02	0.02
MX764	auxótrofo	glutamina	<0.01	<0.01
MX768	bradítrofo	amonio	0.38	0.05
		glutamina	0.17	0.09
MX769	bradítrofo	amonio	0.04	0.01
		glutamina	0.06	0.01

TABLA 10

MAPEO POR DELECCIONES DE LA REGION DEL GENE  
glnA DEL CROMOSOMA DE E. coli\*

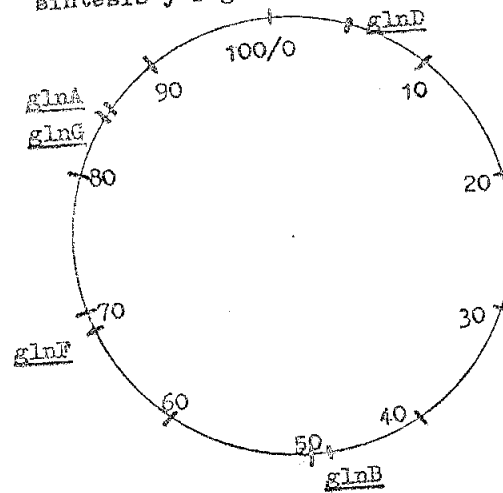


Donador P1	Receptor	No Transd./10 <sup>6</sup> P1
MX705	MX727	1.28
MX727	MX705	0.06
MX705	MX762	0.44
MX727	MX762	0.28
MX705	MX764	<0.01
MX727	MX764	<0.01
MX763	MX705	6.46
MX763	MX727	13.71
MX763	MX762	16
MX763	MX764	1.03
MX769	MX705	9
MX769	MX727	13
MX769	MX762	23
MX769	MX764	1.04

\*En todas las cruzas el fenotipo seleccionado fue Gln<sup>+</sup>

Figura 1

Localización cromosómica de genes involucrados en  
síntesis y regulación de GS



glnA-codifica para la enzima GS

glnB-codifica para la proteína FII

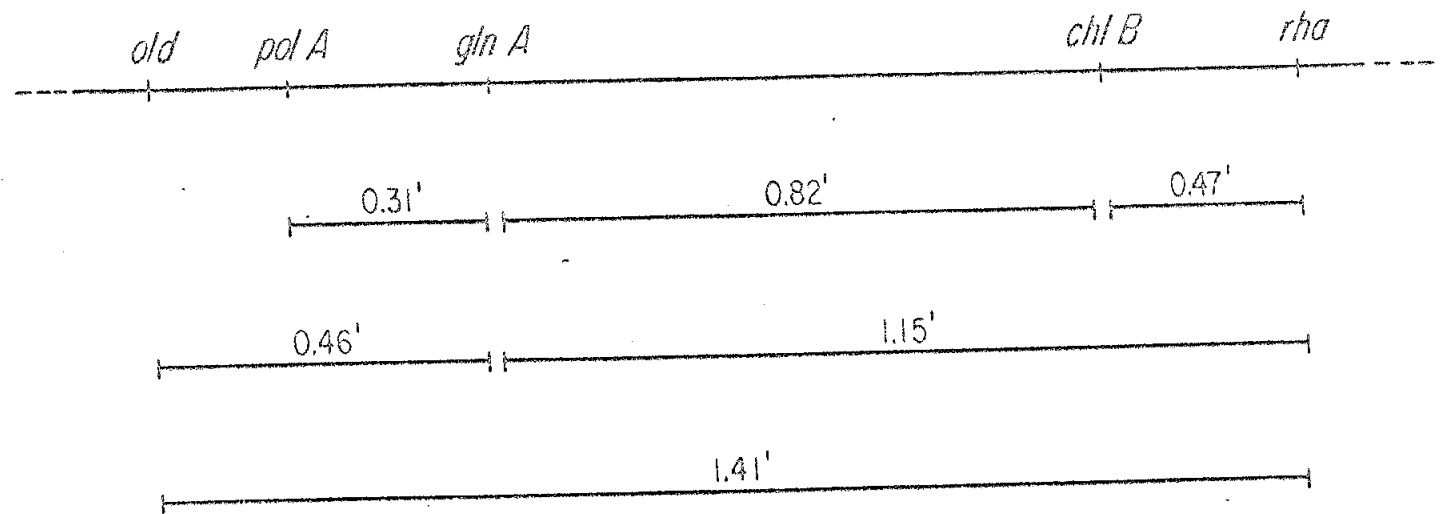
glnC-codifica para la uridilil-transferasa

