



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Facultad de Ciencias

**" REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL OPERÓN DE LA
ASPARAGINASA II DE *Rhizobium etli* ".**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(ORIENTACIÓN EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIOL. ANGÉLICA MORENO ENRÍQUEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA ELENA FLORES CARRASCO

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE 2009.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Doctora María Elena Flores Carrasco en el departamento de Biotecnología y Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Durante el desarrollo de éste trabajo gocé de una beca otorgada por CONACYT (168696), así como por un apoyo complementario por DGAPA, UNAM.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo integrado por:

Dr. Fernando Bastarrachea Avilés	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Dr. Ismael Hernández Lucas	Instituto de Biotecnología, UNAM.
Dra. María Elena Del Carmen Carrasco Flores	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Los miembros del jurado del Examen para obtener el grado de Maestra en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del Posgrado en Ciencias Biológicas, estuvo integrado por:

Dr. Fernando Bastarrachea Avilés	Presidente
Dr. Miguel Ángel Ramírez Romero	Vocal
Dra. María Elena Del Carmen Flores Carrasco	Secretario
Dr. Luis Servín González	Suplente
Dr. Ismael Hernández Lucas	Suplente

Agradezco a todos por sus acertadas críticas durante mi formación académica así como a la revisión de la presente tesis.

¿Cuándo te conviertes en adulto?
Cuando dejas de ser libre.
Y eso mamá, ¿cuándo sucede?
En el momento que te importa más ser admirado
por lo que tienes, que por lo que vales.
Sucede cuando te importa más lo que los demás piensan de tí...
Se libre y deja libres a los demás !!!!

Relato en una de esas tardes en la hermosa costa yucateca,
entre una mamá que se niega a ser adulto y sus hijos de ojos
grandes.

LIAM Y NAIMA LOS AMO !!!
POR SIEMPRE Y PARA SIEMPRE.

ZAHAED

Este trabajo también es tuyo,
Por fin!!!

POR QUE TE QUIERO A TI, POR QUE TE QUIERO,
CERRE MI PUERTA UNA MAÑANA Y ECHE A ANDAR
POR QUE TE QUIERO A TI, POR QUE TE QUIERO
DEJÉ EL D.F. Y ME VINE AL MAR... (Serrat).

ABUELOS MOY Y BETY

Los hijos caminan, se alejan y nunca regresan,
los mantiene andando la necesidad de cada vez hacerlo mejor,
así como me enseñaron, ARRIBA Y ADELANTE!!!.
LOS AMO Y LOS ECHO MUCHO DE MENOS
(menos los domingos!!!!!!).

TITOS

Quién diría que llegaríamos tan lejos... hasta Yucatán! i i
POR SIEMPRE GRACIAS i!!!
LOS QUIERO.

Hace mucho tiempo llegué a Biomédicas.
Me sentí feliz en mi laboratorio nuevo con mis
Amables compañeros,
pero. . . nunca imagine cuanto tiempo tardaría en salir!!!!

A todos los que compartimos el laboratorio, el café y unos
buenos agarrones, los echaré siempre de menos. Así cual nódulo . . .

Socorro, Osvaldo, Gisela, Alejandro Huerta, Alejandra Huerta, Arturo
Calderón, Daniel Barrón y claro a Leobardo (por que no!!!!).

Gracias a la Doctora María Elena Flores por apoyarme para concluir el
trabajo experimental, así como las aportaciones a la presente.

Agradezco muy especialmente al Dr. Luis Servín González, que me
permitió trabajar en su laboratorio y me facilitó todas las herramientas
y recursos para ello.

Gracias a Laurita Dávalos y Alejandro Huerta por su exitoso trabajo de
office-boy, muy agradecida por su asistencia vital para cumplir con éste
objetivo. No lo vuelvo a hacer i!!!.

ORGULLOSAMENTE PUMA !!!

If I believe in God,

If I believe in sin,

This is the place where I'll be suck
straight to hell. . .

If I belived in the Hell

"Dearly Devoted Dexter"
Jeff Lindsay.

INDICE

<u>I. RESUMEN</u> _ _ _ _ _	1
<u>II. ABSTRACT</u> _ _ _ _ _	3
<u>III. INTRODUCCION</u>	
III. 1. El género <i>Rhizobium</i> _ _ _ _ _	5
III. 2. Metabolismo de aminoácidos_ _ _ _ _	11
III. 3. Metabolismo de asparagina en <i>Rhizobium etli</i> _ _ _ _ _	13
<u>IV. ANTECEDENTES</u>	
IV. 1. Regulación del catabolismo de asparagina en <i>Rhizobium etli</i> _ _ _ _ _	16
IV. 2. Proteínas represoras homólogas a AnsR _ _	23
IV. 3. Regulación de asparaginasas en otros organismos _ _ _ _ _	27
<u>V. JUSTIFICACIÓN</u> _ _ _ _ _	31
<u>VI. OBJETIVOS</u> _ _ _ _ _	33
<u>VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</u>	
VII. 1. Bacterias y procedimientos microbiológicos _	34
VII. 2. Condiciones y medios de crecimiento _ _ _	35
VII. 3. Plásmidos y oligonucleótidos _ _ _ _ _	36
VII. 4. Sobre-expresión de la proteína AnsR _ _ _	39
VII. 5. Purificación de la proteína AnsR por	

cromatografía de afinidad _ _ _ _ _	40
VII. 6. Construcciones de fusiones transcripcionales <i>ansP::gusA</i> _ _ _ _ _	41
VII. 7. Mutagénesis sitio dirigida _ _ _ _ _	43
VII. 8. Determinación de la actividad de β - glucuronidasa _ _ _ _ _	44
VII. 9. Determinación del sitio de inicio de la transcripción _ _ _ _ _	45

VIII. RESULTADOS

VIII. 1. Expresión del represor AnsR _ _ _ _ _	47
VIII. 2. Determinación de los elementos regulatorios en el promotor del operón <i>ans</i> _ _ _	50
VIII. 3. Determinación del sitio de inicio de la transcripción _ _ _ _ _	55
VIII. 4. Evaluación de la importancia en la región - 35 en el promotor _ _ _ _ _	60

IX. DISCUSIÓN _ _ _ _ _

X. CONCLUSIONES _ _ _ _ _

XI. BIBLIOGRAFÍA _ _ _ _ _

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

FIGURAS

1. Ruta catabólica y anabólica de la asparagina en <i>R. etli</i> _ _	15
2. Análisis del operón <i>ans</i> mediante RT-PCR _ _ _ _ _	21
3. Región intergénica entre los genes <i>ansR-ansP</i> del operón <i>ans</i> . Uso de oligonucleótidos para fusiones transcripcionales.	53
4. Actividad de β -glucoronidasa de las cepas mutantes. Efecto de las deleciones sobre la actividad enzimática _ _ _	54
5. Mapeo de alta resolución por nucleasa S1 de los transcritos obtenidos en las cepas de <i>R. etli</i> CE3 y la mutante AHZ7 _ _	61
6. Alineamiento de la región promotora del operón <i>ans</i> con otros promotores identificados experimentalmente así como promotores identificados usando el software WCONCESUS version v5c _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _	65

TABLAS

1. Lista de plásmidos contruidos _ _ _ _ _ _ _ _ _ _	37
2. Lista de oligonucleótidos _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _	38

I. RESUMEN

Rhizobium etli crece en asparagina como única fuente de carbono y nitrógeno, la cual es catabolizada por la acción de los genes que constituyen el operón *ans*. La expresión del operón se encuentra regulada negativamente por la fuente de carbono y probablemente la represión se lleve a cabo por la proteína AnsR codificada por el gen *ansR* que está localizado río arriba del operón *ans*. En estudios previos se mostró por análisis de secuencia la presencia de dos probables regiones conservadas homólogas a las cajas -12 y -24 de *Escherichia coli* lo que sugería que la expresión era dependiente del factor transcripcional sigma 54, sin embargo no fue comprobado experimentalmente. En ese sentido poco se ha estudiado acerca de la regulación a nivel transcripcional de los genes que participan en el catabolismo de aminoácidos en rizobiáceas, así como de los elementos regulatorios presentes en las regiones promotoras. El presente estudio tuvo por objetivo determinar a nivel molecular los elementos regulatorios de la expresión del operón *ans* de *Rhizobium etli*. Para cumplir lo anterior se analizó la región promotora del operón *ans* mediante delecciones de diferentes fragmentos de DNA fusionándolos al gen *uidA*. Se determinó la actividad enzimática de β -glucoronidasa en células transformadas de *R. etli* CE3 con las diferentes construcciones. Además, se identificó el sitio de inicio de la transcripción por experimentos de nucleasa S1. La mutante pAM53-70 mostró actividad enzimática similar a la actividad obtenida con la región promotora completa, mientras que en pAM53-110 la actividad enzimática se

abate completamente; esto sugirió la existencia de otros elementos que regulan la transcripción del operón. La mutante pAM53-INV mostró actividad de β -glucuronidasa a niveles bajos similares a los obtenidos únicamente con el vector; este resultado sugiere que para la expresión es importante la dirección y posición de la región promotora respecto al operón. Al identificar el sitio de inicio de la transcripción se observaron las secuencias TCTATT y CTTGAC, elementos que mostraron consenso con los sitios -10 y -35 para promotores de *R. etli* dependientes del factor sigma 70 (SigA) y que se localizaron a 8 y 17 pb del inicio de la transcripción. La mutación de la región -35 identificada mostró una expresión de β -glucuronidasa completamente afectada, lo que confirma la importancia de la región para la expresión del operón. Aunado a lo anterior, en células crecidas en MM con asparagina se observó que la molécula indujo la expresión del operón *ans* a nivel transcripcional, mientras que en células crecidas en medio PY y MM más succinato la expresión se ve reprimida. Estos resultados refuerzan la idea de trabajos previos respecto a la existencia de represión catabólica por la fuente de carbono y se confirma que la asparagina es el inductor de la expresión del operón a nivel transcripcional.

Por los resultados obtenidos se concluye que la expresión del operón *ans* de *R. etli* es dependiente del factor transcripcional sigma⁷⁰ en lugar del factor sigma⁵⁴, bajo las condiciones experimentales utilizadas. La expresión del operón se encuentra regulado negativamente por la fuente de carbono y es inducida por asparagina.

II. ABSTRACT

Rhizobium etli grows in asparagine as a sole carbon and nitrogen source through the action of the genes of *ans* operon. Asparagine induce the expression of the operon, but the transcription seems to be negatively regulated by the carbon source and by the repressor protein AnsR, encoded by the *ansR* gene located upstream of the operon. The intergenic region between the operon and *ansR* showed the presence of two conserved regions, the -12 and -24 boxes similar to the *Escherichia coli* homologues, which suggested that transcriptional expression, was dependent of the transcriptional factor sigma⁵⁴. In these sense, has been little studied the transcriptional regulation of the genes and the elements involved in the catabolism of amino acids in rhizobiaceas. The goal of the present investigation was established at molecular level the regulatory elements important for the operon expression. In the present work, the promoter region of the *ans* operon was evaluated by making different deletions in the promoter and fused to *uidA* gene; the enzymatic activity of β -glucoronidase was determinate in cells of *R. etli* CE3 carrying the fusions cloned in pBBMCS53. Also, the transcriptional start site was determinate by high resolution nuclease-S1 mapping. The pAM53-70 mutant showed β -glucoronidase activity to levels similar to wild-type fusion, meanwhile mutant pAM53-110

shown reduced activity to vector alone; the above mention suggested the presence of new elements in the promoter region which governs the transcription activity of the promoter. The mutant pAM53-INV showed low levels of β -glucuronidase, which suggested the importance of direction and position of the promoter elements for full activation. Sequence analysis of the upstream region of the start site showed the presence of the sequences TCTATT and CTTGAC located at 8 and 17 bp respect the transcription start site, which resembles the -10 and -35 elements of sigma⁷⁰ (SigA) dependent promoters of *R. etli*. Site-directed mutagenesis of -35 regions showed low level expression of β -glucuronidase, which confirms the importance of the element for full-activation. In addition, it was shown that cells grown in MM plus asparagine as a sole carbon and nitrogen source induced the transcription of the *ans* operon, meanwhile cells grown in PY and MM plus succinate repressed it. These results reinforce the preliminary work regarding the existence of catabolic repression by the carbon source and confirm that asparagine is the molecule inductor. The conclusion of the present work is that expression of operon *ans* is dependent of sigma⁷⁰ factor instead sigma⁵⁴. Also, the expression is regulated negatively by the carbon source and is induced by asparagine.

III. INTRODUCCIÓN

III. 1. EL GÉNERO RHIZOBIUM.

El género *Rhizobium* es un grupo de α -proteobacterias, gram negativas, aerobias, no formadores de esporas, que presentan forma bacilar y que se mueven por medio de 1-6 flagelos peritricos y en algunos de ellos se han descrito fimbrias (27). Las colonias que crecen en medios de cultivo sintéticos son generalmente blancas o de color beige, circulares, cóncavas, semi-translúcidas u opacas y mucilaginosas. Son quimio-organotróficas y pueden emplear una amplia variedad de fuentes de carbohidratos y ácidos orgánicos como fuente de carbono y energía. Cuando estas bacterias crecen en un medio rico en carbohidratos excretan abundante cantidad de polisacáridos. Algunas cepas requieren biotina, ácido nicotínico pantotenado o tiamina como factores de crecimiento. Cerca del 90% de las especies pueden nodular en raíces o tallos de las leguminosas y se establecen dentro de estas estructuras en donde proliferan, se diferencian y fijan nitrógeno (27).

