

20/174

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS



UN NUEVO FENOTIPO RELACIONADO CON LA
ASIMILACION DE AMONIO POR ESCHERICHIA COLI K12

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A

LUIS SERVIN GONZALEZ

México, D. F.

1981



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.

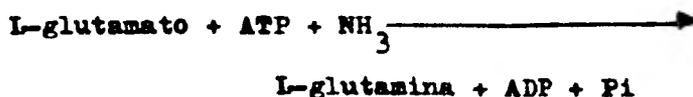
TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N T R O D U C C I O N .

Cualquier sistema celular, sea éste de algún microorganismo, de alguna planta o de algún animal, requiere un abastecimiento de nitrógeno que pueda ser asimilado e incorporado en macromoléculas. El metabolismo de nitrógeno se puede dividir en dos tipos de reacciones: los caminos asimilatorios para incorporar el nitrógeno disponible en los compuestos presentes en el medio, y los caminos biosintéticos que dan lugar a la producción de los compuestos celulares que poseen nitrógeno (1).

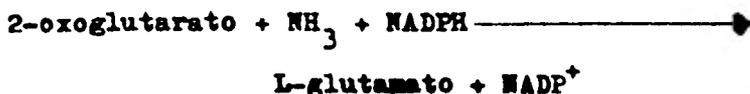
En las enterobacterias, así como en la mayoría de los tipos celulares, la glutamina ocupa un papel central dentro del metabolismo del nitrógeno (1, 2, 3), ya que funciona como donador de grupos amino y amido en una serie de caminos biosintéticos, entre los que se encuentran la formación de aminoácidos como glutamato, triptofano e histidina, la síntesis de carbamil-fosfato, CTP, AMP, glucosamina-6-fosfato, etc. (1, 2, 3). Debido a la importancia que tiene la glutamina para el metabolismo de los compuestos nitrogenados celulares, la enzima que se encarga de sintetizarla es de suma importancia para la célula, y su síntesis y su actividad enzimática están sujetas a un control muy preciso. Dicha enzima, que es la única enzima capaz de sintetizar glutamina, es la glutamino-sintetasa, o GS (EC 6.3.1.2). La glutamino sintetasa

es una proteína que en Escherichia coli está compuesta de doce subunidades idénticas, cada una con un peso de aproximadamente 50,000 daltones (1, 2). La reacción ___ que lleva a cabo es la siguiente:

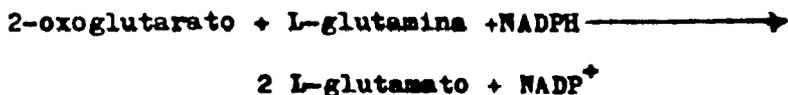


y requiere de la presencia de un catión divalente, tal como Mg^{++} , Mn^{++} o Co^{++} (2).

Otra enzima capaz de incorporar amonio es la deshidrogenasa glutámica, o GDH (EC 1.4.1.4), la cual lleva a cabo la síntesis de ácido glutámico a partir de _ 2-oxoglutarato y amonio:



A su vez, la glutamina puede ser transformada a glutamato por medio de la glutamato sintasa, o GOGAT, (EC 1.4.1.3):



De esta forma, la interacción existente entre estas tres enzimas determinará los niveles de 2-oxoglutarato, glutamato y glutamina existentes dentro de la célula, y por lo tanto la disponibilidad de nitrógeno para el metabolismo celular. Particularmente importante es el nivel de la GS y su actividad enzimática, y por lo tanto existen varios mecanismos que la controlan.

Uno de estos mecanismos es la inhibición por retroalimentación de productos finales del metabolismo de glutamina (3, 4); otro es la interconversión entre una forma relajada o inactiva y una forma activa como respuesta a la variación de las concentraciones de cationes divalentes (1, 4), y el último mecanismo que regula la actividad enzimática de GS es un sistema de "cascada" consistente en varias enzimas reguladas por metabolitos y por una pequeña proteína reguladora (4, 5). Este sistema de cascada es bicíclico; un ciclo involucra la adenilación y desadenilación de subunidades de la GS, lo que da lugar a subunidades que son inactivas al estar adeniladas; el otro ciclo involucra la uridilación y desuridilación de una pequeña proteína reguladora conocida como proteína P_{II} . Las reacciones de adenilación y desadenilación de la GS son catalizadas por una adeniltransferasa (ATasa), mientras que las de uridilación y desuridilación de la proteína P_{II} son catalizadas por una uridiltransferasa (UTasa). Los dos ciclos están ligados in vivo de la siguiente manera: la proteína P_{II} puede encontrarse en dos formas, uridilada y no uridilada, P_{IID} y P_{IIA} , respectivamente; la uridilación y desuridilación de la proteína P_{II} está determinada por los niveles de ATP, 2-oxoglutarato y glutamina dentro de la célula, de manera que cuando hay mucho ATP y 2-oxoglutarato, y hay poca glutamina, la proteína se encuentra en su forma uridilada y cuando los niveles de 2-oxoglutarato y ATP son bajos y los de glutamina altos, la proteína P_{II} es desuridilada. La forma

(4)

no uridilada de la proteína P_{II} (P_{IIA}), va a estimular a la ATasa para que adenile a las subunidades de la GS y las vuelva biosintéticamente inactivas, mientras que la forma uridilada de la proteína P_{II} (P_{IID}), va a estimular a la ATasa para que desadenile a las subunidades de la GS y las vuelva a su forma biosintéticamente activa. De esta manera la actividad enzimática de la GS está controlada por los niveles de ATP, glutamina y 2-oxoglutarato.

Los mecanismos descritos anteriormente son los que regulan la actividad enzimática de la GS. Sin embargo, no sólo está regulada la actividad enzimática de esta enzima, sino también sus niveles de síntesis (1). Cuando se crece a una enterobacteria, tal como Escherichia coli, Salmonella, o Klebsiella en un medio con una alta concentración de amonio, GS es sintetizada en cantidades menores que cuando se crece en condiciones limitantes de nitrógeno, como pueden ser una baja concentración de amonio o un aminoácido como fuente de nitrógeno (1). Esto quiere decir que el gene estructural para la GS está sujeto a una regulación a nivel de transcripción.

En Escherichia coli el gene estructural para la GS se encuentra localizado en el minuto 86 del mapa de ligamiento (6), y se conoce como glnA. El estudio de la expresión del gene glnA ha logrado identificar varios otros genes involucrados. Originalmente solo se conocían mutantes en el gene glnA, que al no poseer GS

se comportan como auxótrofas de glutamina, y además son incapaces de utilizar fuentes alternas de nitrógeno, a lo que se le conoce como fenotipo Reg^- . Ciertas mutantes constitutivas GlnC , parecían mapear dentro del gene glnA , lo que sugería que la GS pudiera estar regulando su propia síntesis; esta hipótesis de regulación autógena, propuesta por Magasanik y colaboradores (7) sugería que la GS no adenilada permitía la expresión a partir del gene glnA , mientras que la GS adenilada reprimía su propia síntesis. Sin embargo el descubrimiento de mutaciones en otros genes cuyos productos afectan la formación de la GS ha invalidado la hipótesis originalmente propuesta (7).

Un primer tipo de mutaciones que afecta el nivel de expresión del gene glnA , y por lo tanto la síntesis de la GS, es el que corresponde a mutantes en un gene alejado del glnA y que ha sido llamado glnF . Las mutantes glnF^- son incapaces de inducir sus niveles de GS, y por lo tanto se comportan como auxótrofas de glutamina (Gln^-), (8). Se ha propuesto que el producto del gene glnF es esencial para la activación del gene glnA , de manera que en ausencia de éste, el gene estructural para la GS se encuentra siempre reprimido.

Las mutaciones en el gene glnF son suprimidas por mutaciones secundarias en un locus cercano al gene glnA , que originalmente fue designado glnR en Salmonella y glnG en Escherichia coli y en Klebsiella, (9, 10, 11). Estas mutantes son ahora Gln^+ , de manera

que son nuevamente capaces de crecer en ausencia de glutamina en el medio, y siempre presentan un nivel bajo constitutivo de GS; además son Reg^- , es decir son incapaces de utilizar fuentes alternas de nitrógeno, tales como arginina o prolina; Kustu y colaboradores (9, 12) han demostrado que esta característica de las cepas Reg^- se debe a la incapacidad de inducir los sistemas de transporte específicos para estas fuentes alternas de nitrógeno, lo cual ha sido comprobado por otros autores (13).