glnF-codifica para una proteína que se requiere para activar la transcripción de glnA

glnG- gene que supuestamente codifica para una proteína necesaria (junto con el producto de glnF) para activar la transcripción de glnA

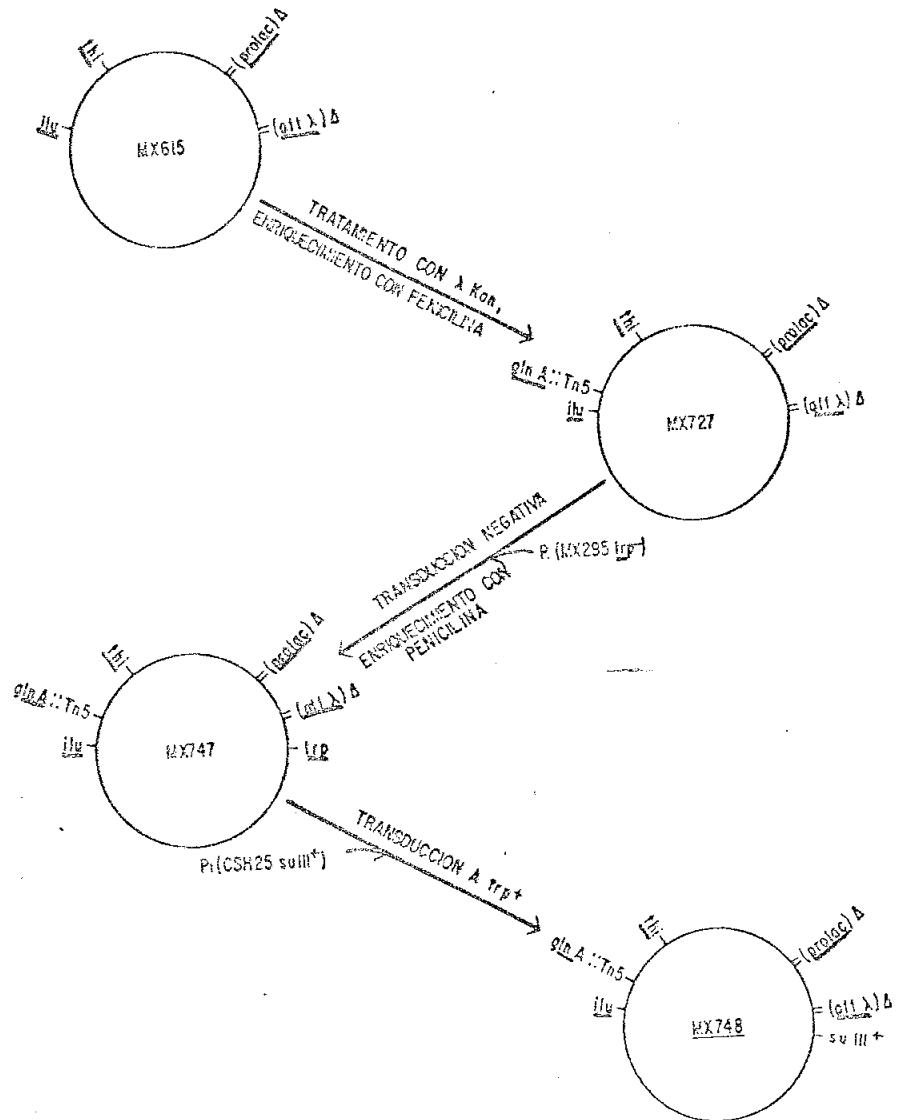
Figura 2

ORDEN DE GENES EN LA REGION DEL GENE *gln A* DEL CROMOSOMA DE *E. coli*



ESTRATEGIA PARA LA OBTENCION DE UNA CEPA CON Kan<sup>r</sup>,  
 (att $\lambda$ )  $\Delta$  Y su III<sup>+</sup>