Existen 10 especies del género que resultan importantes por la función que llevan a cabo, entre ellas están: *Rhizobium leguminosarum* (especie tipo), *R. etli*, *R. galegae*, *R. gallicum*, *R. giardinii*, *R. hainanense*, *R. huautlense*, *R. indigoferae*, *R. loessense*, *R. mongolense*, *R. sullae*, *R. tropici* y *R. yanglingense* (54). Estas especies nodulan diferentes leguminosas que habitan zonas templadas, tropicales o subtropicales, aunque la riqueza de rizobias es mayor en ésta última concordante con la mayor riqueza de leguminosas en estos climas (57). Entre las especies antes mencionadas, *R. etli* es importante en México así como en América Latina, ya que esta especie predomina en los nódulos del frijol (*Phaseolus vulgaris*) (54).

Esta bacteria saprófita cuando está en vida libre presenta movilidad y se alimenta de los remanentes de los organismos muertos (39) así como de los muchos elementos nutritivos que se encuentran en la periferia de las raíces, entre ellos ácidos dicarboxílicos, vitaminas y

aminoácidos (35). En esta condición no puede fijar nitrógeno y su morfología es diferente de cuando está en los nódulos de la raíz.

Las raíces de las leguminosas exudan además flavonoides los cuales son utilizados como señal de inicio de la interacción simbiótica. Las bacterias del género *Rhizobium* tienen una proteína de membrana (NodD) que reconoce el flavonoides específico, lo que genera la activación de genes involucrados en la nodulación (*nod*). Los factores de nodulación (Nod) inician los cambios necesarios para la formación del nódulo en las raíces de las plantas (3) iniciándose el proceso de colonización a través de aberturas en las células vegetales o formación de pequeñas acumulaciones bacterianas en las raíces. La función de los factores Nod es curvar a los pelos radiculares donde se realiza una hidrólisis local de las paredes de las células vegetales en la región deformada la membrana plasmática sufre invaginación y se forma el hilo de infección (35) además se desarrollan nuevas células meristemáticas, lo que formará el nódulo (40). Las bacterias son

endocitadas por las células vegetales, y rodeadas por la membrana peribacteroidal, en donde las bacterias se transforman irreversiblemente a bacteroides que se especializan como fijadores de nitrógeno, modifican su metabolismo y pierden la capacidad de la división celular (35 y 47). Los genes que están directamente involucrados en la fijación de nitrógeno se conocen como *nifHDK* que codifican para el complejo proteico denominado nitrogenasa. En el nódulo se encuentran las condiciones microóxicas requeridas para que funcione el complejo de la nitrogenasa (33). En condiciones limitantes de nitrógeno se afecta la expresión de genes, proceso que es conocido como respuesta a nitrógeno (Ntr) y la proteína NifA activa la transcripción de varios genes de fijación de nitrógeno (14).

Este evento de formación del nódulo requiere de una alta especificidad entre la leguminosa y la bacteria, lo que significa que una especie de leguminosa establece simbiosis con un limitado número de especies de rizobias o solamente con una de ellas (31).

Las bacterias que fijan nitrógeno en simbiosis y la planta que las hospeda llevan a cabo una compleja relación simbiótica en la que se ponen en juego una red compleja de redes metabólicas y genéticas que se encuentran estrictamente coordinadas entre ellos (6). Durante el proceso de formación del nódulo se realiza un intercambio metabólico entre la planta y la bacteria (40) en las primeras etapas de interacción los aminoácidos alimentan a las bacterias en los hilos de infección una vez que ha concluido la formación de nódulos, la planta le proporciona ácidos dicarboxílicos (malato, succinato y fumarato) como fuente de carbono durante la fijación de nitrógeno (37 y 8) los cuales son incorporados al bacteroide mediante un transportador llamado DctA (permeasa de alta afinidad por ácidos dicarboxílicos) ubicado en la membrana peribacteroidal (4). Recientemente, se mencionó que la planta provee al bacteroide de compuestos de carbono y glutamato, mientras que el bacteroide le regresa amonio, glutamato, aspartato y alanina (30, 39 y 40). El amonio es obtenido mediante la reducción de nitrógeno atmosférico por medio del sistema proteico denominado nitrogenasa y asimila amonio por la vía glutamina sintetasa-glutamato

(GS-GOGAT), el cual es cedido a la planta mediante el transportador *Amt B* (37). El intercambio metabólico establecido entre la planta y los bacteroides es el objetivo primordial de la relación simbiótica (2).

Se ha observado que el metabolismo de aminoácidos es un factor limitante para la fijación de nitrógeno ya que participan en procesos de intercambio con la planta con los que la simbiosis podría controlarse metabólicamente (24) por lo que a cambio del amonio que los bacteroides proporcionan a las plantas, los bacteroides reciben compuestos con carbono y nitrógeno (como aminoácidos). Si los bacteroides dejaran de fijar nitrógeno, la planta reduciría la síntesis de aminoácidos y cortaría el flujo de energía limitando a los bacteroides (24). Este modelo de intercambio metabólico sobre la degradación de aminoácidos y la fijación simbiótica de nitrógeno se ha estudiado en *S. meliloti*. Rastogi y Watson (43) obtuvieron una mutante de aspartato transaminasa A (*AatA*), enzima que permite utilizar a ese aminoácido como única fuente de carbono y nitrógeno, la mutación de ese gen provoca una fenotipo Fix⁻. La mutante *aatA* de *R. leguminosarum*

también en Fix- (30). Otras dos aminotransferasas de aspartato se han descrito en *S. meliloti*, pero ninguna de ellas es importante para la relación simbiótica (43). En *R. etli* también se han estudiado las vías de degradación de asparagina y glutamina y en ambos casos las mutantes afectadas en la expresión de las enzimas que los catabolizan, asparaginasa y glutaminasa respectivamente, nodulan y fijan nitrógeno igual que la cepa silvestre (16 y 7).

Lo anterior puntualiza la importancia del metabolismo y el transporte de aminoácidos durante la fijación de nitrógeno, siendo ambas actividades quienes limitan la asimilación del nitrógeno atmosférico como consecuencia de la regulación de la expresión de diferentes genes que participan en la degradación de los aminoácidos (28 y 52).

III. 2. METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS.

Los aminoácidos tienen una función importante como precursores para la síntesis de proteínas, componentes nitrogenados y

diferentes metabolitos como vitaminas, lípidos, carbohidratos, nucleótidos y muchos metabolitos secundarios. Los esqueletos de carbono de los aminoácidos son degradados a metabolitos para ser oxidados a CO_2 y H_2O para generar ATP o para la gluconeogénesis. Cada uno de los 20 aminoácidos tiene su propia ruta catabólica, pero los 20 convergen en 5 intermediarios que participan en el ciclo del ácido cítrico. Estos esqueletos de carbono que entran al ciclo del ácido cítrico pueden ser completamente oxidados a CO_2 o desviados a gluconeogénesis o cetogénesis (60). Mediante el catabolismo de los aminoácidos glucogénicos, los cuales producen α -cetoácidos cuando están deamidados, se producen metabolitos como: piruvato, α -cetoglutarato, succinyl CoA, fumarato u oxalacetato. Los aminoácidos asparagina y asparatato son degradados a fumarato y oxalacetato.

Los aminoácidos glucogénicos son los principales precursores de rutas metabólicas como en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y gluconeogénesis y se consideran como la fuente de carbono alterna más eficiente para las bacterias cuando la glucosa no esta disponible.

Los aminoácidos cetogénicos producen acetyl-CoA o acetato después de su degradación y son incapaces de proveer precursores para la gluconeogénesis, pero son empleados en las rutas biosintéticas de otros compuestos nitrogenados (60).

La regulación del catabolismo de los aminoácidos glucogénicos o cetogénicos es controlada por la expresión coordinada de diferentes genes, que se expresan de forma dependiente a la disponibilidad intracelular de compuestos nitrogenados.

III. 3. METABOLISMO DE ASPARAGINA EN *Rhizobium etli*.

La asparagina es un aminoácido no esencial de tipo glucogénico con un grupo amido ($\text{NH}_2\text{-CO-}$) en el extremo de su cadena lateral. Durante el catabolismo de éste aminoácido, reacción catalizada por la asparaginasa, se produce aspartato y amonio (Fig. 1A) (15). Una vez sucedida la primera reacción, el aspartato se transamina a fumarato

para seguir el camino gluconeogénico a glucosa, reacción catalizada por la aspartasa. Ambas enzimas se encuentran presentes en *R. etli* codificadas por los genes *ansA* y *ansB*, respectivamente (16).

La biosíntesis de asparagina se lleva a cabo por la reacción de dos enzimas; la asparagina sintetasa que cataliza la producción de asparagina a partir de su respectivo α -aminoácido por una reacción de amidotransferasa donde la glutamina funciona como donante del grupo amino (Fig. 1B), ésta enzima es codificada por el gen *asnA* (13) mientras que la aspartato transaminasa (AST) dependiente de ATP cataliza la reacción de transferencia de un grupo amino desde el L-aspartato al 2 oxoglutarato formándose L-glutamato y oxalacetato (30) (Fig. 1C), el gen *aspB2* codifica para ésta enzima (13).

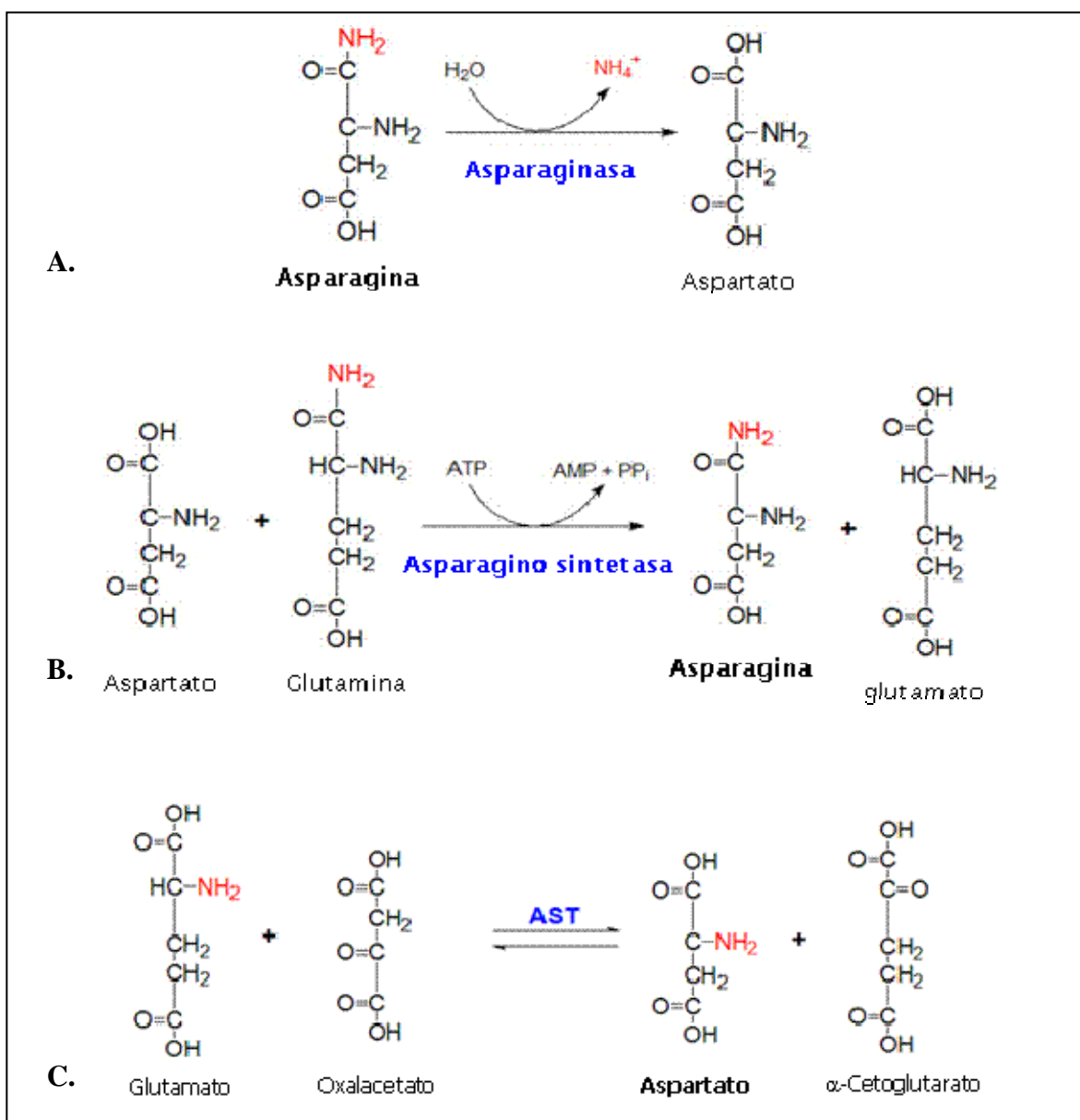


Figura 1. METABOLISMO DE ASPARAGINA. Ruta de síntesis y degradación de la asparagina. A) Degradación de la asparagina a aspartato por la asparaginasa; B) Reacción de transaminación por la aspartato aminotransferasa; C) Formación de asparagina por la asparagina sintetasa. Tomado de Michael W. King, Ph.D / IU School of Medicine / miking at iupui.edu.

IV. ANTECEDENTES.

IV. 1. REGULACIÓN DEL CATABOLISMO DE ASPARAGINA EN *Rhizobium etli*.

Rhizobium etli tiene la capacidad de crecer en medio mínimo suplementado con asparagina como única fuente de carbono y nitrógeno debido a la acción coordinada de dos enzimas hidrolíticas conocidas como asparaginasa I y II, que presentan diferente movilidad electroforética y termoestabilidad. La primera de ellas es una enzima que se expresa de manera constitutiva, que presenta una actividad enzimática muy baja, es termoestable y probablemente regula las concentraciones de asparagina y aspartato intracelular (16). En comparación, la asparaginasa II es una enzima inducida por asparagina extracelular, es reprimida por la fuente de carbono y es termolábil, su principal función es la de utilizar a la asparagina como fuente de carbono (15). De manera detallada, la asparaginasa II (E.C. 3.5.1.1) cataliza la hidrólisis de la L-asparagina en coordinación con la enzima aspartasa; la asparaginasa II degrada la L-asparagina a L-

aspartato y amonio, mientras que la enzima L-aspartasa (E.C. 4.3.1.1) cataliza la deamidación reversible de L-aspartato para producir fumarato y amonio (15).