Tomando todos estos datos en cuenta, Kustu y colaboradores (9, 14) han propuesto un modelo de regulación de la GS en el que el producto del gene *glnR*, o *glnG*, funcionaría ya sea como represor o como activador, dependiendo de la presencia del producto del gene *glnF*: en presencia del producto de *glnF*, el producto de *glnR* o *glnG* funcionaría como un activador, y en ausencia del producto de *glnF*, el producto de *glnR* o *glnG* funcionaría como un represor. Este modelo ha recibido mucha evidencia experimental, y solamente se ha visto modificado por el reciente descubrimiento de que el locus denominado *glnG* en realidad consiste de dos genes, y no de uno solo (15); la denominación que se ha adoptado para estos dos genes es *glnL* para el contiguo al gene *glnA*, y *glnG* para el más alejado al gene *glnA*, el cual es contiguo al gene *glnL*.

A pesar del descubrimiento de estos tres genes, *glnF*, *glnL* y *glnG*, involucrados en la expresión del

gene *glnA*, se ha demostrado que pueden existir otros factores también involucrados, aparte de los propuestos por Kustu en su modelo. Recientemente Rothstein et al. (16) han demostrado que la presencia de la GS dentro de la célula es importante, ya que actúa como un modulador de la expresión del gene *glnA*, aunque no es esencial para el control positivo o negativo que se ejerce sobre dicho gene. Además ciertos datos de Magasanik y colaboradores (17, 18, 19) sugieren que no solamente los productos de los genes *glnF*, *glnL* y *glnG* están involucrados en la expresión del gene *glnA*, sino que también la proteína reguladora P_{II} juega un papel importante, y éste es independiente del efecto que tiene sobre las enzimas que afectan la adenilación y desadenilación de la GS.

En el laboratorio hemos estado interesados en estudiar los mecanismos que regulan la asimilación de compuestos nitrogenados por *Escherichia coli* K12, y particularmente la regulación de la enzima glutamino sintetasa. Para poder llegar a comprender este fenómeno es necesario contar con mutantes, tanto en el gene estructural *glnA* como mutantes regulatorias en los genes que están involucrados en la síntesis de la GS. En este trabajo se describe la obtención de delecciones que afectan la producción de GS, ya sea por haber afectado el gene estructural para la GS, o bien por haber afectado otros genes relacionados con

(8)

el metabolismo nitrogenado celular. Asimismo, se presen
ta por primera vez el aislamiento de un nuevo fenotipo_
relacionado con la asimilación de amonio por este micro
organismo, el cual consiste en la incapacidad de trans-
portar dicha molécula al interior de la célula.

MATERIALES Y METODOS.

i) Cepas bacterianas .

Las cepas utilizadas en este trabajo se describen en la tabla #1. Todas son derivadas de Escherichia coli K12.

ii) Condiciones de cultivo.

Para la realización de los experimentos las células se crecieron en los siguientes medios:

Medio rico.- El medio rico utilizado fue el caldo Luria (bacto-triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, cloruro de sodio 1%). Para mutantes que presentaron un requerimiento por glutamina, se utilizó medio Luria adicionado de glutamina a una concentración final de 1mg/ml, (20).

Medio mínimo.- El medio mínimo utilizado fue el medio mínimo NN, que contiene en g/lit: KH_2PO_4 (13.6), K_2SO_4 (2.61), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2), CaCl_2 (0.01), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.0005). Este medio fue suplementado con glucosa a una concentración final de 0.2% como fuente de carbono y NH_4Cl 15mM o glutamina 1mg/ml como fuentes de nitrógeno; las demás fuentes de nitrógeno, arginina, glutamato o aspartato, se agregaron a una concentración final de 0.2% cada una. Todas estas sustancias se filtraron a través de filtros Millipore de 0.45 μm y se adicionaron a las sales previamente esterilizadas en autoclave (21).

TABLA #1.
CEPAS BACTERIANAS

Cepa	Genotipo relevante
MX615	tipo silvestre
MX752	<u>zig</u> :: λ kan2, derivada de MX615
MX850	derivada Gln ⁻ de MX752
MX851	derivada Gln ⁻ de MX752
MX852	derivada Gln ⁻ de MX752
MX853	derivada (<u>zig-zih</u>) Δ de MX752
MX854	derivada (<u>zig-zih</u>) Δ de MX752
MX855	derivada (<u>zig-zih</u>) Δ de MX752
MX856	derivada (<u>zig-zih</u>) Δ de MX752
AB1206	F'14
MX900	F'14 <u>glnL</u> ::Tn5
MX902	<u>glnL</u> ::Tn5
PA340	<u>gdh-1</u> , <u>gltB31</u>
MX729	PA340/pRSP1
MX730	PA340/pRSP20

La cepa MX615 y todas sus derivadas poseen además los siguientes marcadores; F⁻, thi, ilv-680, (pro-lac) Δ , (gal-pgl-att λ -bio) Δ .

Los requerimientos de las cepas se agregaron a _
concentraciones óptimas que van de $1 \times 10^{-4} \text{M}$ a $2 \times 10^{-3} \text{M}$,
dependiendo del aminoácido o vitamina.

iii) Obtención de deleciones a partir de la cepa ___
MX752, localizadas en la región de glnA (22).

Se crecieron varios cultivos de la cepa MX752 en
10 ml de medio NN adicionado de glutamina, a 30°C , has
ta alcanzar la fase exponencial (40 unidades Klett ___
con filtro rojo #66); se dió un pulso de calor de 6 ___
minutos a 42°C , se diluyeron 1:40 en el mismo medio y
se dejaron expresar aproximadamente 12 horas. Los cul
tivos se sometieron a dos ciclos de enriquecimiento ___
con penicilina, a una concentración de 2500 unidades/
ml en presencia de NH_4^+ como fuente de nitrógeno, per
mitiéndose después la expresión de las mutantes en el
mismo medio con glutamina. Se aislaron y purificaron ___
aquellas colonias que no crecían en amonio y sí lo ha
cían en glutamina como fuente de nitrógeno.

iv) Preparación de lisados de Pl.

Para los experimentos de transducción se utilizó
el bacteriófago Pl virA. Para propagar dicho bacterió
fago se creció la cepa donadora en medio Luria hasta ___
fase exponencial; se mezclaron 0.5 ml de este cultivo
con 0.1 ml de Pl diluido a una concentración de 10^7 ___
pfu/ml (pfu=unidades formadoras de placas), y se va--
ció la mezcla con ayuda de medio Luria (3ml) y Luria_

con agar licuado al 0.75% y mantenido a 42°C (3ml) sobre cajas de Petri con medio Luria adicionado de glucosa (0.2%), timina (25µg/ml) y CaCl₂ (25mM), (medio LCT-G). Se incubaron las cajas hasta observar confluencia de placas, aproximadamente 12 horas, a 37°C, y posteriormente se raspó la superficie del medio y se pasó a tubos, donde la mezcla se cloroformó con 1 ml de cloroformo por cada 20 ml de suspensión fágica, se agitó en vórtex y se centrifugó para eliminar el agar y los restos celulares. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio, se cloroformó nuevamente y se guardó a 4°C (23).

v) Titulación de lisados de Pl.

Los lisados preparados de acuerdo al inciso anterior se titularon utilizando como cepa sensible a la cepa AB1157. Se creció dicha cepa en medio Luria hasta 40 unidades Klett, se centrifugó y se resuspendió en la mitad de volumen de medio de adsorción (0.01M MgSO₄ + 0.005M CaCl₂). Se hicieron diluciones del lisado, desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁶ en NN estéril, y se mezclaron 0.1 ml de cada dilución con 0.1 ml de la suspensión de células. Se incubó la mezcla 20 minutos a 37°C sin agitación, para permitir la adsorción del fago, y se vació sobre cajas con medio LCTG con ayuda de Luria con agar licuado a 42°C. Las cajas se incubaron de 12 a 24 horas y se contó el número de placas en cada dilución.

vi) Transducciones.