Figura 3



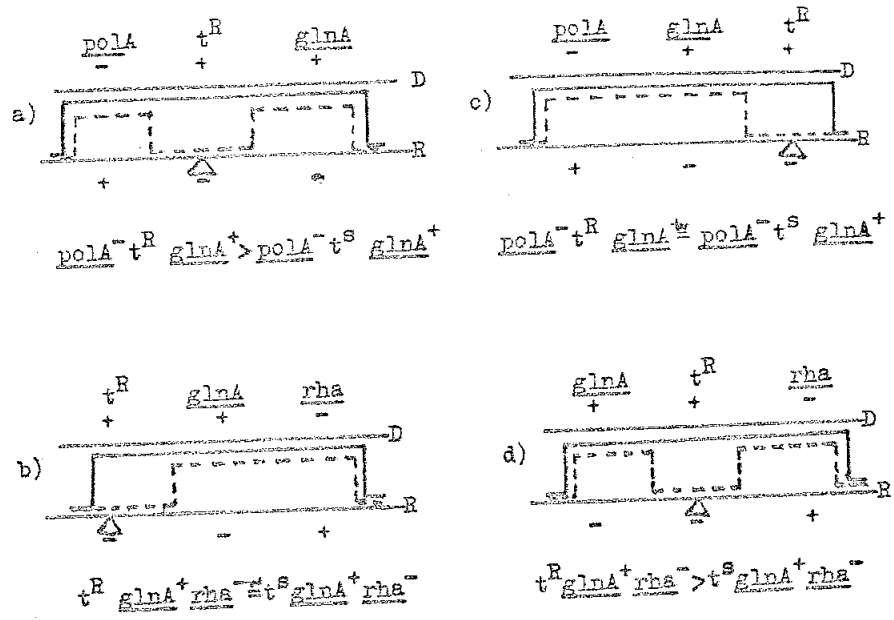


Figura 4

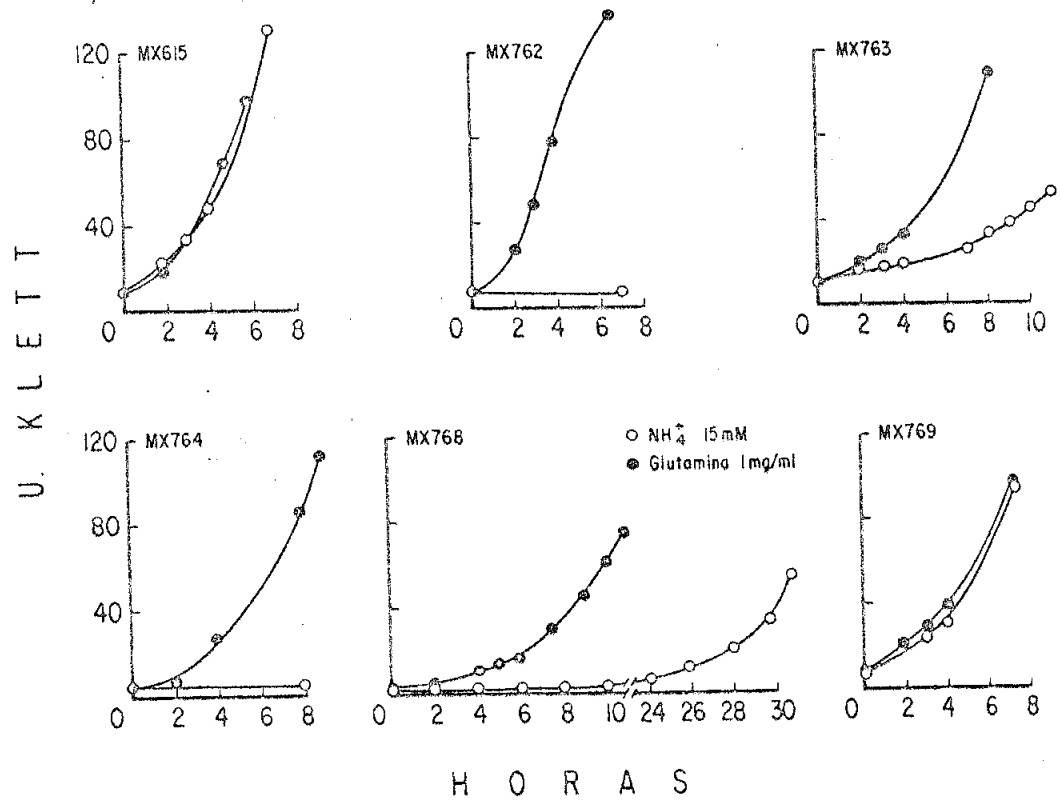
Número de entrecruzamientos esperados cuando  $\lambda(t^S)$   
 se encuentra integrado entre polA y glnA o  
 entre glnA y rha