En estudios previos se observó que la expresión de la asparaginasa II en *R. etli* se encuentra regulada negativamente por la fuente de carbono y positivamente por asparagina (15). Pero fue el estudio con diferentes cepas mutantes afectadas en la capacidad de utilizar la asparagina como fuente de carbono y nitrógeno que contribuyeron a un mejor entendimiento de los procesos relacionados con la degradación de este aminoácido. En este estudio se obtuvo la mutante *R. etli* AHZ7 incapaz de crecer en asparagina como única fuente de carbono y nitrógeno la cual presentó una disminución significativa en la actividad de asparaginasa, al complementar la mutante con un banco de DNA de *R. etli*, construido en el cósmido pLAFR1, se encontró que un fragmento de DNA de 18 Kb contenido en el cósmido pAHZ11 restablecía la actividad de la asparaginasa (16). El fenotipo de la mutante AHZ7 es Fix⁺ y nodula de forma similar que la cepa silvestre sin embargo, la actividad de asparaginasa dentro del

nódulo se encuentra completamente abatida, lo que sugiere que ésta enzima no es importante para el proceso de regulación de nodulación y fijación (16).

Posteriormente Ortuño-Olea y Durán-Vargas (36) analizando diferentes fragmentos de DNA que provenían del cósmido pAHZ11 encontraron un fragmento de 7 Kb contenido en el cósmido pAHZ12, que complementó a la mutante AHZ7 afectada en la actividad de asparaginasa. El análisis de esa secuencia reveló la presencia de 4 marcos abiertos de lectura denominados *ansR*, *ansP*, *ansA* y *ansB*; al primero de ellos le encontraron identidad del 33% con una proteína represora de *Streptomyces coelicolor* (45) e identidad similar con otros represores bacterianos. El segundo mostró identidad con la L-asparagino permeasa de *Salmonella enterica* (18); la proteína AnsP contiene un motivo permeasa entre los residuos 56-86 y mostró características típicas de una proteína integral de membrana (55) con un valor de hidrofobicidad de 0.89 de acuerdo al método de Kyte y

Doolittle (26). El tercer gen analizado codificó para la L-asparaginasa II, que en ese momento no presentó homología con proteínas de función conocida. Borek, D y M Jaskólski, en el año 2000, identificaron las 3 familias de asparaginasa, ubicando la asparaginasa de *Rhizobium etli* en la 3ra familia, por su probable sitio catalítico sin identidad ni similitud con el resto de las asparaginasa de plantas y otras bacterias analizadas las cuales fueron agrupadas en las familias 1 y 2 respectivamente (1a). Mientras el último gen descrito presentó identidad con la enzima aspartasa de *Pseudomonas fluorescens* (51) y con otras aspartasa y fumarasa de procariontes.

El análisis de la secuencia mencionada anteriormente también indicó que los 4 genes estaban organizados como un probable operón considerando que estaban orientados en la misma dirección, en el caso de *ansP*, *ansA* y *ansB* estaban separados por menos de 100 pb. Para determinar si los 4 genes se transcribían juntos realizaron experimentos

de RT-PCR empleando oligonucleótidos que cubren la región de DNA de *ansPA*, *ansAB* y *ansPAB*, los fragmentos obtenidos indicaron que estos tres genes se encuentran organizados como una unidad transcripcional y que el gen *ansR* no se cotranscribe con los genes *ansPAB* ya que no obtuvieron productos de RT-PCR empleando oligonucleótidos entre los genes *ansRP* y *ansRPA* (Fig. 2).

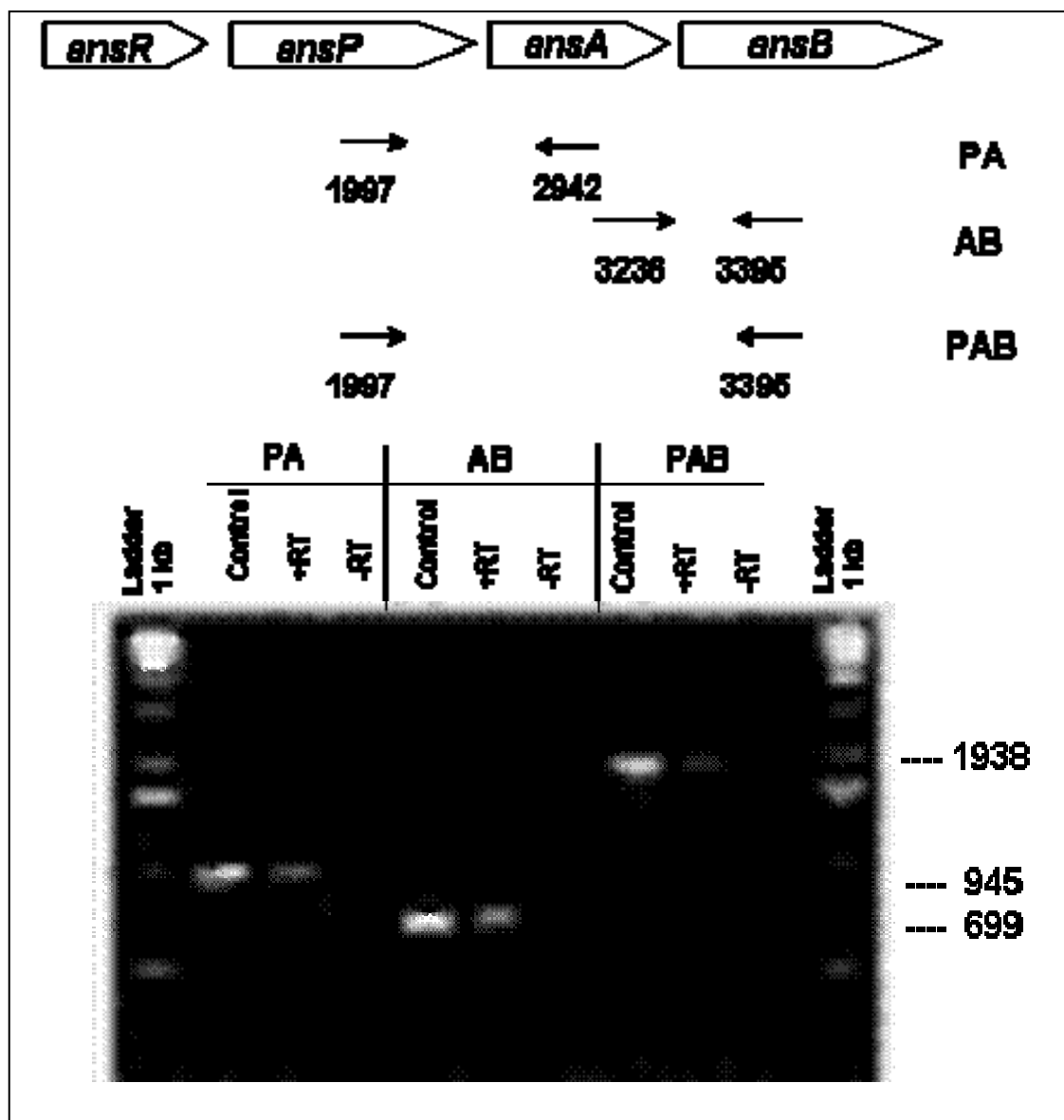


Fig. 2. Análisis de RT-PCR del operón *ans*. Reacción de PCR con RNA total aislado de células de *R. etli* después de 18 hrs de crecimiento en MM con asparagina como fuente de carbono y nitrógeno. Los oligonucleótidos empleados cubrían la distancia entre los genes *ansPA* (fragmento de 945 bases), *ansAB* (699 bases) y *ansPAB* (1938 bases). El tamaño de los productos de PCR se encuentran indicados al lado derecho de la imagen. Control: reacción estándar del plásmido pAHZ12; +RT: reacción de RT-PCR; -RT: control negativo, reacción de PCR sin enzima RT (36).

Además de comprobar que los genes *ansP*, *ansA* y *ansB* forman parte del operón *asn* y que el gen *ansR* se transcribe de forma independiente del operón, se menciona que *ansR* contiene un motivo hélice-vuelta-hélice entre los residuos 49-70, presente en represores bacterianos de la familia GntR (36y 9). Los miembros de esta familia actúan a nivel transcripcional uniéndose a secuencias palindrómicas (sitio del operador) localizadas río abajo de la secuencia del promotor de los genes. En este sentido se localizo en la región promotora del operón la secuencia TTGCTGACAGCTAT la cual presenta 44% de identidad a la secuencia de unión de la proteína GntR localizada dentro de la región promotora del operón de gluconato de *Bacillus subtilis* (10).

Además, se localizan las secuencias TGTCAG y TAGCA río arriba del probable sitio de inicio de *ansP*, a 85 y 73 pb respectivamente; el análisis de estas secuencias llevó a proponer que estos elementos constituyen regiones conservadas similares a las secuencias consenso -24 y -12 de los promotores bacterianos

dependientes del factor sigma 54 (32), lo que sugería que esa región muy probablemente era el sitio de unión de la RNA Polimerasa para la transcripción del operón *ans*.

En conjunto los resultados anteriores les sugirieron que los genes *ansPAB* se transcriben como un operón y que el gen *ansR* probablemente codifique para una proteína represora que tiene la función de controlar negativamente la expresión del operón en ausencia de asparagina en el medio de crecimiento.

IV. 2. PROTEÍNAS REPRESORAS HOMOLOGAS A AnsR.

El probable represor AnsR de *Rhizobium etli* es una proteína de aproximadamente 28.5 KDa que presenta homología con represores bacterianos de la familia GntR en la región N-terminal, que es la región donde se localiza el dominio de unión a DNA. De manera específica, este represor se encuentra dentro de la subfamilia FadR (44), en la cual

los miembros que la componen presentan una región N-terminal homóloga entre ellas, pero presentan una alta heterogeneidad en la región C-terminal, que es la región donde se localiza el dominio de unión del efector y el dominio de oligomerización.

Dentro de esta subfamilia se agrupan proteínas implicadas en la regulación de sustratos relacionados al metabolismo de aminoácidos o a rutas de diversas vías metabólicas como la de piruvato (PdhR), glicolato (GlcC), galactonato (DgoR), lactato (LldR), malonato (MatR) y gluconato (GntR), todas éstas presentando sitios de unión en el operador de sus respectivos genes; sin embargo, en algunas de estas proteínas no existe una evidencia experimental que demuestre que el represor se una a estos sitios (44). Es el caso de la secuencia de unión del represor AnsR de *Rhizobium etli* (36), donde la comparación con las secuencias de los sitios de unión de los represores miembros de esta subfamilia, mostró identidad en algunas de las bases de la secuencia y

un arreglo estructural como secuencias invertidas repetidas (TTGCTGACAGCTAT) (44); esta secuencia comparte con la el sitio de unión del represor GntR de *Bacillus subtilis* (TTGTATACAAGTAT) un 64% de identidad (10), con los sitios de unión del represor de GlcC, LldR y PdhR comparte 29% de identidad, mientras que con el sitio de unión del represor MatR de *R. leguminosarum* comparte un 35% de identidad (44).

La proteína GntR, modelo de la familia de estos reguladores transcripcionales, posee un motivo Hélice-Vuelta-Hélice (H-T-H) de unión a DNA en la región amino terminal que le permite unirse a una secuencia que consiste de dos hexámeros invertidos separados por 4 pb y que esta presente en las regiones regulatorias de todos los genes inducibles por gluconato (41), esta molécula se une a GntR e inactiva su unión en los diferentes promotores de genes de la vía de gluconato. Es importante mencionar que GntR se une a dos diferentes sitios dentro de la región promotora del gen *gntT* y cuya afinidad se ve

disminuida en presencia del inductor gluconato tal como sucede en muchos otros sistemas regulados negativamente; además GntR positivamente actúa sobre su mismo gen en presencia de AMPc y la proteína CRP (38).

Por su parte FadR, otra de las proteínas de la familia, reprime genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos en respuesta a la unión de moléculas de Acil-CoA de cadena larga (56). En este caso FadR se une como homodímero a un sitio único localizado entre la posición +1 a +17 relativo al sitio de inicio de la transcripción de los operones, por lo que su unión en ésta posición causa la represión de los genes, represión que se evita al adicionar los ácidos grasos de cadena larga acilados (Acil-CoA) (5 y 17).

En *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* se ha identificado y caracterizado un regulador transcripcional del metabolismo del

malonato, denominado MatR el cual se une a sitios similares a las secuencias del sitio operador del gen *gntT* de *Bacillus subtilis*. Como miembro de la familia GntR, presenta un dominio Hélice-Vuelta-Hélice en la región N-terminal aunque como en el caso de los demás miembros de esta familia el extremo C-terminal no presenta homología con ninguno de ellos. El operón *mat* presenta un promotor dependiente del factor transcripcional de la familia de sigma 70 con una región -10 y -35 consenso y en el que los sitios de unión de MatR esta localizado a -46.5 río arriba del sitio de inicio de la transcripción (29).

Finalmente el regulador de *Escherichia coli* NanR es una proteína que regula el metabolismo del ácido siálico y reconoce 3 secuencias repetidas en tandem. Al igual que FadR, este regulador presenta un dominio N-terminal HTH de tipo alado que le permite por un lado contactar al surco mayor del DNA y por otro al surco menor lo que le permite funcionar como una proteína ampliamente versátil (17), ya que estas proteínas pueden unirse al DNA como monómeros,

homodímeros y heterodímeros. Un dato importante de este represor es que para reprimir la expresión del operón requiere que las tres secuencias en tandem se encuentren íntegras (23).