Las transducciones se realizaron con bacteriófago Pl virA propagado previamente en la cepa donadora. La cepa receptora se creció en medio Luria hasta 40 unidades Klett, se centrifugó y se resuspendió en 1/10 de volumen de bacto-triptona 1%. Se mezclaron fagos y bacterias a una multiplicidad de 0.05 (un fago por cada 20 bacterias) de la siguiente manera: 0.5 ml de bacterias + 0.5 ml de la suspensión fágica diluida en Luria a una concentración de 5×10^7 pfu/ml + 0.5 ml de CaCl_2 0.015M, MgSO_4 0.03M. Se incluyó un control con 0.5 ml de Luria en lugar de fagos, y se incubó 20 minutos sin agitación a 37°C. Posteriormente se centrifugó y lavó dos veces en igual volumen de NN y se resuspendió en 0.1 ml de NN. Se vació sobre cajas de Petri con el medio de selección, y las cajas se incubaron a 37°C.

vii) Conjugaciones.

Las conjugaciones se realizaron de la siguiente manera. Se crecieron las cepas donadora y receptora en medio Luria hasta 40 unidades Klett; posteriormente se mezclaron 4.5 ml de cepa receptora con 0.5 ml de donadora y se incubaron el tiempo necesario para cada conjugación a 37°C sin agitación. También se incubaron independientemente 5 ml de la cepa donadora y 5 ml de la cepa receptora como controles. Posteriormente se centrifugaron los cultivos, se lavaron dos veces con NN estéril y se vaciaron con ayuda de agar al 0.75% licua

do y mantenido a 42°C sobre cajas de Petri con el medio de selección. En caso necesario se hicieron diluciones de los cultivos.

viii) Determinación de actividades enzimáticas.

a) Determinación de actividades de glutamino sintetasa (GS).

El método utilizado para determinar la actividad enzimática de la GS fue el de Bender et al. (24) con las modificaciones introducidas por Covarrubias et al. (21). Dicho ensayo mide la actividad de γ -glutamyltransferasa de GS, reportada por Shapiro y Stadtman (25).

b) Determinación de actividades de deshidrogenasa glutámica y de glutamato sintasa (GDH y GOGAT, respectivamente).

Las actividades específicas de GDH y GOGAT se midieron de acuerdo a Covarrubias et al. (21).

c) Determinación de actividades de aminotransferasa de ácido aspártico (GOT).

La preparación de extractos para la determinación de actividades de GOT se realizó de acuerdo a Marcus y Halpern (26). La enzima se midió utilizando un juego de reactivos adquirido de Merck de México (Merckotest, prueba colorimétrica para GOT, Art. 3362), siguiendo las indicaciones proporcionadas en el mismo.

d) Determinación de actividades de aspartasa.

La actividad de aspartasa se determinó de acuerdo a Marcus y Halpern (26). El amonio liberado en la reac-

ción después de 30 minutos se midió con un electrodo de amonio, y el blanco utilizado fue tratado de la misma manera que el problema, con la diferencia de que el extracto se agregó después de los 30 minutos y del TCA.

ix) Ensayo de transporte de metilamonio.

El ensayo que se utilizó para medir transporte de metilamonio fue esencialmente el descrito por Stevenson y Silver (27), con las siguientes modificaciones: el medio de ensayo fue NN con glucosa 0.2% pH=7, las células se crecieron en el medio mínimo descrito y no en medio M9. El metilamonio radioactivo fue adquirido de New England Nuclear, con una actividad específica de 48 mCi/mmole. La actividad específica fue reducida con metilamonio no radioactivo, de manera que la concentración final fue 6 μ M con una actividad específica de 4.8 mCi/mmole.

x) Ensayo de transporte de ácido aspártico.

Se utilizó el ensayo descrito por Ratzkin *et al.* (28) para transporte de prolina radioactiva, con la diferencia que se utilizó (¹⁴C)-L-aspartato. El medio de ensayo fue NN con glucosa 0.2% pH=7.4, y la concentración de aspartato fue 0.1mM, con una actividad específica de 10mCi/mmole. El ácido aspártico marcado fue adquirido de New England Nuclear.

Tanto para el ensayo de transporte de metilamonio como para el ensayo de transporte de ácido aspártico, la

radioactividad se midió en un contador de centelleo _ Packard Tri-Carb, utilizando 10 ml de líquido de centelleo por cada filtro. El líquido de centelleo utilizado fue PPO al 0.4% en tolueno (PPO=2,5-difeniloxazol).

xi) Determinación de proteína.

Para efectuar las determinaciones de proteína en los extractos con los que se midieron actividades enzimáticas se utilizó el método de Lowry et al. (29). Para los ensayos de transporte de metilamonio y ácido aspártico la cantidad de proteína fue determinada a _ partir de una curva estándar de unidades Klett vs. mg de proteína.

xii) Determinación de frecuencias de reversión.

La frecuencia de reversión de las mutantes obtenidas se determinó de la siguiente manera. A partir _ de un cultivo de la cepa se obtuvieron colonias aisladas en una caja de Petri. Se tomó una colonia y se re suspendió en 1 ml de NN estéril, se hicieron diluciones y se inocularon 5 ml de medio con una dilución _ que correspondiera a 40 células. Se incubó a 37°C con agitación hasta que el cultivo se observara turbio. _ Se hicieron diluciones y se plaquearon en medio selectivo para revertantes y en medio no selectivo para la cepa. Se obtuvo la cuenta viable de células revertantes y de células no revertantes, y se expresó la fre-

(17)

cuencia de reversión como el número de células revertantes
por ml/número de células totales por ml.

RESULTADOS.

La cepa MX752 de E. coli, construida por Brom, posee un bacteriófago lambda::Tn5 (λ kan2) insertado entre el gene glnA y el operón rha del cromosoma de E. coli K12 (22). Por curación de λ por pulso de calor y mediante dos ciclos de enriquecimiento con penicilina, tal y como se describe en Materiales y Métodos, fue posible la obtención de varias cepas mutantes, las cuales pueden ser agrupadas claramente en dos clases, y cuya caracterización parcial se describe a continuación.

1) Mutantes alteradas en el gene glnA:

Un primer tipo de mutantes aisladas presenta el mismo fenotipo previamente descrito para mutantes en el gene glnA. Este fenotipo posee las siguientes características:

Como se puede apreciar en la tabla #2, dichas cepas (MX850, MX851 y MX852) no presentan actividad detectable de GS, a comparación de una cepa silvestre (MX615); al carecer de actividad de GS estas cepas son incapaces de sintetizar glutamina, y por lo tanto manifiestan un fenotipo Gln^- , es decir no crecen en ausencia de glutamina. La frecuencia de reversión a Gln^+ tampoco es detectable ($<10^{-9}$), lo cual indica que la mutación es muy estable, y que probablemente se trate de una delección que abarque al menos una porción del gene glnA. Se ha descrito que mutantes en el locus glnP presentan también un fenotipo Gln^- , y dichas ce--

TABLA #2.

CARACTERIZACION DE CEPAS Gln⁻ OBTENIDAS POR CURACION DE λ POR PULSO DE CALOR A PARTIR DE LA CEPA MX752.

Cepa	Fenotipo	GS*	Reg	Reversión a Gln ⁺	/F'14
MX615	Gln ⁺	0.48	+	-	
MX850	Gln ⁻	<0.01	-	<10 ⁻⁹	+
MX851	Gln ⁻	<0.01	-	<10 ⁻⁹	+
MX852	Gln ⁻	<0.01	-	<10 ⁻⁹	+

* Glutamina 1mg/ml como fuente de nitrógeno. Actividad específica expresada en μ moles de γ -glutamil hidroxamato/min/mg de proteína

TABLA #2.

CARACTERIZACION DE CEPAS Gln⁻ OBTENIDAS POR CURACION DE λ POR PULSO DE CALOR A PARTIR DE LA CEPA MX752.

Cepa	Fenotipo	GS*	Reg	Reversión a Gln ⁺	/F'14
MX615	Gln ⁺	0.48	+	-	
MX850	Gln ⁻	<0.01	-	<10 ⁻⁹	+
MX851	Gln ⁻	<0.01	-	<10 ⁻⁹	+
MX852	Gln ⁻	<0.01	-	<10 ⁻⁹	+

* Glutamina 1mg/ml como fuente de nitrógeno. Actividad específica expresada en μ moles de γ -glutamil hidroxamato/min/mg de proteína

pas tampoco poseen actividad de GS detectable. Sin embargo las mutantes en *glnF* revierten por supresión al fenotipo Gln^+ con una frecuencia aproximada de 10^{-5} , debido a una mutación secundaria en cualquiera de los genes *glnI* o *glnG*, adyacentes a *glnA*. El hecho de que no detectemos reversión a Gln^+ nos indica que las cepas MX850, MX851 y MX852 no son mutantes de este tipo, sino mutantes en *glnA*. Para comprobar este punto se hicieron pruebas de complementación con el plásmido P'14, el cual lleva una porción de cromosoma que comprende a la región de *glnA*, pero no a la región de *glnF*, y el cual fue transferido por conjugación a estas cepas a partir de la cepa AB1206. Al introducir el P'14 a las cepas MX850, MX851 y MX852, éstas recuperan el fenotipo Gln^+ , lo cual no ocurriría si se tratara de mutantes en *glnF*.