Si el orden de los genes es: polA  $t^S$  glnA rha,  
 entonces las frecuencias esperadas son las de a) y b).  
 Si el orden de los genes es: polA glnA  $t^S$  rha, entonces  
 las frecuencias esperadas son las de c) y d).



Figura 5

CRECIMIENTO DE CEPAS OBTENIDAS POR CURACION DE LAMBDA POR PULSO DE CALOR EN DIFERENTES FUENTES DE NITROGENO



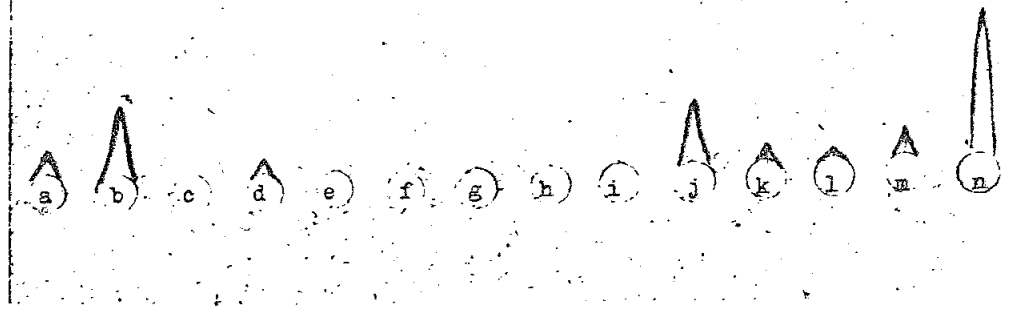


Figura 6

Inmunoprecipitación de GS

- |                                     |                          |
|-------------------------------------|--------------------------|
| a) MX615 $\text{NH}_4^+$ 15mM       | i) MX763 glutamina       |
| b) MX615 glutamina 1mg/ml           | j) MX768 $\text{NH}_4^+$ |
| c) MX705 glutamina+ $\text{NH}_4^+$ | k) MX768 glutamina       |
| d) MX705 glutamina                  | l) MX769 $\text{NH}_4^+$ |
| e) MX727 glutamina                  | m) MX769 glutamina       |
| f) MX762 glutamina                  | n) GS pura               |
| g) MX764 glutamina                  |                          |
| h) MX763 $\text{NH}_4^+$            |                          |

FENOTIPO Reg DE MUTANTES OBTENIDAS POR CURACION CON UN PULSO DE CALOR DE LA CEPA MX752 (zif::xkan 2)

Figura 7