IV. 3. REGULACIÓN DE ASPARAGINASAS EN OTROS ORGANISMOS.

La actividad de la degradación de asparaginasa se ha estudiado en otras bacterias Gram negativas tales como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Erwinia chrysanthemii* y *Pseudomonas*, así como en bacterias gram positivas como *Bacillus subtilis* (18, 19, 20, 49 y 50)

E. coli posee dos asparaginasas; la asparaginasa I es constitutiva y se encuentra en el citoplasma, mientras que la asparaginasa II es una enzima del periplasma. Esta última es codificada por el gen *ansB*. La regulación de la expresión del promotor del gen *ansB* es co-dependiente del activador transcripcional FNR (regulador transcripcional que bajo condiciones anaeróbicas activa la expresión de

un número de genes relacionados en el transporte de electrones) y de CRP (cAMP receptor protein) y se encuentra también regulado por anaerobiosis (19). Los genes que codifican para la asparaginasa II y la aspartasa no se encuentran organizados en operón, pero se encuentran coordinadamente inducidos bajo condiciones de crecimiento anaerobio; ambas enzimas están involucradas en catabolizar asparagina para proveer a la célula de fumarato, el cual es usado como aceptor final de electrones (20).

La asparaginasa II de *S. enterica* es codificada por el gen *ansA* ubicada dentro del operón *ansAB*; esta enzima esta involucrada en la degradación de asparagina para proveer fumarato como aceptor final de electrones durante la respiración anaerobia. La regulación de la expresión de esta enzima se encuentra sujeta a represión catabólica por glucosa así como bajo regulación por anaerobiosis. El promotor de *asnB* presenta sitios de unión a CRP y presenta cajas -35 y -10 consenso con *E. coli*, por lo que este promotor es dependiente de sigma 70 (18).

En *B. subtilis* al igual que en *R. etli*, la degradación de asparagina se encuentra coordinada por las enzimas asparaginasa y aspartasa codificadas por los genes *ansA* y *ansB* respectivamente, organizados en el operón *ansAB* (49). Este operón se encuentra bajo fuerte represión catabólica por una fuente de nitrógeno como amonio y se induce en presencia de asparagina y aspartato. Se ha propuesto que la función del operón es coordinar los niveles de las enzimas asparaginasa y aspartasa para mantener el balance celular entre asparagina y aspartato. Río arriba del operón *ansAB* se encuentra el gen *ansR* que se transcribe de forma independiente y en sentido opuesto al operón. A nivel transcripcional el producto del gen *ansR* tiene la función de actuar como un regulador negativo de la expresión del operón (50).

V. JUSTIFICACIÓN

La función del operón *ans* de *R. etli* es suministrar carbono y amonio a la célula a partir de la degradación de asparagina exógena, cuando no existe disponibilidad de otra fuente de carbono. En esta condición, la asparagina induce la expresión de los genes que la metabolizan, pero su transcripción parece ser regulada de manera negativa por la fuente de carbono como succinato, glucosa o glicerol (15). Esta evidencia sugiere que la regulación se da a nivel transcripcional de forma negativa por AnsR y es inducida por asparagina, que muy probablemente se une al represor AnsR de manera similar como sucede en miembros de la familia de los reguladores transcripcionales GntR.

Este modelo de regulación negativa, es similar a la regulación del operón del catabolismo de la asparagina en *Bacillus subtilis*, en el que la asparagina induce su expresión, pero es regulada negativamente por la fuente de carbono a través del represor AnsR.

Por otra parte, estudios previos al analizar la secuencia de la región intergénica *ansR-ansP* plantearon la existencia de dos regiones conservadas homólogas a las cajas -12 y -24 de *E. coli*, que sugerían que la expresión del operón era dependiente del factor sigma 54. Sin embargo, ante la falta de un análisis más profundo de los elementos del promotor que participan en la regulación de la transcripción del operón se planteó la necesidad de llevar a cabo diferentes estrategias experimentales para conocer la región importante para dicha función.

En este sentido, pocos estudios se han llevado a cabo sobre la regulación a nivel transcripcional de genes que participan en el catabolismo de aminoácidos en rizobiáceas, así como de los elementos en el DNA de los promotores que participan en dicho proceso. Por lo tanto el presente trabajo contribuyó en el conocimiento de los elementos que participan en la regulación de la expresión del operón de la L-asparaginasa.

VI. OBJETIVOS

VI.1. GENERAL

- Determinar los elementos regulatorios de la expresión del operón *ansPAB* de *Rhizobium etli* a nivel molecular.

VI. 2 PARTICULARES

- Identificar el sitio de unión de AnsR.
- Definir la región promotora del operón *ans*.
- Delimitar la región mínima de regulación del operón *ans*.
- Definir el sitio exacto de inicio de la transcripción del operón *ans*.

VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

VII. 1. BACTERIAS Y PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS.

Las cepas empleadas en este estudio fueron *Rhizobium etli* fenotipo silvestre (WT) CE3 y *R. etli* AHZ7pAHZ11 cepa mutante en el gen *ansA* complementada con el plásmido pAHZ11 (16). Estas cepas se emplearon para los ensayos de determinación del sitio de inicio de transcripción. La transformación de las cepas de *R. etli* se realizó por electrotransformación de acuerdo al método de Garg *et. al.* (11). A partir de células de *Rhizobium etli* crecidas en medio PY por 18 horas a 30° C se inóculo medio Manitol-Extracto de Levadura (YEM) suplementado con CaCl₂ 1.5 mM y FeCl₃ 0.003 mM para que quedará a una A₅₆₀ inicial de 0.05, este cultivo se mantuvo en crecimiento por 72 horas a 30° C hasta una A₅₆₀ entre 0.5 - 0.6. Las células obtenidas se lavaron con medio fresco YEM y agua destilada fría y se preservaron en glicerol al 10% a -80° C.

Las cepas de *Escherichia coli* empleadas para las clonaciones y subclonaciones fueron HB101 y TOP10F' (Invitrogen); en los experimentos de sobreexpresión del represor AnsR se utilizó la cepa BL21 DE3 (Novagen) que contiene el plásmido pPIRL (22). La transformación de estas cepas se hizo por métodos estándares de acuerdo a Sambrook y Russell (46).

VII. 2. CONDICIONES Y MEDIOS DE CRECIMIENTO.

Las cepas de *Rhizobium etli* se crecieron en medio PY de acuerdo al método descrito en Huerta-Zepeda *et. al.*, (15) o en Medio Mínimo (MM) (1). En medio MM se emplearon las fuentes de carbono y nitrógeno, asparagina o succinato y amonio, respectivamente, a una concentración final de 10 mM. Para la selección de transformantes se adicionó al medio gentamicina en una concentración final de 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ incubándose a 29 °C durante 20 h.

Las cepas de *E. coli* antes mencionadas se crecieron en medio LB o YT2X (46). Cuando se requirió se añadió ampicilina a una concentración final de 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$, ácido nalidíxico a 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$, tetraciclina a 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$, gentamicina a 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$, kanamicina a 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$, estreptomina a 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y cloranfenicol a 34 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

VI 3. PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS.

Los plásmidos y oligonucleótidos empleados en el presente estudio se enlistan en la tabla No. 1 y tabla No. 2 respectivamente.

Tabla No. 1. Lista de plásmidos contruidos y empleados en este estudio.

PLÁSMIDOS	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
pAM-AnsR	Gen <i>ansR</i> (820 pb) de <i>Rhizobium etli</i> clonado en el vector de expresión pTrcHisA (Invitrogen).	Este trabajo
pAHZ11	Plásmido derivado de pLAFR1 que contiene un fragmento de DNA de 18-kb que complementa a la cepa mutante AHZ7. Empleado como templado para las reacciones de PCR.	16
pAM18-FC	Derivado de pUC18 que contiene un fragmento de DNA de 235 pb de la región promotora del operón <i>ans</i> .	Este trabajo
pAM18-MUT35	Derivado de pUC18 que contiene un fragmento de DNA de 235 pb; la región -35 presenta una mutación que introduce el sitio <i>XhoI</i> .	Este trabajo
pAM53-FC	Derivado de pBBMCS53 que contiene un fragmento de DNA de 235 pb de la región promotora del operón <i>ans</i> .	Este trabajo
pAM53-70	Derivado de pBBMCS53 que contiene un fragmento de DNA de 169 pb de la región promotora del operón <i>ans</i> .	Este trabajo
pAM53-110	Derivado de pBBMCS53 que contiene un fragmento de DNA de 128 pb de la región promotora del operón <i>ans</i> .	Este trabajo
pAM53-MUT35	Derivado de pBBMCS53 que contiene un fragmento de DNA de 238 pb que proviene de pAM18-MUT35	Este trabajo
pAM53-INV	Derivado de pBBMCS53 que contiene un fragmento de DNA de 235 pb que proviene de pAM18-FC; la fusión del DNA se encuentra en posición invertida respecto al gen <i>uidA</i> .	Este trabajo
pBBMCS53	Vector derivado de pBBR1MCS-5 que carece de promotor y el sitio múltiple de clonación se encuentra unido al gen reportero <i>uidA</i> , Gm ^r	12
pUC18	Vector de clonación con alto número de copias.	58
pPIRL	Vector que contiene clonados los genes que codifican para los tRNAs de los aminoácidos, prolina, leucina, isoleucina y arginina.	22

Tabla No. 2. Lista de oligonucleótidos empleados en este estudio.

OLIGO NUCLEÓTIDOS	DESCRIPCIÓN Y SECUENCIA	REFERENCIA
AnsR1	CCGGGATCCGGCTGCGCTGC Empleado para amplificar <i>ansR</i> .	Este trabajo
AnsR2	CGGAATTCGAGGCTGCGTCTATGG Empleado para amplificar <i>ansR</i> .	Este trabajo
pUC21 forward	GTAAAACGACGGCCAGT Empleado para secuenciar fragmentos de DNA clonados en pBBMCS53.	42
gus lw2 reverse	ATGACCATGATTACGCCAAGC Empleado para secuenciar fragmentos de DNA clonados en pBBMCS53	42
FUSCOMP	CTCGAATTCCTGAAGCCTTGCTCG Usado para la construcción de pAM53-FC.	Este trabajo
FUSDEL70	CTCGAATTCGAACGAAACACTCTTGACGG Usado para la construcción de la mutante pAM53-70.	Este trabajo
FUSDEL110	CTCGAATTCCAAACCTGTCAGACCGC Usado para la construcción de la mutante pAM53-110.	Este trabajo
AnsRFUSREV	GTCGGTACCTCGGTTCTGGTGGATTCC Empleado para la construcción de pAM53-FC, pAM53-70 y pAM53-110	Este trabajo
MUT35FC	CGAACGAAACACTCCTCGAGGATGCGCA TCTCTCC Usado para la construcción de pAM53-MUT35*	Este trabajo.
MUT35FCREV	GGAGAGATGCGCATCCTCGAGGAGTGTT TCGTTCG Empleado para la construcción de pAM53-MUT35.	Este trabajo.
PROMANS1	CCCGCTTCCCTTTCACTG Empleado para la amplificación de la región promotora usada como sonda en la determinación del sitio de inicio de la transcripción del operón <i>ans</i> .	Este trabajo.
PROMANS2	GCATAGACCAGCACAAGTGC Empleado para la amplificación de la región promotora usada como sonda en la determinación del sitio de inicio de la transcripción del operón <i>ans</i> .	Este trabajo.

- La secuencia subrayada del oligonucleótido MUT35FC y MU8T35FCREV indican las bases mutadas respecto a la secuencia silvestre.

VII. 4. SOBREEXPRESION DE LA PROTEÍNA AnsR.

Para sobreexpresar al represor AnsR se realizó una amplificación por PCR con la enzima Taq polimerasa High-Fidelity (Invitrogen) empleando los oligonucleótidos AnsR1 y AnsR2 (Tabla No. 2) y como templado el plásmido pAHZ11. Las condiciones del PCR fueron: 95° por 2 min, seguido por 35 ciclos a 95° 30 seg., 62° 45 seg., 72° 1 min. Se obtuvo un fragmento de 820 pb que corresponde al gen *ansR* que fue purificado por agarosa de bajo punto de fusión (LMP) y se clonó en el plásmido de sobreexpresión pTrcHisA (Invitrogen) con los sitios de restricción *Bam*HI-*Eco*RI para obtener el plásmido pAMAnsR, el cual se transformó en la cepa BL21 DE3 pPIRL.

La cepa transformada creció durante 18 hrs en medio LB suplementado con ampicilina a 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y cloranfenicol a 34 $\mu\text{g ml}^{-1}$; 1ml del cultivo se transfirió a 250 ml de medio fresco incubándose a 30°C hasta alcanzar una A_{595} de 0.6. Para inducir la expresión de la

proteína AnsR se añadió IPTG a una concentración final de 0.5 mM, siguiendo la incubación durante 4 horas.

VII. 5. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA AnsR POR CROMATOLOGRAFÍA DE AFINIDAD.

Las células inducidas fueron colectadas por centrifugación a 5000 rpm por 10 minutos y se resuspendieron en 20 ml de buffer de lisis (Tris HCL 50 mM pH 8.0, NaCl 0.4 M, EDTA 2 mM y PMSF 1 mM) para lissarlas por sonicación. El extracto celular obtenido se centrifugó a 10 000 rpm por 20 minutos a 4°C, se recolectó el sobrenadante en frío y se filtró con membrana de 0.22 µm de tamaño de poro. El sobrenadante filtrado se pasó a través de una columna preempacada de 5 ml Hi-Trap Chelating (Amersham Biosciences) cargada con Ni⁺ y equilibrada con buffer de lisis. Las eluciones se realizaron en un gradiente de imidazol de 40 a 500 mM, cuantificando la concentración de proteína por el método de Bradford y se utilizó 20 µg de proteína para correr geles de acrilamida al 10 % en condiciones desnaturizantes.