Otra característica importante de estas cepas es que presentan el fenotipo Reg^- , es decir son incapaces de utilizar fuentes alternas de nitrógeno, como arginina o prolina. El fenotipo Reg^- lo presentan todas las mutantes previamente descritas en *glnA*, aunque mutaciones en otros loci también pueden producir el mismo fenotipo.

Con el objeto de conocer si las supuestas deleciones ocurridas en estas cepas afectan únicamente al gene *glnA*, o bien si también afectan a algún otro gene cercano, particularmente los genes adyacentes *glnI* y *glnG*, se hicieron pruebas de complementación con un

plásmido F'14 que contiene una inserción del transposón Tn5 en el gen glnL. Como se puede observar en la tabla #3 la cepa MX902, que posee dicha inserción de Tn5 en glnL es sensible a una concentración 80µM de metionina D,L-sulfoximina (MS), a diferencia de una cepa silvestre, la cual es resistente. La MS es un agente inhibidor de la GS, y se ha encontrado que mutantes en el gen glnL son incapaces de crecer cuando dicha sustancia se encuentra presente en el medio (A. Osorio, no publicado). Además las mutantes en el gen glnL poseen un nivel bajo constitutivo de GS, mientras que una cepa silvestre es capaz de inducir sus niveles de GS en condiciones de limitación de nitrógeno.

Al introducir el plásmido F'14glnL::Tn5 a las cepas MX850, MX851 y MX852 observamos que dos de ellas (MX851/F'14glnL::Tn5 y MX852/F'14glnL::Tn5) son capaces de complementar la mutación en glnL que posee el plásmido, puesto que son resistentes a 80µM de MS y presentan una actividad de GS inducible. La cepa MX850/F'14glnL::Tn5, por el contrario, es sensible a 80µM de MS y presenta un nivel bajo constitutivo de GS, lo que indica que en esta cepa no existe un gen glnL funcional capaz de complementar la mutación del plásmido; ya que los genes glnL y glnA están contiguos en el cromosoma de S. coli, (15) es probable que la cepa MX850 sea una delección que haya afectado a ambos genes; en dicho caso glnA debió haber sido eliminado totalmente.

2) Además de las mutantes que presentan el fenotipo descrito en el inciso anterior se obtuvieron otras mutantes, las cuales presentan un fenotipo que no había sido descrito hasta la fecha.

Este fenotipo consiste en la incapacidad de utili-

TABLA #3.

PRUEBA DE COMPLEMENTACION CON F'14glnL::Tn5
DE LAS CEPAS MX850, MX851 Y MX852.

Cepa	MS*	GS	Genotipo
MX615	resistente	inducible	<u>glnL</u> ⁺
MX902	sensible	baja constitutiva	<u>glnL</u> ::Tn5
MX850/F'14 <u>glnL</u> ::Tn5	sensible	baja constitutiva	<u>glnL</u> Δ/F'14 <u>glnL</u> ::Tn5
MX851/F'14 <u>glnL</u> ::Tn5	resistente	inducible	<u>glnL</u> ⁺ /F'14 <u>glnL</u> ::Tn5
MX852/F'14 <u>glnL</u> ::Tn5	resistente	inducible	<u>glnL</u> ⁺ /F'14 <u>glnL</u> ::Tn5

* MS = Metionina D,L-sulfoximina (80μM) utilizando NH₄⁺ como fuente de nitrógeno

zar amonio como fuente de nitrógeno, pero a diferencia de las cepas Gln^- descritas con anterioridad, o sea las mutantes en *glnA* o en *glnP*, esta incapacidad no se debe a la ausencia de GS. Como se puede observar en la tabla #4, estas cepas (MX853, MX854, MX855 y MX856) presentan actividad de GS detectable, aunque esta actividad es menor a la que presenta una cepa silvestre. El hecho de que estas cepas tengan GS indica que el gene *glnA* se conserva en el cromosoma y es capaz de expresarse, aunque a un nivel menor del normal. De esta manera, dichas cepas presentan un aparente fenotipo Gln^- , es decir no crecen en presencia de amonio como fuente de nitrógeno; sin embargo poseen la enzima necesaria para sintetizar glutamina. Esto nos indica que no se trata de una mutante Gln^- como las anteriormente descritas, es decir en *glnA* o en *glnP*.

Otra evidencia que indica que no se trata de mutantes en *glnA* es que estas cepas son capaces de revertir por supresión a Gln^+ . Las frecuencias de reversión se presentan en la tabla #5, y como se puede observar son relativamente elevadas, mientras que las mutantes en *glnA* son generalmente mucho más estables.

Otras dos enzimas también involucradas con la utilización del amonio como fuente de nitrógeno son la glutamato sintasa y la deshidrogenasa glutámica (GOGAT y GDH, respectivamente). Con el propósito de ver si el fenotipo de estas cepas se debía a alguna alteración en las enzimas GOGAT o GDH se midió actividad enzimática

TABLA #4.

ACTIVIDADES ESPECIFICAS DE GS DE DELECCIONES (zig-zih)_Δ
 OBTENIDAS POR CURACION DE λ POR PULSO DE CALOR
 DE LA CEPA MX752.

Cepa	glutamina 1mg/ml	arginina 0.2%
MX615	0.48	0.77
MX853	0.12	0.23
MX854	0.10	0.22
MX855	0.08	0.35
MX856	0.03	0.17

actividades específicas expresadas en μ moles de
 γ -glutamil hidroxamato/min/mg de proteína.

TABLA #5.

FRECUENCIA DE REVERSION A Gln⁺ DE DELECCIONES (zig-zih)_Δ
 OBTENIDAS POR CURACION DE λ POR PULSO DE CALOR
 DE LA CEPA MX752.

Medio	MX853	MX854	MX855	MX856
Luria + gln	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻²	10 ⁻⁶
Mínimo + gln	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻³	10 ⁻⁴
Mínimo + arg	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻³	10 ⁻⁵
Mínimo + glt	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻⁴

gln=glutamina 1mg/ml; arg=arginina 0.2%;

glt=glutamato 0.2%.

ca de ambas, y los resultados se muestran en la tabla #6. Como se puede observar, estas enzimas están presentes y tienen una actividad más alta que en una cepa silvestre, lo que indica que este fenotipo no se debe a la ausencia de GOGAT o GDH.

Ya que las tres enzimas involucradas en la asimilación de amonio se encuentran presentes, otra posibilidad que explicara porqué el amonio no es utilizado sería la ausencia de transporte de amonio hacia el interior de la célula. En la gráfica #1 puede observarse que, a diferencia de una cepa silvestre, las cepas MX853, MX854, MX855 y MX856 son incapaces de transportar metilamonio al interior de la célula. El metilamonio es un análogo del amonio que entra a la célula utilizando el mismo sistema de transporte que el amonio; se utiliza como monitor en lugar del amonio ya que puede marcarse radioactivamente con ^{14}C lo cual no es posible con el amonio. Por lo tanto la incapacidad de utilización de amonio por estas cepas se puede explicar debido a la ausencia del sistema de transporte específico para amonio.

Como se mencionó anteriormente, estas cepas presentan una actividad de GS más baja que una cepa silvestre. Aparentemente esto no debería ocurrir en estas cepas, ya que al no ser capaces de introducir amonio a la célula, se crea una condición de limitación de nitrógeno que debería inducir la actividad de GS. Sin embargo, como se puede observar en la tabla #6, las enzimas GDH y GOGAT se encuentran presentes en ni

TABLA #6.

ACTIVIDADES ESPECIFICAS DE GDH Y GOGAT DE
 DELECCIONES (zig-zih)_A OBTENIDAS POR CURACION DE λ
 POR PULSO DE CALOR A PARTIR DE LA CEPA MX752.