VII. 6. CONSTRUCCIÓN DE FUSIONES TRANSCRIPCIONALES

ansp::uidA.

Para determinar la región mínima requerida para la transcripción del operón *ans* se realizaron fusiones transcripcionales de diferentes longitudes de la región promotora del operón y el gen reportero *uidA* que codifica para la enzima β -glucuronidasa contenido en el plásmido pBBMCS53 (12). Los diferentes fragmentos de la región promotora se obtuvieron por PCR con la DNA Polimerasa Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen), empleando como templado el plásmido pAHZ11 y los oligonucleótidos FUSDEL70, FUSDEL110, FUSCOMP y AnsRFUSREV (Tabla No. 2). Los primeros 3 oligonucleótidos se diseñaron para introducir el sitio de restricción *EcoRI* en el extremo 5' del fragmento amplificado, mientras que el último oligonucleótido (antisentido), localizado dentro de los primeros 27 nucleótidos de la región codificante del gen *ansP*, fue diseñado para introducir el sitio de restricción *KpnI*. Todas las reacciones de amplificación utilizaron el

mismo oligonucleótido antisentido como primer (Tabla No. 2, Figura No. 3).

Los fragmentos amplificados por PCR tienen un tamaño de 235 pb, 169 pb y 128 pb, se clonaron en el plásmido pBBMCS53, obteniendo los plásmidos pAM53-FC, pAM53-70 y pAM53-110, respectivamente (Tabla No. 1). Las condiciones de amplificación para los fragmentos de 235 pb y 169 pb fueron las siguientes: 95° 2 min, seguido de 30 ciclos de 95° 30 seg., 60° 45 seg., 68° 1 min. Para el fragmento de 128 pb las condiciones fueron: 95° 2 min, seguido de 30 ciclos de 95° 30 seg., 63° 45 seg., 68° 1 min.

El plásmido mutante pAM53-INV se construyó utilizando el fragmento de DNA de 235 pb, el cual se clonó en el vector pUC18 (58) con los sitios de restricción *EcoRI-KpnI* (pAM18-FC); el fragmento *EcoRI-XbaI* del plásmido pAM18-FC fue subclonado en pBBMCS53 digerido con los mismos sitios para obtener la construcción pAM53-

INV. Los plásmidos resultantes fueron transformados en *R. etli* como previamente se describió. Todas las construcciones obtenidas fueron secuenciadas mediante un secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer de Perkin-Elmer en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

VII. 7. MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA.

Para obtener la mutación de la región -35 del promotor *ansPAB*, se realizó mutagénesis sitio dirigida según el método de “Quik-Change Site-Directed Mutagenesis” (Stratagene), empleando los oligonucleótidos complementarios MUT 35FC y MUT35FCREV (Tabla 2) y el plásmido pAM18-FC como templado. Las condiciones en las que se realizó la mutación fueron las siguientes: 95° 1 min, seguido de 25 ciclos de síntesis a 95° 1 min., 60 ° 30 seg. y 68° 5 min. La mutación introdujo el sitio de restricción *XhoI*, cambiando la región -35 de **CTTGAC** a **CCTCGA**, comprobada por análisis de secuencia (como se indicó arriba). El fragmento mutante fue subclonado en el plásmido

pBBMCS53 digerido con *EcoRI-KpnI*. El plásmido resultante pAM53-MUT35 fue transformado en *R. etli* como se describió previamente.

VII. 8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE β -GLUCURONIDASA.

Para determinar la actividad del gen reportero en las fusiones transcripcionales se realizó lo siguiente: las cepas se inocularon en un precultivo en medio PY durante 18 horas, posteriormente se inocularon a D.O.₄₅₀ de 0.05 en MM suplementado con asparagina 10 mM y gentamicina a 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$, durante 24 horas; se tomaron muestras a intervalos de 4 horas las cuales se lavaron 2 veces en MM cloramfenicol 100 $\mu\text{l ml}^{-1}$. Para permeabilizar las células se agregó un ml de MM+SDS al 0.1% y 60 μl de cloroformo, el ensayo se realizó como indica Lessard (21).

La actividad de β -glucuronidasa se determinó por método colorimétrico empleando p-nitrofenilglucurónido (SIGMA) como sustrato de la reacción, cuantificando la formación de p-nitrofenol a 450 nm en un rango de 0 a 90 minutos a una temperatura de 37°C. Los

ensayos se realizaron por triplicado de forma independiente reportando la actividad específica de β -glucuronidasa (nmoles p-nitrofenolmin⁻¹ mg prot⁻¹). La concentración de proteína total se determinó por el método de Lowry (46).

VII. 9. DETERMINACIÓN DEL SITIO DE INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN.

Para determinar el sitio de inicio de la transcripción se realizaron los experimentos de protección contra nucleasa S1. Para esto se diseñó una sonda de 371 pb obtenida mediante amplificación por PCR empleando los oligonucleótidos PROMANS1 y PROMANS2 (Tabla No. 2), como templado el plásmido pAHZ11 y DNA Polimerasa Taq Platinum (Invitrogen). El oligo PROMANS2 se marcó radioactivamente con [γ -³²]ATP (Amersham) usando la polinucleótido cinasa de T4 (Invitrogen) para obtener un producto de PCR marcado por el extremo 3'. Las condiciones del PCR fueron las siguientes: 95° 2 min, seguido por 30 ciclos de 95° 1 min, 55° 30 seg. y 70° 45 seg. El fragmento marcado fue purificado por gel de agarosa de bajo punto de fusión.

Por cada ensayo de protección contra nucleasa S1 se hibridaron 10^5 c.p.m. Cerenkov de la sonda con 50 μg de RNA total obtenido y purificado por métodos estándares (25). La hibridación se realizó en 20 μl de buffer de tricloroacetato de sodio (34) por 5 hr a 45 °C después de una breve desnaturalización a 65 °C por 10 minutos. La digestión con la nucleasa S1 se llevó a cabo a 37 °C por 45 minutos. El procesamiento de las muestras y las condiciones de la electroforesis de los fragmentos protegidos en gel desnaturalizante de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida, 29:1), se realizó como se describe en Servín-González *et. al.* (48). Los fragmentos protegidos se corrieron en paralelo con la secuencia obtenida con el mismo oligonucleótido marcado empleado para la obtención de la sonda y el plásmido pAHZ11 como templado. Las reacciones de secuenciación del DNA se realizaron con Termosequenasa Cycle Sequencing Kit (USB), en las cuales la mezcla del nucleótido 7-deaza-dGTP fue sustituido por el correspondiente nucleótido dGTP.

VIII. RESULTADOS

VIII. I. EXPRESION DEL REPRESOR AnsR.

Datos presentados en otros estudios mostraron que los genes *ansP*, *ansA* y *ansB* son co-transcritos a partir de una sola unidad transcripcional (operón *ans*) y que río arriba de este operón se encuentra el gen monocistrónico *asnR*. En estos estudios se mostró que los tres primeros genes codifican para las proteínas que participan en la internalización y catabolismo de asparagina, mientras que el cuarto gen localizado río arriba de los anteriores probablemente codifica para el regulador de la expresión del operón (AnsR) (36). La región intergénica entre *ansP* y *ansR* presentó dos probables sitios conservados, uno para la unión del represor AnsR y otro para la unión de la subunidad σ^{54} de la RNA polimerasa, éste último con una estructura y secuencia parecida a las regiones consenso -12 y -24 de *E. coli*. La región -24 con secuencia TGTCAG fue idéntica en 4 posiciones

y la región -12 con la secuencia TAGCGA fue idéntica solo en tres posiciones (36).

Considerando lo anterior se llevó a cabo una estrategia para determinar si la secuencia señalada como el sitio de unión del represor era el blanco del posible regulador transcripcional AnsR. Para lo cual se amplificó y clonó el gen *ansR* en el vector de expresión pTrcHisA obteniendo el plásmido pAMAnsR y se transformó en células de *E. coli* BL21 DE3pPIRL para sobreexpresar la proteína His6-AnsR de peso aproximado de 28.5 KDa y purificarla por cromatografía de afinidad en condiciones nativas.

Después de probar diferentes condiciones para la inducción de la expresión del represor, dentro de los que se puede mencionar la disminución de la temperatura de inducción, diferentes concentraciones de inductor IPTG, diferentes tiempos de inducción y diferente densidad celular previa a la inducción, no se logró

sobreexpresarla. El análisis de extractos celulares en geles desnaturalizantes de poliacrilamida no mostraba una proteína de peso cercano a los 28 kDa, ni siquiera al analizar las diferentes fracciones obtenidas del gradiente de elusión de la columna cromatográfica. Un dato interesante que se puede mencionar es que las células transformadas con el plásmido pAMAnsR presentaban poco crecimiento muy probablemente causado por la toxicidad de la proteína AnsR previo a la inducción y de manera más evidente una vez inducida su expresión. Cabe mencionar que la región de DNA que codifica a *ansR* clonado en el vector de expresión fue secuenciado 3 veces en ensayos independientes.

Debido a los resultados anteriores no se logró obtener el represor purificado y por lo tanto no se pudo determinar su sitio específico de unión en el promotor del operón. Por ello se planteó una estrategia enfocada a determinar la presencia de elementos regulatorios presentes

en esta región y con ello determinar si la expresión del promotor es dependiente del factor sigma 54 de la RNA polimerasa.

VIII. 2. DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS REGULATORIOS EN EL PROMOTOR DEL OPERÓN *ans*.

Para determinar la presencia de otros elementos regulatorios en el promotor del operón *ans* que son importantes para su expresión se llevó a cabo un análisis de la región del DNA que se encuentra río arriba del gen *ansP*. Para ello, se realizaron amplificaciones por PCR que eliminan diferentes fragmentos de DNA en la región intergénica *ansR-ansP* como se menciona en métodos, fusionándolos al gen reportero *uidA*, que codifica para la enzima β -glucuronidasa, contenido en el vector pBBMCS53 (promoterless) (Fig. No. 3). La primera mutante obtenida (pAM53-70) se construyó con un fragmento de DNA que presenta una deleción de 70 pb localizada 51 pb río arriba del sitio

de inicio de la transcripción. Mientras que la mutante pAM53-110 se construyó con un fragmento de DNA que presenta una delección de 110 pb localizada 11 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción. En el caso de la mutante pAM53-INV contiene el fragmento de 235 pb clonado en posición inversa respecto a la región intergénica silvestre. Por su parte el plásmido pAM53-FC contiene la región intergénica silvestre y fue la construcción empleada como control positivo. Estos plásmidos se transformaron en la cepa de *R. etli* CE3; la expresión de las fusiones transcripcionales se cuantificó en lisados de células crecidas en MM con L-asparagina a las 16 horas de crecimiento.

Los resultados concentrados en la Figura 4, muestran los datos de la actividad enzimática de las fusiones transcripcionales a las 16 horas de crecimiento celular en relación a las diferentes delecciones realizadas. La mutante pAM53-70, que presenta una delección de 69 pb en la región promotora, tuvo una actividad de β -glucuronidasa de 8816 nmoles $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, nivel similar a los presentados por la cepa que

contiene el plásmido con la región promotora completa pBB53-FC; 8195 nmoles min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. Con respecto a las mutantes pAM53-110, que presenta una delección de DNA de 110 pb en la región promotora y pAM53-INV, que presenta la región intergénica *ansR-ansP* en posición invertida, ambas presentaron una actividad baja a niveles similares a la cepa que contiene el vector pMCSBB53 (981, 797 y 761 nmoles min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, respectivamente). Estos resultados sugieren que las 40 pb de diferencia entre las mutantes pAM53-70 y pAM53-110 existen elementos indispensables para la activación del promotor. A pesar de que la mutante pAM53-110 aún conserva íntegras los sitios -12 y -24 sugeridos por Ortuño-Olea y Durán-Vargas (36) como los sitios de reconocimiento para el factor σ_{54} de la RNA polimerasa, la actividad de β -glucuronidasa se ve abatida. Asimismo, el plásmido pAM53-INV muestra que la expresión del operón depende de la dirección y posición de la región promotora respecto a la dirección de transcripción del operón.

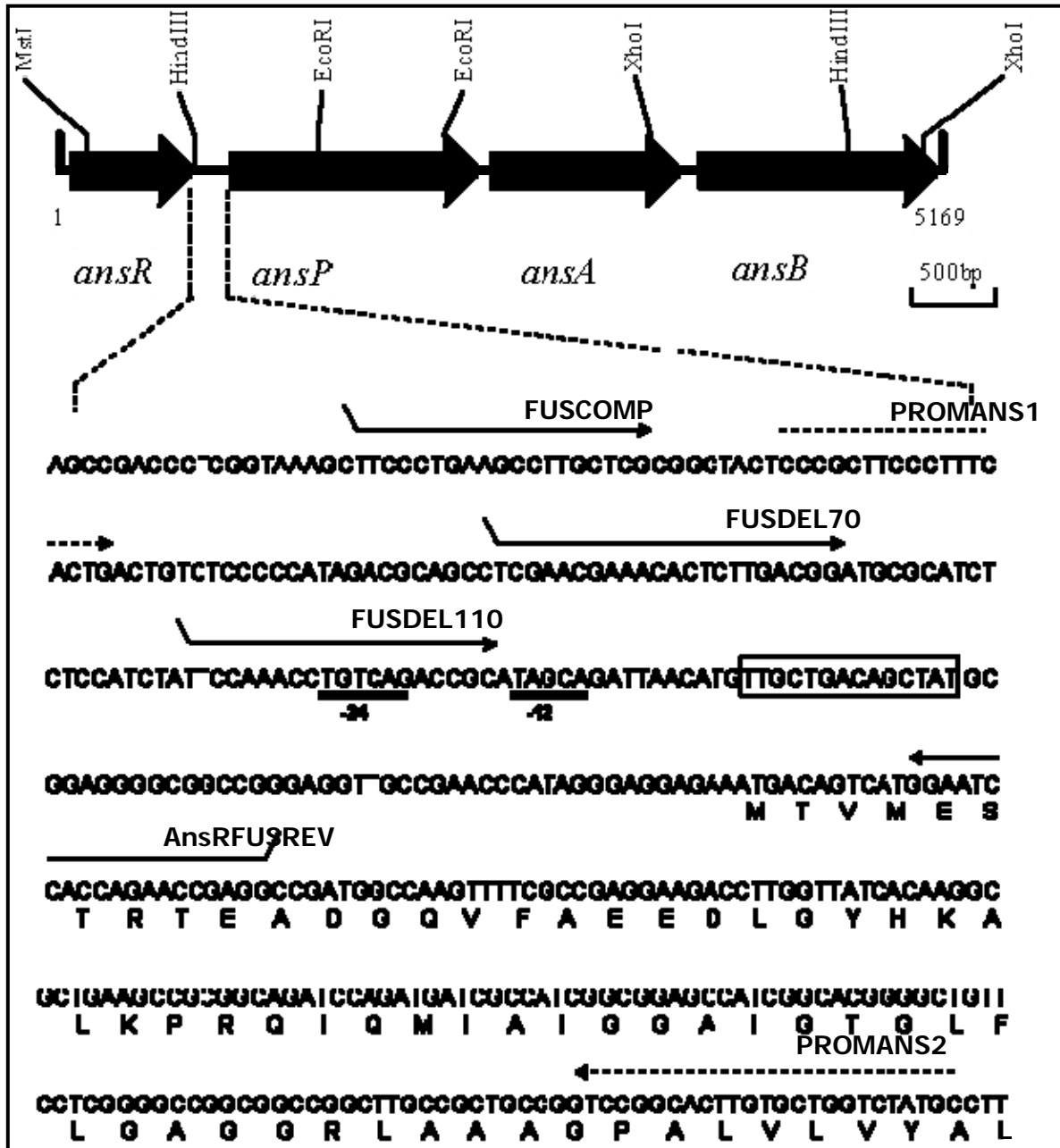


Fig. 3. Región intergénica entre los genes *ansR-ansP* del operón *ans*. Fragmentos amplificados para generar las diferentes deleciones de la región promotora; las flechas sólidas representan los oligonucleótidos empleados para amplificar diferentes fragmentos, las flechas punteadas se refieren a los oligonucleótidos que amplifican el fragmento de DNA usando para el mapeo de alta resolución. Se indica en barra sólida los probables sitios -12 y -24 para sigma54 y encerrado en rectángulo la probable caja AnsR.

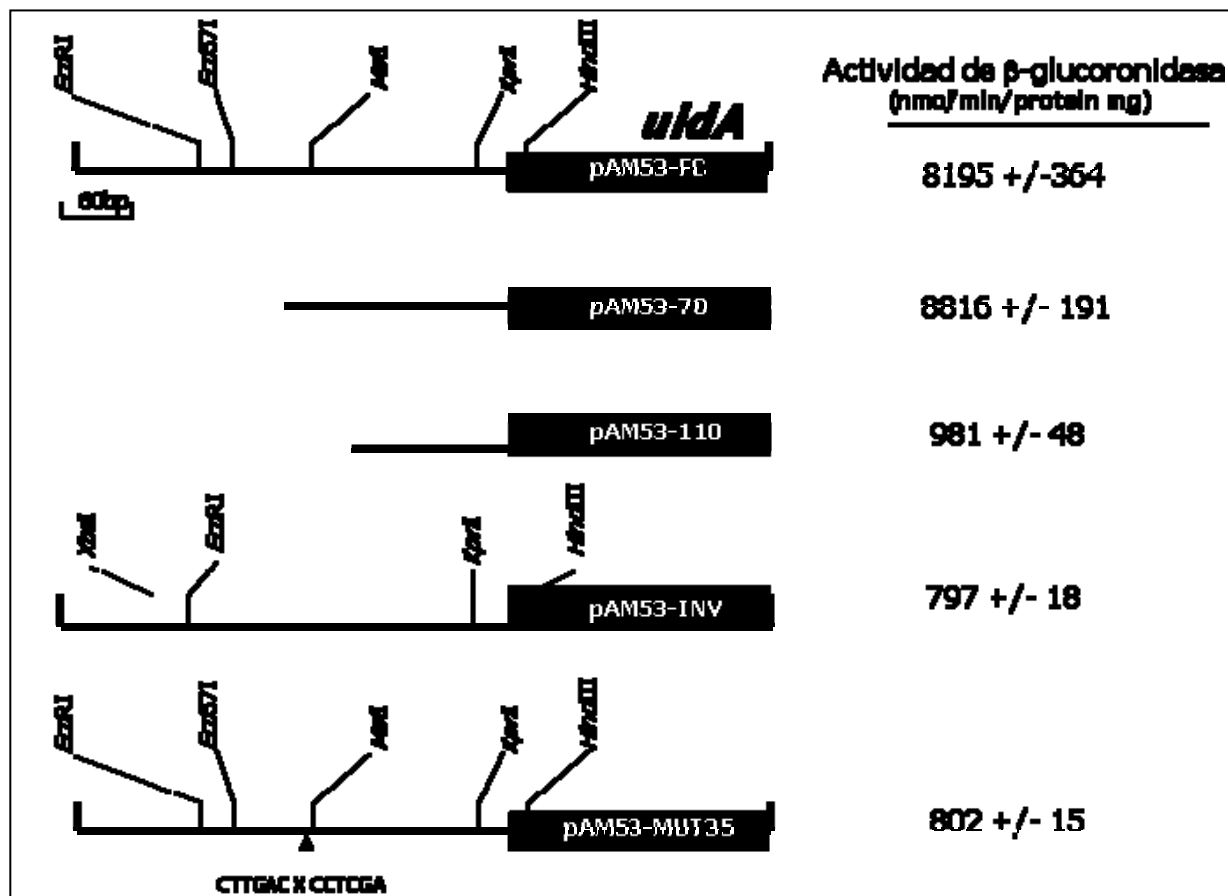


Fig. 4. Actividad de β -glucuronidasa de las cepas mutantes. Efecto de las deleciones sobre la actividad de la β -glucuronidasa, determinado después de 16 horas de crecimiento. Los resultados corresponden al promedio de 3 cultivos independientes. Se muestra el inserto contenido en el plásmido pBBMC53 así como los sitios de las enzimas de restricción empleadas para la construcción de los diferentes plásmidos. A la derecha del esquema se muestran los valores de la actividad enzimática.

VIII. 3. DETERMINACIÓN DEL SITIO DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL OPERÓN *ans*.

Los resultados anteriormente mostrados sugieren que en la región de 40 pb deletadas en la mutante pAM53-110 respecto a pAM53-70 están presentes elementos indispensables para la activación del promotor que favorecen la expresión del operón. Aunque la mutante pAM53-110 mantiene los sitios de unión para el reconocimiento del factor sigma 54 de la RNA polimerasa se abate la actividad enzimática hasta los niveles de la cepa silvestre, por lo que en la región de 40 pb se encuentran los elementos que probablemente puedan funcionar como sitio de unión de una proteína que permita a la RNA polimerasa isomerizar de complejo cerrado a complejo abierto y permitir la transcripción del operón (53). Debido a lo anterior se determinó el sitio de inicio de la transcripción del operón mediante el ensayo de alta resolución por protección contra nucleasa S1.

Para realizar lo anterior se obtuvo RNA total de la cepa silvestre *R. etli* CE3 y *R. etli* AHZ7pAHZ11, a las 16 horas de crecimiento de las células en los diferentes medios como se indica en Material y Métodos. Los ensayos de protección mostraron que en ambas cepas el sitio de inicio de la transcripción del operón, es decir la posición +1, se encuentra en el nucleótido G a 33 pb río arriba del probable sitio de unión de AnsR, justo dentro de la región -24 sugerida por Ortuño-Olea y Durán-Vargas (36) como el sitio de unión del factor sigma 54 (Fig. No. 5A carriles 4 y7). Con estos resultados se procedió a analizar la secuencia río arriba del inicio de la transcripción, encontrando a 8 pb río arriba respecto de la posición +1 la secuencia TCTATT y a 17 pb de ésta la secuencia CTTGAC, elementos que tienen consenso con los sitios -10 y -35, respectivamente, para promotores de *R. etli* dependientes del factor sigma 70 (SigA) lo que indica que en esas 40 pb se encuentra en el promotor del operón *ans* y no secuencias de unión de proteínas reguladoras para la activación de la transcripción dependientes del factor sigma 54. La región -35 identificada (CTTGAC)

presentó consenso exacto con la región -35 reportada para promotores de *R. etli* (CTTGAC), mientras que la secuencia de la región -10 (ICTATT) presenta consenso de 3 bases con la región -10 (TATNNT) reportada para *R. etli*. La distancia entre los sitios -10 y -35 también es un elemento que se encuentra conservado en el promotor identificado (17 pb), lo que coincide con la distancia que presentan diversos promotores regulados por sigma 70 de *R. etli* (N 16-23 pb). Así mismo la distancia entre el sitio de inicio de la transcripción y el sitio -10 concuerda con lo reportado para estos promotores (6 a 9 pb) (42).

Con este experimento se demuestra que los sitios -12 y -24 no son funcionales y que el promotor del operón *asn* es dependiente de sigma 70 y no de sigma 54 como se propuso en trabajos anteriores.

Adicionalmente a la identificación de los sitios de inicio de la transcripción se probaron diferentes condiciones de crecimiento de las cepas, en las que se observa que la expresión del operón a nivel

transcripcional se induce por la asparagina cuando está presente como única fuente de carbono y nitrógeno. Cuando la cepa de *R. etli* CE3 creció en medio PY o MM con succinato y amonio, la transcripción del operón se vio reprimida respecto a cuando creció en MM con asparagina (Fig. No. 5A, carriles 2, 3 y 4), lo que sugiere la existencia de represión catabólica a nivel transcripcional por la fuente de carbono.

Cuando la cepa de *R. etli* AHZ7pAHZ11 creció en PY no se observó transcripción, resultado que concuerda con lo obtenido para la cepa CE3 (Fig. 5A, línea 5). Sin embargo, cuando creció en MM con succinato y amonio a diferencia de lo observado con la cepa CE3 se observó transcripción del operón (Fig. 5A, línea 6), aunque a niveles inferiores de cuando crece únicamente en presencia de asparagina (Fig. 5A, carril 7). Adicionalmente, se observó que en presencia de asparagina, esta cepa presentó un nivel de transcripción incluso varios ordenes de magnitud mayor respecto a la cepa CE3 crecida en las

mismas condiciones, lo que confirma que la asparagina es el inductor de la expresión del operón *asn*.

Es importante señalar que la expresión del operón observada en la cepa AHZ7pAHZ11 cuando creció en presencia de succinato y amonio pudo deberse a que la represión catabólica bajo estas condiciones no es suficiente para reprimir totalmente la transcripción, resultado que coincide con la actividad enzimática detectada de asparaginasa II cuando la cepa se encuentra en una mala fuente de carbono como succinato (15), ya que en un medio rico como PY se encuentra totalmente reprimida la expresión del operón *ansPAB*.

La figura 5B resume los elementos determinados por el experimento de protección contra la nucleasa S1, en la que se observa el sitio +1 y curso abajo de éste el probable sitio de unión de AnsR y hacia arriba las regiones consenso -10 y -35.

VIII. 4. EVALUACIÓN DE LA IMPORTANCIA DE LA REGIÓN -35 EN EL PROMOTOR.

Para confirmar que la región -35 identificada es funcional y es el sitio donde se une el factor sigma 70, se examinó el efecto de la mutación en esta región sobre la expresión de la fusión transcripcional *ansP:uidA* (Fig. 4). Para esto, se realizó mutagénesis sitio dirigida para cambiar 4 nucleótidos de la secuencia silvestre CTTGAC a CCTCGA usando como templado el plásmido pAM18FC que contiene la región promotora silvestre, el fragmento obtenido fue subclonado en el vector pBBMCS53 (pAM53-MUT35). Los experimentos para cuantificar la actividad de β -glucuronidasa en esta mutante mostraron un nivel de expresión similar al de la cepa CE3-pMCSBB53. Este resultado indica que la región -35 identificada en este promotor es un elemento importante para la transcripción del operón y que la integridad de su secuencia se requiere para la transcripción del operón.