Cepa	GDH	GOGAT
MX615	218.0	28.1
MX853	392.1	142.4
MX854	320.7	135.3
MX855	386.9	207.0
MX856	275.8	116.6

actividad específica expresada en μ moles de
 NADPH oxidado/min/mg de proteína.

Gráfica #1.

TRANSPORTE DE ^{14}C -METILAMONIO EN
DELECCIONES (zig-zih) Δ OBTENIDAS A PARTIR
DE LA CEPA MX752, POR
CURACION DE λ .

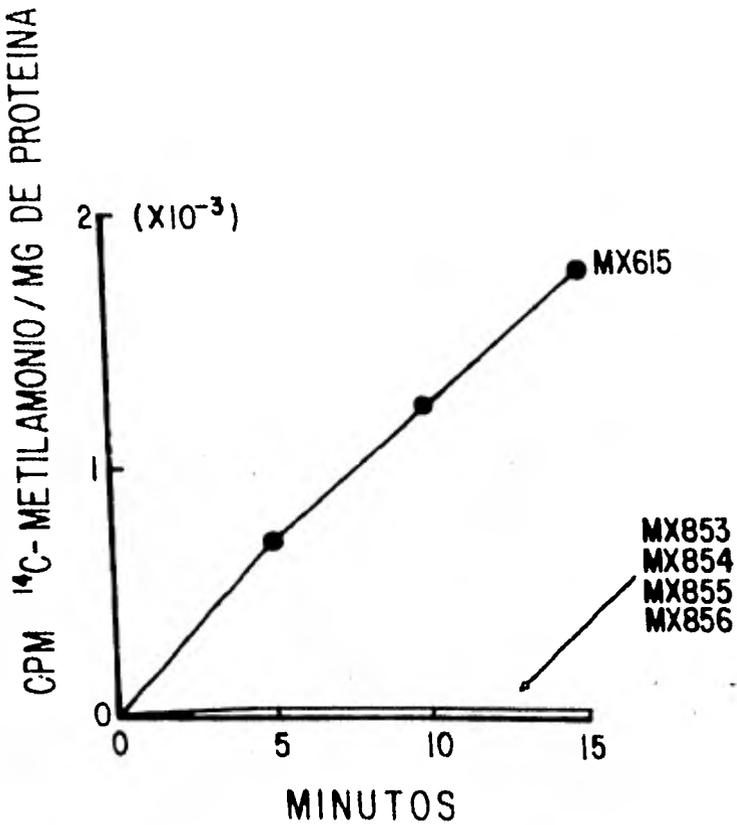


TABLA #7.

ACTIVIDADES ESPECIFICAS DE GS DE LA CEPA PA340, Y DE LA CEPA PA340 CON PLASMIDOS HIBRIDOS QUE LLEVAN LOS GENES ESTRUCTURALES PARA GDH Y GOGAT.

Cepa	GS*
PA340 (<u>gdh-1</u> , <u>gltB31</u>)	0.33
MX729 (PA340/pRSP1 <u>gdh</u> ⁺)	0.02
MX730 (PA340/pRSP20 <u>gltB</u> ⁺)	0.03

* glutamina 1mg/ml como fuente de nitrógeno; actividad específica expresada en μ moles de γ -glutamil hidroxamato/min/mg de proteína.

veles más altos que los normales para una cepa silvestre, y es posible que la actividad baja de GS se deba a esto. Bender y Magasanik (30) han propuesto que el nivel de síntesis de GS refleja la relación existente dentro de la célula entre glutamina y 2-oxoglutarato. De tal manera que al aumentar el nivel de glutamina respecto al nivel de 2-oxoglutarato se obtendría una disminución en la síntesis de GS, y al disminuir el nivel de glutamina respecto al de 2-oxoglutarato se incrementaría la producción de GS. Si en las cepas MX853, MX854, MX855 y MX856 se presentan niveles de GDH y GOGAT bastante más elevados que en una cepa silvestre, es de esperarse que el nivel de 2-oxoglutarato, el cual es sustrato para ambas enzimas, disminuya notablemente. De esta forma la relación glutamina/2-oxoglutarato se incrementaría y bajaría el nivel de GS. Es muy probable que efectivamente sea esto lo que ocurra en dichas cepas. Para tratar de comprobar este punto se midió actividad de GS a las cepas que se encuentran en la tabla #7. La cepa PA340 posee dos mutaciones que le impiden sintetizar tanto GDH como GOGAT (gdh-1, gltB31) sin embargo es capaz de sintetizar GS. Las cepas MX729 y MX730 son iguales a la PA340, pero además cada una lleva un plásmido híbrido; la cepa MX729 lleva el plásmido pRSP1 y la MX730 lleva el plásmido pRSP20, los cuales poseen los genes estructurales para GDH y GOGAT, respectivamente (31). Debido a que estos plásmidos se encuentran presentes en varias copias dentro de la cé-

lula, los niveles de GDH y GOGAT que presentan las cepas MX729 y MX730 son superiores a los de una cepa silvestre, luego entonces el nivel de GS debería ser más bajo que en la misma cepa sin dichos plásmidos. Como se puede observar, las cepas que llevan estos plásmidos tienen un nivel más bajo de GS que la cepa que no los lleva. Esto apoya el hecho de que la presencia en exceso de GDH o GOGAT puede afectar el nivel de GS, muy probablemente modificando la relación existente entre glutamina y 2-oxoglutarato que existe dentro de la célula.

Como se mencionó anteriormente, una cepa silvestre es capaz de utilizar fuentes alternas de nitrógeno, por ejemplo arginina, mientras que mutantes en los genes glnA, glnL o glnG son incapaces de hacerlo, y a este fenotipo se le denomina Reg^- . Con el objeto de determinar si las cepas MX853, MX854, MX855 y MX856 presentaban el fenotipo Reg^- , se determinó su capacidad para crecer en presencia de arginina, glutamato y aspartato como únicas fuentes de nitrógeno. Como se muestra en la tabla #8, dichas cepas no presentan el fenotipo Reg^- , pero tampoco se comportan como una cepa silvestre; son capaces de utilizar arginina o glutamato como fuentes de nitrógeno, pero esta utilización es mucho menos eficiente que la de una cepa silvestre. También se puede observar que no solamente son incapaces de utilizar amonio como fuente de nitrógeno, sino tampoco utilizan aspartato.

TABLA #8.

UTILIZACION DE DIFERENTES FUENTES DE NITROGENO POR DELECCIONES
 (zig-zih)_Δ OBTENIDAS POR CURACION DE λ POR PULSO DE CALOR DE
 LA CEPA MX752 (zig: λ kan2)

Cepa	glutamina	arginina	glutamato	aspartato	NH ₄ ⁺
MX615	+	+	+	+	+
MX853	+	±	±	-	-
MX854	+	±	±	-	-
MX855	+	±	±	±	±
MX856	+	±	±	-	-

glutamina 1mg/ml; arginina, glutamato y aspartato 0.2%; NH₄⁺ 15mM.

El hecho de que estas cepas sean incapaces de utilizar aspartato como fuente de nitrógeno no se puede explicar pensando que las cepas fueran Reg^- , ya que son capaces de utilizar arginina, por lo que es posible que alguna de las enzimas encargadas de la degradación del aspartato, o bien el sistema de transporte de aspartato, estén afectados. Para probar esta última posibilidad se midió transporte de aspartato, y los resultados se encuentran en la gráfica #2. Como se puede apreciar, el transporte de aspartato se encuentra ligeramente reducido, respecto a una cepa silvestre, pero aún es bastante eficiente como para suponer que la reducción observada sea la causa de la incapacidad de utilizar aspartato como única fuente de nitrógeno. Por lo tanto se midió la actividad enzimática de las dos enzimas que se sabe están involucradas en la degradación del aspartato, las cuales son la aspartasa (L-aspartato, amonio ligasa EC 4.3.1.1) y la transaminasa de ácido aspártico (L-aspartato, 2-oxoglutarato aminotransferasa, EC 2.6.1.1). Como se puede observar en la tabla #9, los niveles de transaminasa de ácido aspártico son normales, sin embargo no fue posible detectar actividad de aspartasa de acuerdo al método utilizado. De esta manera la incapacidad de poder utilizar aspartato como única fuente de nitrógeno se debe a la ausencia de actividad enzimática de aspartasa que presentan dichas cepas.

Gráfica #2.

TRANSPORTE DE ^{14}C -L-ASPARTATO POR
DELECCIONES (z1g-z1h) Δ OBTENIDAS A PARTIR DE
LA CEPA MX752, POR CURACION DE λ .

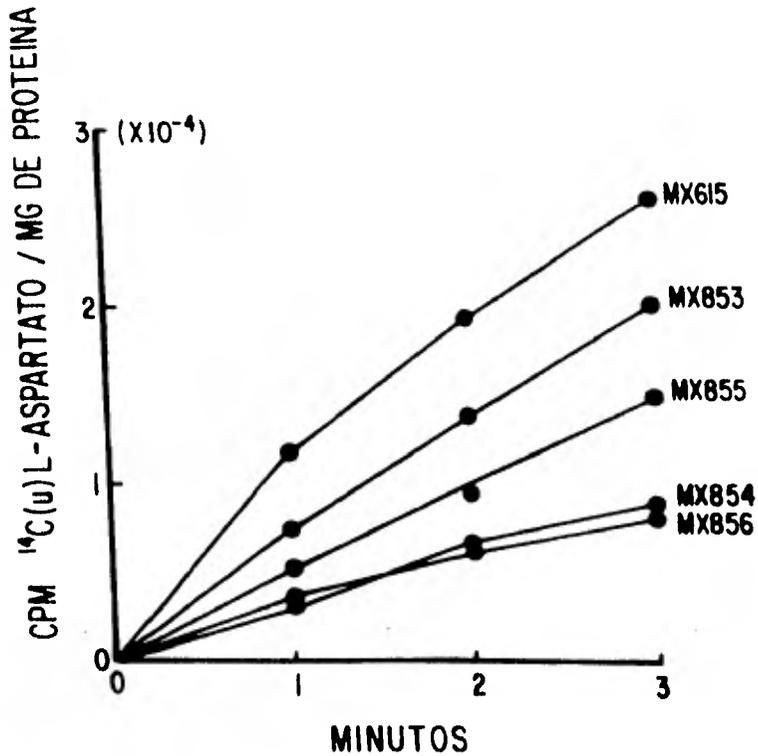


TABLA #9.
 ACTIVIDADES ESPECIFICAS DE TRANSAMINASA DE
 ACIDO ASPARTICO Y DE ASPARTASA DE DELECCIONES
 (zig-zih)_Δ.

Cepa	Transaminasa *	Aspartasa **
MX615	23.3	0.16
MX853	36.4	nd***
MX854	23.7	nd
MX855	29.7	nd
MX856	15.7	nd

* μ moles de sustrato consumidas/hr/mg proteína.

** μ moles de NH_4^+ liberado/hr/mg proteína.

*** no detectable.

Sabemos que la cepa MX752, de la cual provienen todas las mutantes descritas en este trabajo, posee un bacteriófago λ kan2 insertado entre el gene glnA y el operón rha del cromosoma de Escherichia coli. De esta cepa se obtuvieron las mutantes descritas por curación de λ por pulso de calor. Este tratamiento debió generar escisiones anormales del bacteriófago de manera que se eliminara parte del DNA cromosómico y se originaran deleciones. De esta forma suponemos que las mutantes descritas son deleciones que pueden abarcar uno o varios genes adyacentes al sitio de inserción del fago en la cepa MX752. Es posible que los dos tipos de mutantes descritas en la sección anterior correspondan a deleciones que se sobrepone de tal manera que las cepas MX853, MX854, MX855 y MX856 correspondan a deleciones que van desde el sitio de inserción de λ hacia el gene glnA sin llegar a cortarlo, y las cepas MX850, MX851 y MX852 a deleciones más grandes que llegan a deletar parte del gene glnA o al gene glnL y cuando menos parte del gene glnL. Otra posibilidad es que los dos tipos de mutaciones descritas correspondan a deleciones que se extienden a ambos lados del sitio de inserción de λ , de manera que las cepas MX850, MX851 y MX852 correspondan a deleciones que van desde el sitio de inserción de λ hacia el gene glnA, y las cepas MX853, MX854, MX855 y MX856 a deleciones que van desde el sitio de inserción de λ hacia el operón rha. Si la primera po

sibilidad fuera cierta, entonces las cepas MX850, MX851 y MX852 deberían ser incapaces de recombinar entre ellas para dar una cepa silvestre, y tampoco deberían ser capaces de recombinar con las cepas MX853, MX854, MX855 y MX856 por tratarse de deleciones que se sobreponen parcialmente. Si la segunda posibilidad fuera cierta, entonces las cepas MX850, MX851 y MX852 deberían ser capaces de recombinar con las cepas MX853, MX854, MX855 y MX856 para producir recombinantes de tipo silvestre, pero deberían ser incapaces de recombinar entre ellas. Como se puede observar en la tabla #10, las cepas MX850, MX851 y MX852 son incapaces de recombinar entre ellas, y sí recombinan con las cepas MX853, MX854, MX855 y MX856 para dar recombinantes de tipo silvestre. Esto indica que los dos tipos de mutantes descritas en este trabajo no corresponden a deleciones que se sobrepongan, sino más bien a deleciones que se generaron por escisión del bacteriófago λ hacia ambos lados del sitio donde se encontraba insertado en el cromosoma.

TABLA #70

MAPEO POR TRANSDUCCION DE DELECCIONES
OBTENIDAS DE LA CEPA MX752 POR CURACION DE λ .

Donador	Receptor	Selección	#de transductantes/ 10^6 P1
MX850	MX851	Gln ⁺	<0.04
MX850	MX852	"	<0.04
MX851	MX850	"	<0.04
MX851	MX852	"	<0.04
MX852	MX850	"	<0.04
MX852	MX851	"	<0.04
MX853	MX850	"	4
MX853	MX851	"	28
MX853	MX852	"	4
MX854	MX850	"	4
MX854	MX851	"	28
MX854	MX852	"	4
MX855	MX850	"	1.2
MX855	MX851	"	6
MX855	MX852	"	0.8
MX856	MX850	"	0.4
MX856	MX851	"	2
MX856	MX852	"	0.4

DISCUSION .

En el presente trabajo se describe la obtención de mutantes a partir de la cepa MX752 (zig::λ kan2), y su caracterización parcial. La cepa MX752 posee un bacteriófago λ kan2 insertado a 0.16 minutos del gene glnA, (22). Esto permite que por escisión anormal del fago se puedan generar deleciones en el gene glnA y genes adyacentes.

Como se describe en la sección anterior se aislaron tres mutantes que afectan al gene glnA, las cuales son incapaces de sintetizar la enzima GS, y por lo tanto son auxótrofas de glutamina (cepas MX850, MX851 y MX852). El fenotipo que presentan estas cepas es muy claro, puesto que poseen todas las características descritas para cepas con mutaciones en glnA, como son una baja frecuencia de reversión a Gln^+ , la incapacidad de utilizar fuentes alternas de nitrógeno (fenotipo Reg^-), y el hecho de que pueden ser complementadas por el plásmido F'14. Hasta el momento de la realización de este trabajo no se había podido mapear exactamente el sitio donde se encuentra inserto el fago λ kan2 en la cepa MX752, aunque sí se sabía que se encontraba a 0.16 minutos del gene glnA (22); una posibilidad era que λ kan2 se encontraba inserto entre el gene glnA y el gene polA. Si ésto fuera cierto, entonces todas las cepas Gln^- obtenidas de la cepa MX752 deberían ser también deleciones que abarcaran los genes glnL y glnG. Como se puede

observar en la tabla #3, solamente una de las tres cepas Gln^- es genotípicamente glnL^- , lo cual indica que la inserción original de λ se localizaba entre glnA y rha , y no entre glnA y polA . Otro hecho que apoya esta localización de λ es el no haberse logrado obtener mutantes glnG^- , o mutantes dobles glnL^- , glnG^- , lo cual se esperaría si λ estuviera inserto entre polA y glnA . Es importante el hecho de haber logrado aislar una cepa que sea (glnA , glnL) Δ , ya que posteriormente esta cepa puede servir para mapear más precisamente la localización del gene glnL con respecto al gene glnA .