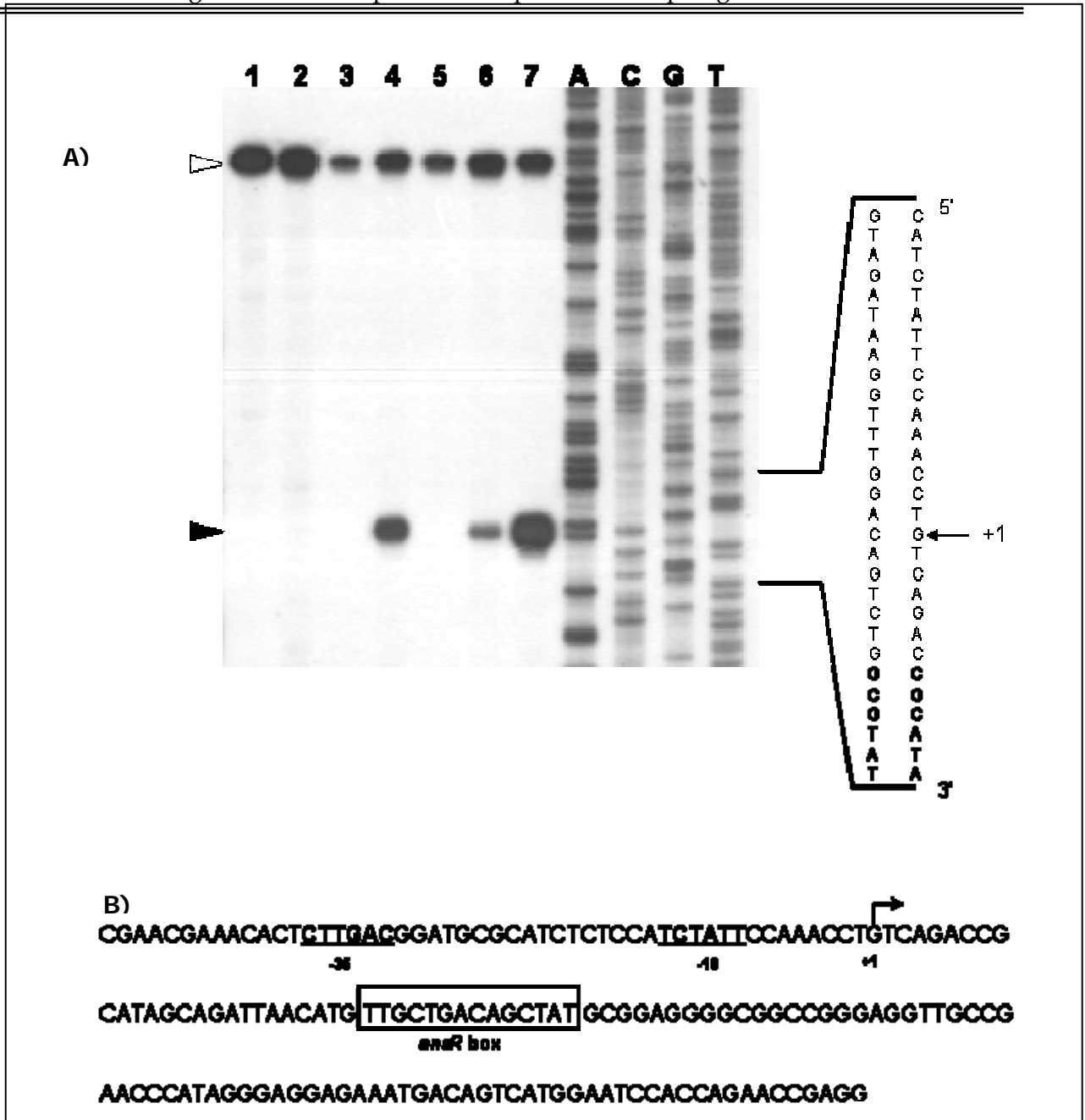


Fig. 5. A) Mapeo de alta resolución por nucleasa S1 de los transcritos obtenidos en las cepas de *R. etli* y la mutante AHZ7. Los triángulos en negro indican la banda que corresponde a los transcritos de la fusiones, mientras que los triángulos en blanco indican la posición de la sonda no digerida. Carril 1. sin RNA; carril 2. *R. etli* CE3 en medio PY; carril 3. *R. etli* CE3 en MM +succinato y NH₄; carril 4. *R. etli* CE3 en medio MM-asparagina. carril 5. *R. etli* AHZ7pAHZ11 en medio PY; carril 6. *R. etli* AHZ7pAHZ11 en MM-succinato y NH₄; carril 7. *R. etli* AHZ7pAHZ11 en MM-asparagina. Carriles A,C,G,T, constituyen la reacción de secuencia de la región promotora. B). Región promotora del operón *ans* donde se muestra la posición +1 y las cajas -10 y -35 consenso de promotores dependientes de sigma 70 de *R. etli*.

IX. DISCUSION

En el presente estudio se analizó la región promotora del operón *ans* de *Rhizobium etli* determinando algunos elementos de la región intergénica que son importantes para su expresión. Anteriormente, se había identificado por análisis de la secuencia la presencia de las regiones -12 y -24 con consenso respecto a promotores dependientes del factor transcripcional sigma 54 de *E. coli* (36); sin embargo, faltó demostrar experimentalmente que estos sitios eran funcionales e importantes para la transcripción del operón.

Los resultados del presente estudio claramente muestran que la expresión del promotor es dependiente del factor sigma 70 (sigA) de *Rhizobium etli* en vez del factor sigma 54. Esta conclusión se apoya en los experimentos *in vivo* en los que se eliminaron diferentes fragmentos de la región intergénica *ansP-asnR* pero sin afectar las probables regiones -12 y -24 del promotor. En este sentido se observó que el fragmento de 40 pb río arriba del probable sitio -24 contiene los

elementos necesarios para regular la transcripción, ya que en presencia de esta región la expresión del operón se mantiene a niveles similares a los encontrados en el promotor silvestre, pero sin ella se observa una disminución drástica en la actividad enzimática de β -glucuronidasa. Cabe mencionar que experimentos previos con la cepa CE3 y CE3 AHZ7 donde se cuantificó actividad de asparaginasa, mostraron que en cualquier fuente de carbono diferente a asparagina la actividad enzimática es muy baja o casi nula, lo que hace suponer que las probables regiones -12 y -24 no son funcionales en ninguna fuente de carbono o nitrógeno (16).

Para confirmar lo mencionado anteriormente, fue necesario determinar el sitio de inicio de la transcripción para realizar un análisis de la secuencia río arriba de éste. Los experimentos realizados mostraron que el sitio de inicio de la transcripción es el nucleótido guanina (G) ubicada dentro del hexámero de la región -24 (TGTCAG). Río arriba de este nucleótido a 8 pb se identificó la secuencia TCTATT

y a 17 pb de esta última la secuencia CTTCAG, las cuales están conservadas respecto a las regiones -10 y -35 respectivamente, para diversos promotores dependientes de sigma70 de *Rhizobium etli* (42). Además la distancia que hay entre el sitio de inicio de la transcripción y la región -10 así como la distancia que hay entre la región -10 y -35 corresponden a características reportadas para diversos promotores de *R. etli* (32) (Fig. 6). La funcionalidad e importancia de uno de estos elementos fue determinada mediante la evaluación del efecto de mutaciones sitio dirigidas en la caja -35, sobre la expresión de la enzima β -glucuronidasa; los resultados mostraron la importancia de la región -35 para la actividad transcripcional del operón y que estos cambios disminuyen completamente la actividad enzimática de β -glucuronidasa.

GEN	- 35	- 10
1. <i>ansP</i>	AAACACT CTTGAC GGATGCGCA ----- TCTCTCCA TCTATT CC ---- AACCT G	
2. <i>repA</i>	AAAACCC CTTGCTC AAAATGCA ----- GAATCGGG TCTAAT AG ---- CTAG GTG	
3. <i>ctRNA</i>	AAAGACT CTTGACC AGGATTTCG ----- AGGAAATGC GATTCT GT ----- TCTTG	
4. <i>recA</i>	----- CCTAT TGCGG GAATGGAA ----- CAAATGGGG TACAAAC T ----- CGACA	
5. <i>lipA</i>	-TTATTT CGTGACC GGTTTCCTTGGCGCCTGC TGATAT T --- CTTG CGCG	
6. <i>thiC</i>	CTTGAC ACAAGAGACGCTCCGGT CTTTGAT GGCGACC ATTCA CC ----AGGG GTG	
7. <i>nifR</i>	-AGCCCC CTTGGA AAAGCCATG ----GATCTGTGG TAAAAA TA -----AT GCA	
8. <i>nifR</i>	CAGTTCTAT TGGTGT GCCTGAAA ----- GATAATCA TTTGAT TT ----GCAAGAA	
9. <i>sigA</i>	-CAAAG CTTGAC GAGAACAAA ----- AAATGTGGGA ATCA CCG ----TTC GAC	
10. <i>Eda</i>	GTTTTAT CTCGAC AAGGTTCCG----- CGAGGGCG TATT CCGGG -----AT	
11. <i>engB</i>	-TGAAAG CTTGAC ATCCGCCCG ---- TAAACCACGA AGCC GAC -----AG GAA	
12. <i>16S</i>	-ATGGCTG TTGACT TAGAAAAG ---- GGGTTGGTT CTATA AGCC ---- CACTCA	
13. <i>hemC</i>	TTCATTCA TTGCGAT GGAACGG ----- AAACCCG TTAC GAGAA ---TTC CGGT	
14. <i>clpP</i>	-GCGTGT CTTGA AAGAGGAGGGC ---- AGGGACACT CTAT GTAGG ----- GATA	
15. <i>rpoH1</i>	CGGCAC CTTGA ACC GCCCTTT ----- CGCCATACT TATCT GTA ---- TAT GGA	
16. <i>aroG</i>	-ATTCTG CGTGACA ACGGAAGG ----- CCGCCACG CTAAC CACG -----CC GCA	
17. <i>ureA</i>	-TTCCGT CTTGC GCAATGGTGC ---- GCCTGTGCC GAAAG TCT ----- GGAAT	
18. <i>pfs</i>	TTCGACG TTAAACT GACACAG ----- CAGCACGG CATC CTGC --- ATG CGGGC	
19. <i>cycH</i>	-TTGGCAG TTGGAAT AGGCGTG----- CGCTT CACGTAT TTGGG ---- CCGATA	
20. <i>rpsP</i>	TCCTGA ACTTCGT CATCAAGGA ---- AGTCATCC GGCAT CATGA ----- GC	
21. <i>ispB</i>	TTCAC CTTGC CGGTCCATC ----GCCC TTTCTAT TGTCA ----GCT GCA	
22. <i>exoR2</i>	ATACCG TTGGT CACATTTGC --TATTTACGA ATCCGATA ACGG ---- GGG GAA	
	CTTGAC	TATNNT
	N ₁₆₋₂₃	N ₃₋₁₀

Fig 6. Alineamiento de la región promotora del operón *asn* (1) con otros promotores de *Rhizobium* identificados experimentalmente (2 - 8) así como promotores identificados usando el software WCONCENSUS versión v5c. (9-22). Se observan que el promotor del operón *ans* alinea con las 6 bases del hexámero consenso de la región -35, mientras que para el hexámero consenso de la región -10 solamente alinea con 3 bases; la distancia entre las 2 regiones (17pb) también se encuentra dentro de la distancia consenso así como la distancia entre la región -10 y el inicio de la transcripción, que inicia en el nucleótido G como en varios de los que se presentan. 1, *ansP* operón *ans* *R. etli*; 2, *repA* proteína RepAD; 3, *ctRNA* Regulador de RNA antisentido; 4, *recA* recombinasa A; 5, *lipA* sintetasa de ácido lipóico; 6, *thiC* biosíntesis de tiamina (thiCOGE); 7, *nifR* regulación de nitrógeno de *R. leguminosarum*; 8, *nifR* regulación de nitrógeno *R. leguminosarum*; 9, *sigA* factor sigma70 de la RNapolimerasa; 10, *Eda* aldolasa KHG-KDPG; 11, *engB* proteína de unión a GTP; 12, *16S* rRNA RNA ribosomal 16S; 13, *hemC* deaminasa de forfobolinogeno; 14, *clpP* proteína ClpP proteasa proteolítica dependiente de ATP subunidad 2; 15, *rpoH1* Factor sigma 32 de la RNapolimerasa; 16, *aroG* fosfo-2-dehidro-3- deoxiheptonato aldolasa; 17, *ureA* ureasa subunidad gama; 18, *pfs* nucleosidasa P46; 19, *cycH* citocromo C; 20, *rpsP* proteína ribosomal 30S; 21, *ispB* octafrenil bifosfato sintasa; 22. *exoR2* Regulador negativo de la producción de exopolisacáridos. Tomado de Ramírez - Romero *et. al.* (42).

Rhizobium etli puede utilizar asparagina como única fuente de carbono y nitrógeno a través de la acción de L-.asparaginasa y de L-aspartasa. En el caso de la asparaginasa II se encontró que ésta es regulada positivamente por la asparagina y negativamente por la fuente de carbono, no está regulada por la cantidad de oxígeno disuelto en el medio ni por represión catabólica por nitrógeno, aunque se detecta baja actividad de asparaginasa cuando las células crecen en presencia de succinato y amonio (15). Los resultados obtenidos por el mapeo muestran que, en *R. etli* CE3 la expresión del operón a nivel transcripcional es inducida por la asparagina y es regulada negativamente por la fuente de carbono, tanto en medio PY como en MM con succinato y amonio, lo que confirma lo expuesto previamente. En el caso de la mutante *R. etli* AHZ7pAHZ11, que es una cepa afectada en la expresión de la asparaginasa II por una mutación por inserción del transposón Tn5 en el gen *asnA*, pero que está restaurada expresión de la actividad enzimática por introducción del plásmido pAHZ11, que contiene un fragmento de DNA con el operón *ans* completo (16), se observó que es regulado negativamente por la fuente

de carbono (medio PY) y positivamente por la asparagina. Existe una diferencia importante entre el nivel de transcripción observado con la cepa silvestre en comparación con la mutante complementada, donde en esta última se encontró un nivel de transcripción más alto de al menos 3 ordenes de magnitud. A diferencia de la cepa silvestre CE3, la cepa mutante complementada cuando crece en MM con succinato y amonio presentó expresión del operón. Esto hace suponer que la actividad de asparaginasa que se observó en trabajos anteriores (15 y 16) se debe a que en estas condiciones de crecimiento la regulación de la transcripción por la fuente de carbono no reprime totalmente la expresión del operón. Este efecto puede deberse a dos condiciones que pudieron actuar de forma sinérgica, por un lado la fuente de carbono y por otro el número de copias en ambas cepas. En el primer caso el succinato, considerado como una fuente de carbono pobre, no es capaz de reprimir completamente la expresión del operón en la cepa mutante complementada a diferencia de la completa represión observada en presencia de medio rico (PY). En el segundo, el mayor número de

copias del operón que se transcriben a partir del plásmido pAHZ11 respecto a la condición en la que se encuentra en la cepa CE3 silvestre, podría ser un factor que contribuya a los niveles de transcrito que se observaron en el experimento del mapeo del inicio de la transcripción. Sin embargo, es claro que esta cepa cuando crece en medio rico PY no exhibe actividad transcripcional del operón.