El otro tipo de mutantes obtenidas a partir de la cepa MX752, representado por las cepas MX853, MX854, MX855 y MX856, presenta un fenotipo que no ha sido descrito hasta la fecha, y que consiste en la incapacidad de utilizar amonio como fuente de nitrógeno debido a que el sistema específico de transporte de amonio ya no es funcional. Luego entonces se trata de cepas que fenotípicamente son Gln^- , a pesar de poseer niveles suficientes de glutamino sintetasa, y este fenotipo Gln^- se debe a que el amonio no penetra al interior de la célula. Podríamos decir que se trata de un caso análogo al que se presenta en el operón lac en el que mutantes lacY^- , que no poseen la permeasa que transporta lactosa al interior de la célula, presentan un fenotipo Lac^- , a pesar de poseer niveles normales de β -galactosidasa (32).

El hecho de haber encontrado mutantes que sean incapaces de transportar amonio hacia el interior de la

célula es importante, puesto que es una fuerte evidencia de que el amonio no entra libremente a la célula, sino que es transportado por un sistema de transporte específico. Se ha encontrado que en eucariotes inferiores el sistema de transporte de amonio se puede medir utilizando un análogo del amonio, el metilamonio, que presenta la conveniencia de que puede obtenerse marcado con ^{14}C , (33). Se ha comprobado que ésto también es cierto, tanto para Azotobacter (34), como para E. coli (27).

En todos estos casos la entrada de metilamonio __ presenta una cinética que puede explicarse si se considera un sistema de transporte específico, es decir, es un sistema saturable, que presenta una cinética tipo Michaelis-Menten, y en el cual el amonio actúa como un inhibidor competitivo, lo cual sugiere que el metilamonio sí utiliza el sistema de transporte de amonio para entrar a la célula. A pesar de todos estos estudios de tipo cinético, no se contaba hasta la fecha con mutantes que permitieran asegurar que dicho sistema en realidad existe en E. coli. El hecho de poder contar con mutantes que sean incapaces de transportar amonio demuestra que dicho sistema de transporte sí existe y que el amonio es incapaz de entrar a la célula por simple difusión, lo cual es lógico si se toma en cuenta que a pH fisiológico el amonio se encuentra ionizado como NH_4^+ (y no como NH_3), ya que al tener un pKa de 9.25, más del 99% se encontraría en la forma ionizada (27).

Como se puede observar en la tabla #5, las cepas MX853, MX854, MX855 y MX856 son capaces de revertir a Gln^+ con frecuencias relativamente altas. Debido a ___ que lo más probable es que estas cepas sean deleccio-- nes, por haber surgido a partir de una escisión anormal del fago λ , la reversión a Gln^+ debe surgir por ___ mutaciones supresoras en algún otro gene. Stevenson y Silver (27) demostraron que el sistema de transporte de NH_4^+ en E. coli tiene dos picos de actividad, uno a pH 7, y el otro a pH 9. Esto sugiere que dicho sistema puede estar constituido por más de una proteína, y que probablemente la proteína, o proteínas, que ___ funcionan a pH 7 sean diferentes a las que funcionan a pH 9. Si suponemos que ésto es cierto podemos explicar la reversión como una modificación del sistema ___ que funciona a pH 9 y que ahora es funcional a pH 7.

Sabemos que cuando E. coli es crecida en un medio en el cual existe una limitación de nitrógeno, como puede ser una baja concentración de amonio o un aminoácido como fuente de nitrógeno, GS se induce, para hacer más eficiente la asimilación de nitrógeno. Sin embargo, las cepas MX853, MX854, MX855 y MX856 no son capaces de inducir completamente sus niveles normales de GS, lo cual es extraño puesto que se encuentran permanentemente en una condición de limitación ___ de nitrógeno, al ser incapaces de transportar amonio al interior de la célula. Como se mencionó anteriormente, los niveles de GDH y GOGAT que presentan estas

cepas son más altos que los que posee una cepa silvestre. De esta manera, los niveles de 2-oxoglutarato dentro de la célula deben encontrarse disminuidos, ya que tanto GDH como GOGAT utilizan 2-oxoglutarato como sustrato. Los niveles relativos de glutamina/2-oxoglutarato que existen dentro de la célula son de importancia puesto que el sistema de adenilación y desadenilación de GS responde a los niveles relativos de estos metabolitos. Cuando los niveles de 2-oxoglutarato son bajos, como probablemente ocurre en las cepas MX853, MX854, MX855 y MX856, se estimula la adenilación de GS (1, 5). De esta manera la proteína reguladora P_{II} se encuentra en su forma no uridilada (P_{IIA}) que estimula a la adeniltransferasa para que adenile GS. Magasanik y colaboradores han propuesto recientemente que la proteína P_{II} está involucrada directamente en la regulación de los niveles de GS que se sintetizan en la célula (17, 18, 19). De acuerdo a sus resultados, la proteína P_{IIA} impide que GS se sintetice a niveles altos, y este efecto de P_{IIA} es independiente de su interacción con la adeniltransferasa. De esta forma, las cepas MX853, MX854, MX855 y MX856, cuya proteína P_{II} debe encontrarse principalmente en la forma no uridilada, es decir P_{IIA} , son incapaces de desreprimir completamente sus niveles de GS.

La presencia de niveles más altos que los normales de GDH y GOGAT puede explicar porqué GS no se induce completamente en dichas cepas; sin embargo, queda

por explicar por qué los niveles de GDH y GOGAT se encuentran tan elevados. Una posible explicación a estos niveles altos de GDH y GOGAT es que la falta de transporte de amonio al interior de la célula funcione en cierta forma como una señal que traiga como consecuencia una mayor síntesis de ambas enzimas. Otra posibilidad es que la probable delección que tienen dichas cepas haya eliminado algún gene que sea de importancia en la regulación de la expresión de las enzimas GDH y GOGAT, de manera que ahora no tienen el mismo grado de represión que cuando dicho gene está presente, como ocurre en una cepa silvestre.

Además de la incapacidad de transportar amonio hacia el interior de la célula, dichas cepas son incapaces de utilizar aspartato como fuente de nitrógeno, lo cual puede deberse a la ausencia de niveles detectables de aspartasa dentro de la célula. El gene estructural para la aspartasa (aspA) se encuentra localizado en el minuto 94 del cromosoma de E.coli (6), lo que hace pensar que si las cepas MX853, MX854, MX855 y MX856 surgieron por delección y la delección abarca al gene estructural aspA, todos los marcadores que se encuentran entre el sitio de inserción de λ y aspA debieron ser eliminados, lo que hubiera ocasionado que estas cepas adquirieran otras auxotrofías, como son Met⁻, Arg⁻, Thi⁻, Bio⁻, etc. Ya que esto no ocurre podemos deducir que la delección no es tan grande como para ha-

ber abarcado al gene aspA. Una explicación alterna es que se haya eliminado un gene regulador indispensable para la expresión del gene aspA, o bien que la aspartasa esté compuesta por más de un polipéptido, de manera que podría haber dos genes estructurales, aspA y otro previamente no identificado, y la delección habría eliminado al gene que codificara el polipéptido que no es codificado por aspA.

Hemos observado que los dos tipos de mutantes aisladas, es decir las cepas con delecciones en glnA y las cepas que carecen del sistema de transporte de amonio, son capaces de recombinar entre ellas para producir recombinantes de tipo silvestre, lo cual quiere decir que son delecciones que no se sobreponen. Sin embargo es necesario mapear más precisamente las delecciones, particularmente las que han perdido el sistema de transporte de amonio, ya que no se cuenta con ninguna información previa para la localización de dicho(s) gene(s). Para ésto es necesario llegar a contar con mutantes puntuales, que ayudarían a localizar con más exactitud al gene, o a los genes, que están involucrados, con respecto al resto de los genes en el cromosoma.

Cabe mencionar que, independientemente del sitio donde mapeen en el cromosoma, estas mutaciones son de sumo interés y esperamos que ayuden a comprender en un futuro el complejo fenómeno de la asimilación de nitrógeno en Escherichia coli.

CONCLUSIONES.

En este trabajo se presentó la caracterización parcial de varias cepas mutantes de Escherichia coli obtenidas a partir de la cepa MX752, la cual posee un bacteriófago λ kan2 insertado cerca del gene glnA, el cual codifica para la enzima glutamino sintetasa. Las mutantes aisladas corresponden a dos tipos diferentes, uno de los cuales consistió en mutantes, muy probablemente deleciones, que afectan al gene glnA, y que presentan todas las características esperadas para mutantes de este tipo. El otro tipo de mutantes estuvo representado por cepas con un fenotipo consistente en la incapacidad de transportar amonio hacia el interior de la célula, lo que ocasiona que estas cepas presenten un fenotipo Gln^- ; además estas mutantes fueron incapaces de utilizar aspartato como fuente de nitrógeno, debido posiblemente a la eliminación por deleción de un gene indispensable para la expresión de la enzima aspartasa.

Es importante contar con mutantes incapaces de transportar amonio, ya que es la primera evidencia directa de que efectivamente el amonio requiere de un sistema de transporte específico para penetrar a la célula y para posteriormente ser metabolizado por las enzimas glutamino sintetasa y deshidrogenasa glutámica.

B I B L I O G R A F I A .

- 1.- Tyler, B. 1978. "Regulation of the assimilation of nitrogen compounds". Ann. Rev. Biochem. 47:1127-1162.
- 2.- Meister, A. 1980. "Catalytic mechanisms of glutamine synthetase; overview of glutamine metabolism". En Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation, Mora, J., Palacios, R. (eds.). Academic Press, New York.
- 3.- Stadtman, E.R. 1973. "A note on the significance of glutamine in intermediary metabolism". En The Enzymes of Glutamine Metabolism, Prusiner, S., Stadtman, E.R. (eds.). Academic Press, New York.
- 4.- Ginsburg, A., Stadtman, E.R. 1973. "Regulation of glutamine synthetase in Escherichia coli". En The Enzymes of Glutamine Metabolism, Prusiner, S., Stadtman, E.R. (eds.). Academic Press, New York.
- 5.- Stadtman, E.R., Mura, U., Boon Chock, P., Goo Rhee, S. 1980. "The interconvertible enzyme cascade that regulates glutamine synthetase activity". En Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation, Mora, J., Palacios, R. (eds.). Academic Press, New York.
- 6.- Bachmann, B.J., Brooks Low, K. 1980. "Linkage Map of Escherichia coli K-12, Edition 6". Microbiol. Rev. 44(1): 1-56.
- 7.- Magasanik, B., Rothstein, D. 1980. "The role of glutamine synthetase in the regulation of bacterial nitrogen metabolism". En Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation, Mora, J., Palacios, R. (eds.). Academic Press, New York.

- 8.- Pahel, G., Zelenetz, A.D., Tyler, B.M. 1978. "gltB Gene and Regulation of Nitrogen Metabolism by Glutamine Synthetase in Escherichia coli". J. Bacteriol. 133: 139-148.
- 9.- Kustu, S., Burton, D., Garcia, E., McCarter, L., McFarland, N. 1979. "Nitrogen Control in Salmonella: Regulation by the glnR and glnP Gene Products". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76(9): 4576-4580.
- 10.-Pahel, G., Tyler, B. 1979. "A new glnA linked regulatory gene for glutamine synthetase in Escherichia coli". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76(9): 4544-4548.
- 11.-Leonardo, J.M., Goldberg, R.B. 1980. "Regulation of Nitrogen Metabolism in Glutamine Auxotrophs of Klebsiella pneumoniae". J. Bacteriol. 142(1); 99-110.
- 12.-Kustu, S.G., McFarland, N., Hui, S.P., Esmon, B., Ferro-Luzzi Ames, G. 1979. "Nitrogen Control in Salmonella typhimurium: Co-Regulation of Synthesis of Glutamine Synthetase and Amino Acid Transport Systems". J. Bacteriol. 138(1): 218-234.
- 13.-Brenchley, J.E., Bedwell, D.M., Dendinger, S.M., Kuchta, J.M. 1980. "Analysis of mutations affecting the regulation of nitrogen utilization in Salmonella. En Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation, Mora, J., Palacios, R. (eds.). Academic Press, New York.
- 14.-Kustu, S.G., Burton, D., Garcia, E., McCarter, L., McFarland, N. 1980. "Nitrogen Regulation in Salmonella typhimurium. En Glutamine; Metabolism, Enzymology and Regulation, Mora, J., Palacios, R. (eds.). Academic Press, New York.

- 15.- McFarland, N., McCarter, L., Artz, S., Kustu, S. 1981. "Nitrogen regulatory locus glnR of enteric bacteria is composed of cistrons ntrB and ntrC: Identification of their protein products". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78(4): 2135-2139.
- 16.- Rothstein, D.M., Pahel, G., Tyler, B., Magasanik, B. 1980. "Regulation of expression from the glnA promoter of Escherichia coli in the absence of glutamine synthetase". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77(12): 7372-7376.
- 17.- Rothstein, D.M., Magasanik, B. 1980. "Isolation of Klebsiella aerogenes Mutants cis-dominant for Glutamine Synthetase Expression". J. Bacteriol. 141(2):671-679.
- 18.- Foor, P., Reuveny, Z., Magasanik, B. 1980. "Regulation of synthesis of glutamine synthetase by the P_{II} protein in Klebsiella aerogenes". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77(5):2636-2640.
- 19.- Reuveny, Z., Foor, P., Magasanik, B. 1981. "Regulation of Glutamine Synthetase by Regulatory Protein P_{II} in Klebsiella aerogenes Mutants Lacking Adenylyltransferase". J. Bacteriol. 146(2):740-745.
- 20.- Miller, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. (2a. ed.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 21.- Covarrubias, A.A., Sánchez-Pescador, R., Osorio, A., Bolívar, F., Bastarrachea, P., 1980. "ColE1 Hybrid Plasmids Containing Escherichia coli Genes Involved in the Biosynthesis of Glutamate and Glutamine". Plasmid. 3:150-164.

- 22.- Brom, S. 1980. Obtención y Caracterización de Mutaciones en la región glnA del cromosoma de Escherichia coli K12. Tesis. Licenciado en Investigación Biomédica Básica. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 23.- Swanstrom, M., Adams, M.H. 1951. "Agar layer method for production of high titer phage stocks". Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 78:372.
- 24.- Bender, R.A., Janssen, K.A., Resnick, A.D., Blumenberg, M., Poor, F., Magasanik, B. 1977. "Biochemical Parameters of Glutamine Synthetase from Klebsiella aerogenes". J. Bacteriol. 129:1001-1009.
- 25.- Shapiro, B.M., Stadtman, E.R. 1970. "Glutamine Synthetase (Escherichia coli)". En Methods in Enzymology. Tabor, H., Tabor, C.W. (eds.). Vol. 17A, pp. 910-922. Academic Press, New York.
- 26.- Marcus, M., Halpern, Y.S. 1969. "The Metabolic Pathway of Glutamate in Escherichia coli K-12". Biochim. Biophys. Acta. 177:314-320.
- 27.- Stevenson, R., Silver, S. 1977. "Methylammonium uptake by Escherichia coli: evidence for a bacterial NH_4^+ transport system". Biochim. Biophys. Res. Commun. 75(4):1133-1139.
- 28.- Ratzkin, B., Grabnar, M. Roth, J. 1978. "Regulation of the Major Proline Permease Gene of Salmonella typhimurium". J. Bacteriol. 133(2):737-743.
- 29.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. "Protein measurements with the Folin phenol reagent". J. Biol. Chem. 193:265-275.
- 30.- Bender, R.A., Magasanik, B. 1977. "Regulatory Mutations in the Klebsiella aerogenes Structural Gene for Glutamine Synthetase". J. Bacteriol. 132:100-105.

- 31.- Covarrubias, A., Sánchez-Pescador, R., Lozoya, E., Bastarrachea, F., Bolivar, F. 1980. "Isolation of Escherichia coli chromosomal DNA regions carrying glnA, gdh, and gltB structural genes". En Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation. Mora, J., Palacios, R. (eds.). Academic Press, New York.
- 32.- Kennedy, E.P. 1970. "The Lactose Permease System of Escherichia coli". En The Lactose Operon. Beckwith, J.R., Zipser, D. (eds.). Cold Spring Harbor, New York.
- 33.- Roon, R.J., Even, H.L., Dunlop, P., Larimore, F.L. 1975. "Methylamine and Ammonia Transport in Saccharomyces cerevisiae". J. Bacteriol. 122(2):502-509.
- 34.- Barnes, E.M., Zimniak, P. 1981. "Transport of Ammonium and Methylammonium ions by Azotobacter vinelandii". J. Bacteriol. 146(2):512-516.