Finalmente, los intentos para sobre-expresar y purificar la proteína represora AnsR no fueron exitosos, aún después de probar diferentes estrategias metodológicas modificando condiciones de crecimiento, variando la temperatura de crecimiento, la densidad celular a la cual inducir la expresión del represor, la concentración de IPTG y el tiempo de inducción. Lo que sugiere que probablemente la proteína resulta tóxica para las células ya que aún antes de realizar la inducción de la proteína las cepas transformadas presentaban crecimiento limitado.

Por lo tanto el objetivo de identificar el sitio exacto de unión del represor no se cumplió. Sería interesante explorar por un lado otros sistemas para expresar la proteína como pueden ser sistemas de expresión que excretan las proteínas inducidas, utilizar otros organismos como pueden ser levaduras y hasta sistemas *in Vitro* como transcripción y traducción acoplada. O bien, realizar experimentos *in vivo* de mutagénesis en el gen *AnsR* y probar su efecto en la regulación del operón y/o mutagénesis en el sitio de unión de *AnsR* localizado en la región promotora del operón.

Aunque no se logró determinar cual es el papel del represor *AnsR* es importante considerar que el modelo presentado en este estudio comparte características con otros modelos regulados por los represores transcripcionales de la familia *GntR* donde el represor de los operones esta localizado adyacente río arriba a los genes que reprime, por ejemplo *FadR*, *GntR*, *NanR* y *MatR* (44). Por lo tanto, se puede sugerir que el gen *ansR* codifica para el represor transcripcional *AnsR*.

X. CONCLUSIONES.

- ❖ La regulación transcripcional del operón *ans* es dependiente del factor sigma 70 (SigA).

- ❖ El sitio de inicio de la transcripción se ubica en el nucleótido G, ubicada a 8 y 17 pb de las regiones -10 y -35 respectivamente.

- ❖ Las regiones -35 y -10 determinadas presentan consenso con promotores dependientes del factor sigma 70 de *Rhizobium etli*.

- ❖ El análisis del promotor muestra que la distancia entre las regiones -10 y -35 así como la caja -10 y la posición +1 es de 18 y 10 pb, respectivamente, distancia que concuerda con diversos promotores de *R. etli*.

- ❖ El inductor de la expresión del operón a nivel transcripcional es la asparagina.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Beringer, J. E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. 84:188-198.
- 1a. Borek, D. and Jaskólski, M. 2001. Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. Acta Biochim. Pol. 48: 893-902
2. Calderón-Flores, A. 2005. Caracterización de la mutantes LM01 de *Rhizobium etli* que se encuentra alterada en la degradación de glutamato y glutamina, y en su relación simbiótica con *Phaseous vulgaris*. Tesis Doctoral. UNAM. p94.
3. Day, R. B., Loh, J., Cohn, J. R. and Stacey, G. 2000. Signal exchange in the establishment of the Bradyrhizobium-legume symbiosis. In Prokaryotic fixation: a model system for the analysis of a biological process. Triplett, E. (ed) Norfolk, England: Horizon Scientific Press. pp 385-414.
4. Day, D. A., Poole, P. S., Tyerman, S. D. and Rosendahl, L. 2001. Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. Cell. Mol. Life Sci. 58:61-71.
5. DiRusso, C., Heimert, T. L. and Metzger, A. K. 1992. Characterization of FadR, a global transcriptional regulator of fatty acid metabolism in *Escherichia coli*. The J. Biol. Chem. 267:8685-8691.
6. Dixon, R. and Kahn, D. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation. Nat. Rev. Microbiol. 2:621-631.
7. Durán, S., Du Pont, G., Huerta-Zepeda, A. and Calderón, J. 1995. The role of glutaminase in *Rhizobium etli*: studied with a new mutante. Microbiol. 114:2883-2889.
8. Engelke, T., Jording, D., Kapp, D. and Pühler, A. 1989. Identification and sequence analysis of the *Rhizobium meliloti* *dctA* gene encoding the C4-dicarboxylate carrier. J. Bacteriol. 171:5551-5560.
9. Fisher, S. H. and Wray, L. V. 2002. *Bacillus subtilis* 168 contains two differentially regulated genes encoding L-Asparaginase. J. Bacteriol. 184: 2148-2154.
10. Fujita, Y., Fujita, T., Miwa, Y., Nihasi, J. and Arantani, Y. 1986. Organization

and transcription of the gluconate operon *gnt* of *Bacillus subtilis*. J. Mol. Chem. 261:13744-13753.

11. Garg, B., Dogra, R. and Sharma, P. 1999. High-efficiency transformation of *Rhizobium leguminosarum* by electroporation. Appl. Environ. Microbiol. 65:2802-2804.
12. Girard, L., Brom, S., Dávalos, A., López, O., Soberón, M. and Romero, D. 2000. Differential regulation of *fixN*-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel *fixL*-*fixK* cascade. Mol. Plant Microbe Interact. 13:1283-1292.
13. González, V., Santamaría, R. I., Bustos, P., Hernández-González, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., Janga, S. C., Ramírez, M. A., Jiménez-Jacinto, Collado-Vides, J. and Dávila, G. 2006. The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. Proc. Natl. Acad. Sci. 103:3834-3839.
14. Harrod, A. C., Yang, X., Junker, M. and Reitzer, L. 2004. Evidence for a second interaction between the regulatory amino-terminal and central output domains of the response regulator NtrC (nitrogen regulator I) in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 279:2350-2359.
15. Huerta-Zepeda, A., Durán, S., Du Pont, G. and Calderón, J. 1996. Asparagine degradation in *Rhizobium etli*. Microbiol. 142:1071-1076.
16. Huerta-Zepeda, A., Ortuño, L., Du Pont, G., Durán, S., Lloret, A., Merchant-Larios, H. and Calderón, J. 1997. Isolation and characterization of *Rhizobium etli* mutants altered in degradation of asparagine. J. Bacteriol. 176:2068-2072.
17. Huffman, J. L. and Brennan, R. G. 2002. Prokaryotic transcription regulators: more than just the Helix-Turn-Helix motif. Curr. Opin. Struct. Biol. 12:98-106.
18. Jennings, M. P., Scott, S. P. and Beachman, I. R. 1993. Regulation of the *ansB* gene of *Salmonella enterica*. Mol. Microbiol. 9:165-72.
19. Jennings, M. P. and Beacham, I. F. 1993. Co- dependent positive regulation of the *ansB* promoter of *Escherichia coli* by CRP and the FNR protein: a molecular analysis. Mol. Microbiol. 9:155-164.
20. Jerlström, P. G., Bezak, D. A. Jennings, M. and Beachman, I. R. 1987. Regulation of *Escherichia coli* L-asparaginase II and L-aspartase by the *fur*

gene product. FEMS Microbiol. Lett. 41:127-130.

21. Jennie Cho. Adapted from Wilson *et al.*, The *Escherichia coli gus* operon: Induction and expression of the *gus* operon in *E.coli* and the occurrence and use of GUS in other bacteria. From GUS protocols: Using the *gus* gene as a reporter of gene expression. Ed. Sean R. Gallagher. Academic Press, Inc., 1992. edited by Phil Lessard 2002.
22. Kai Bao and Cohen, S. N. 2001. Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*. Genes Dev. 15:1518-1527.
23. Kalivoda, K. A., Steenbergen, S. M., Virm, E. R. and Plumbridge, J. 2003. Regulation of sialic acid catabolism by the DNA binding protein NanR in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 185:4806-4815.
24. Kahn, M. L., Kraus, J. and Somerville, J. E. 1985. A model of nutrient exchange in the *Rhizobium*-legume symbiosis. P 193-199. In Evans, H., Bottmley, P. and Newton W. E. (ed). Nitrogen fixation research progress. M. J. Nijhoff New York.
25. Kieser, T.M., Bibb, M. J., Buttner, K. F., Chater, Y. and Hopwood, D. A. 2000. Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation, Norwich.
26. Kyte, J. and Doolittle, R. 1982. A simple method of displaying the hydrophobic nature of protein. J. Mol. Biol. 157:105-132.
27. Kuykendall, L. D., Young, J. M., Martínez-Romero, E., Kerr, A. and Sawada, H. 2005. Genus I. *Rhizobium* Frank 1889. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2, 2a edición. D.J. Brenner & J.T. Stanley (eds). Springer.
28. Labidi, M., Lalande, R., Laberge, S. and Antoun, H. 1996. Effect of glutamate transport and catabolism on symbiotic effectiveness in *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli*. Plant and Soil. 182:51-58.
29. Lee, H. Y. L., Hyung An, J. and Kim, Y. S. 2000. Identification and characterization of a novel transcriptional regulator, MatR for malonate metabolism in *Rhizobium leguminosartum* bv *trifoli*. Eur. J. Biochem. 267:7224-7229.
30. Lodwing, E. M., Hosie, A. H. F., Bourdès, A., Findlay, K., Allaway, D., Karunakaran, R., Downie, J. A. and Poole, P. S. 2003. Amino-acid cycling

- drives nitrogen fixation in the legume-Rhizobium symbiosis. *Nature*. 422:722-726.
31. Long, S. R. 1989. *Rhizobium-legume* nodulation: Life together the underground. *Cell*. 56:203-214.
 32. MacLellan, S. R., MacLean, A. M. and Finan, T. M. 2006. Promoter prediction in the rhizobia. *Microbiol*. 152:1751-1763.
 33. Moris, M., Dombrecht, B., Xi, C., Vanderleyden, J. and Michiels, J. 2004. Regulatory role of *Rhizobium etli* CNPAF512 *furN* during symbiosis. *Applied Environ. Microbiol*. 70:1287-1296.
 34. Murray, M. G. 1986. Use the sodium trichloroacetate and mung bean nuclease to increase sensitivity and precision during transcript mapping. *Anal. Biochem*. 159:165-170.
 35. Mylona, P., Pawlowski, K. and Bisseling, T. 1995. Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell*. 7:869-885.
 36. Ortuño-Olea, L. and Durán-Vargas, S. 2000. The L-asparagine operon of *Rhizobium etli* contains a gene encoding an atypical asparaginase. *FEMS Microbiol. Letts* 189:177-182.
 37. Patriarca, E.J., Tatè, R. and Iaccarino, M. 2002. Key role of bacterial NH⁴ metabolism in *Rhizobium* plant symbiosis. *Microbiol Mol Biol*. 66:203-22.
 38. Peekhaus, N. and Conway, T. 1998. Positive and negative transcriptional regulation of the *Escherichia coli* gluconate regulon gene *gntT* by GntR and the cyclic AMP (cAMP)-cAMP receptor protein complex. *J. Bacteriol*. 180: 1777-1785.
 39. Prell, J. and Poole, P. 2006. Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol*. 14:161-168.
 40. Prell, J., Whiteb, J. P., Bourdesa, A., Bunnewella, S., Bongaertsc, R. J. and Poolea, P. S. 2009. Legumes regulate *Rhizobium* bacteroid development and persistence by the supply of branched-chain amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci* 106:12477-12482.
 41. Porco, A. N., Peekhaus, C., Tong, S. and Isluriz, T. 1997. Molecular genetic characterization of the *Escherichia coli* *gntT* gene of GntI, the main system for

- gluconate metabolism. J. Bacteriol. 179:1584-1590.
42. Ramírez-Romero, M. A., Masulis, I., Cevallos, M. A., González, V. and Dávila, G. 2006. The *Rhizobium etli* sigma 70 (SigA) factor recognizes a lax consensus promoter. Nucleic Acids Res. 34:1470-1480.
44. Rigali, S., Derouaux, A., Giannotta, F. and Dusart, J. 2002. Subdivision of the Helix-Turn-Helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. J. Biol. Chem. 277:12507-12515.
46. Sambrook, J. and Rusell, D. W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3er ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N. Y.
47. Schultze, M. and Kondorosi, A. 1998. Regulation of symbiotic root nodule development. Annu. Rev. Genet. 32:33-57.
48. Servín-González, L., Jensen, M. R., White, J. and Bibb, M. 1994. Transcriptional regulation of the four promoters of the agarose gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). Microbiol. 140:2555-2565.
49. Sun, D. and Setlow, P. 1991. Cloning, nucleotide sequence and expression of the *Bacillus subtilis ans* operon, wich codes for L-Asparaginase and L-aspartase. J. Bacteriol. 173:3831-3845.
50. Sun, D. and Setlow, P. 1993. Cloning and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis ansR* gene, wich encodes a repressor of the *ans* operon coding for L-Asparaginase and L-Aspartase. J. Bacteriol. 175:2501-2506.
51. Takagi, J. S., Tokushige, M. and Shimura, Y. 1986. Cloning and nucleotide sequence of the aspartase gen of *Pseudomonas fluorescens*. J. Biochem. 100:697-705.
52. Tate, R., Ferraioli, S., Filosa, S., Cermola, M. and Riccio, A. 2004. Glutamine utilization by *Rhizobium etli*. Mol. Plant Microbe Interact. 17:720-728.
53. Tintut, Y., Wang, J. T. and Gralla, J. D. 1995. A novel bacterial transcription cycle involving σ^{54} . Genes and Development. 9:2305-2313.
54. Wang, T. and Martínez-Romero, J. La Taxonomía de *Rhizobium*. En: Microbios en línea. Martínez-Romero, E. y Martínez Romero, J. editores. UNAM. (<http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/>)

56. Xu, Y. Heath, R. J., Li, Z. Rock, C. O. and White, S. W. 2001 The FadR-DNA complex. Transcriptional control of fatty acid metabolism in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 276:17373-17379.
57. Yanagi, M. and Yamasato, K. 1983. Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. FEMS Microbiol. Lett. 107:105-107.
58. Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene. 33:103-119.
60. <http://www.tamu.edu/classes/bmiles/lectures/amcat.pdf>