

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

*CARACTERIZACION Y ESTUDIO DE LA REGION FLANQUEADORA 3' DEL GENE
QUE CODIFICA PARA LA ENZIMA GLUTAMATO DESHIDROGENASA EN Escherichia
coli K-12*

Tesis Profesional

Que para obtener el título de

BIOLOGO

Presenta

Laura Estela Riba Ramírez

Director: Dr. Francisco Bolivar Zapata

México, D.F.

1985



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

TABLA DE CONTENIDO

	pag.
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	18
MATERIALES	19
METODOLOGIA	24
RESULTADOS	36
DISCUSION	43
BIBLIOGRAFIA	47

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Pag.
FIGURA 1	3
FIGURA 2	4
FIGURA 3	6
FIGURA 4	7
FIGURA 5	8
FIGURA 6	10
FIGURA 7	11
FIGURA 8	12
FIGURA 9	37
FIGURA 10	38
FIGURA 11	40
FIGURA 12	42
TABLA I	14
TABLA II	15
TABLA III	16
TABLA IV	17

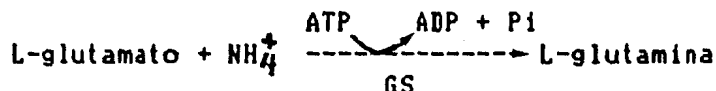
INTRODUCCION

Metabolismo Nitrogenado.

El nitrógeno ha sido seleccionado por la naturaleza como uno de los constituyentes esenciales de las moléculas orgánicas involucradas en el metabolismo intermediario de todo organismo. Por ello, es de fundamental importancia que los sistemas biológicos posean los mecanismos adecuados de asimilación y utilización de nitrógeno del medio circundante. Así, las bacterias entéricas utilizan el amonio (NH_4^+) como fuente de nitrógeno al crecer en un medio mínimo. Los grupos nitrogenados destinados al metabolismo intermediario se derivan del glutamato y la glutamina.

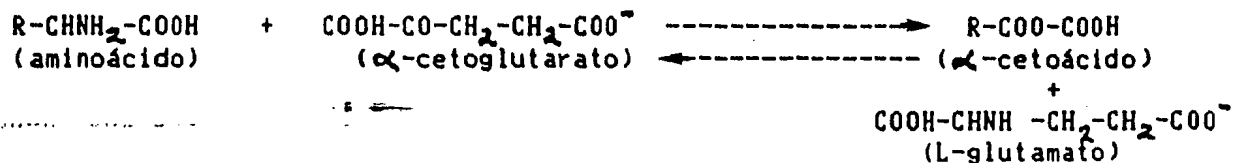
El glutamato es el principal donador de grupos amino para la formación de aminoácidos por transaminación, mientras que el grupo amida de la glutamina es el donador directo de nitrógeno para algunos pasos en la biosíntesis de algunos aminoácidos, purinas, pirimidinas y algunos otros compuestos nitrogenados (Tyler, 1978).

La formación de glutamina se realiza mediante una sola vía catalizada por la enzima glutamino sintetasa (L-glutamato: amonio-ligasa, EC 6.3.1.2.) (GS). Esta enzima está sujeta a varias formas de regulación, y la reacción que cataliza es la siguiente:



Por otra parte, la formación de glutamato se lleva a cabo por tres vías esencialmente:

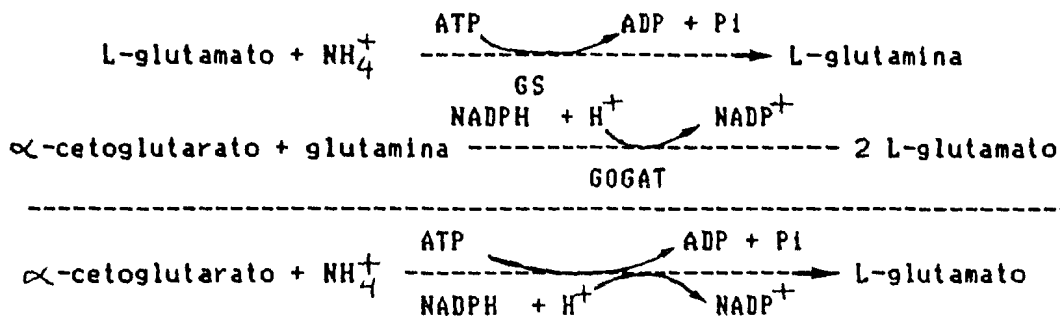
1. A partir de α -cetoglutarato y los grupos amino de otros aminoácidos por transaminación. La reacción general es:



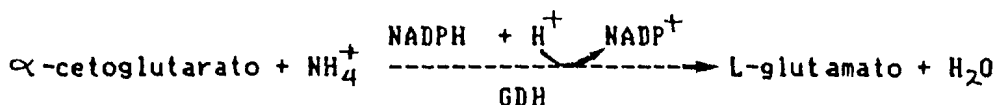
2. A partir de α -cetoglutarato y L-glutamina. Esta reacción es catalizada por la enzima glutamato sintasa (L-glutamato: NADP⁺ oxidoreductasa, EC 1.4.1.3.) (GOGAT) acoplada a la reacción ATP-dependiente, catalizada por la enzima GS. La reacción catalizada por GOGAT es:



Al sumar las reacciones catalizadas por la GS y la GOGAT tenemos:



3. A partir de amonio y α -cetogluturato, reacción catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa (L-glutamato:NADP⁺ oxidoreductasa, EC 1.4.1.4.) (GDH). La reacción que cataliza es la siguiente:



Las formas de incorporación de amonio a moléculas orgánicas y las tres principales vías de formación de glutamato para llegar a la biosíntesis de glutamina se muestran en la figura 1. La relación entre estas tres enzimas y su interacción en la asimilación y utilización de amonio para la formación de glutamato se muestran en la figura 2.

La glutamato deshidrogenasa está constituida por un hexámero con un peso de 290,000 y cada una de sus subunidades pesa 48,000 (Sakamoto et al., 1975). La gran importancia de esta enzima reside por una parte en el papel central que ocupa en el metabolismo celular, dado que su actividad está asociada a la interconversión de α -cetogluturato y glutamato. Esta interconversión se sitúa como un punto de cruce entre el metabolismo nitrogenado y el de carbono. Como se mencionó anteriormente, el glutamato es el donador primario de grupos amino para la síntesis de aminoácidos por transaminación. En cuanto al α -cetogluturato, entra al ciclo de Krebs, generando ahí equivalentes reductores.

Por otra parte, la reacción catalizada por GDH constituye un mecanismo de asimilación de nitrógeno eficiente ya que no requiere de energía proporcionada por ATP, mientras que la vía alterna GS-GOGAT comprende dos reacciones catalizadas por dos enzimas en un mecanismo ATP-dependiente.

En enterobacterias tales como Salmonella typhimurium, Klebsiella aerogenes y K. pneumoniae, la vía de asimilación de amonio parece responder al control por nitrógeno en un modelo propuesto por McFarland et al. (1981) y Merrick (1982). Sin embargo, este modelo no parece ser aplicable en el caso de Escherichia coli donde hay controversia en cuanto a la regulación de GDH. Algunos autores sostienen que esta enzima no se encuentra bajo la regulación de nitrógeno, reportan que sus niveles de actividad no se ven alterados significativamente en condiciones de alta y baja concentración de amonio (Streicher et al., 1976). Basándose en estas observaciones, Pahal y colaboradores (1978) proponen que la región promotor-operador del gene gdhA de E. coli es diferente a la de K. aerogenes e insensible a la regulación por nitrógeno.

Por otro lado existen datos publicados en los que se reporta que los

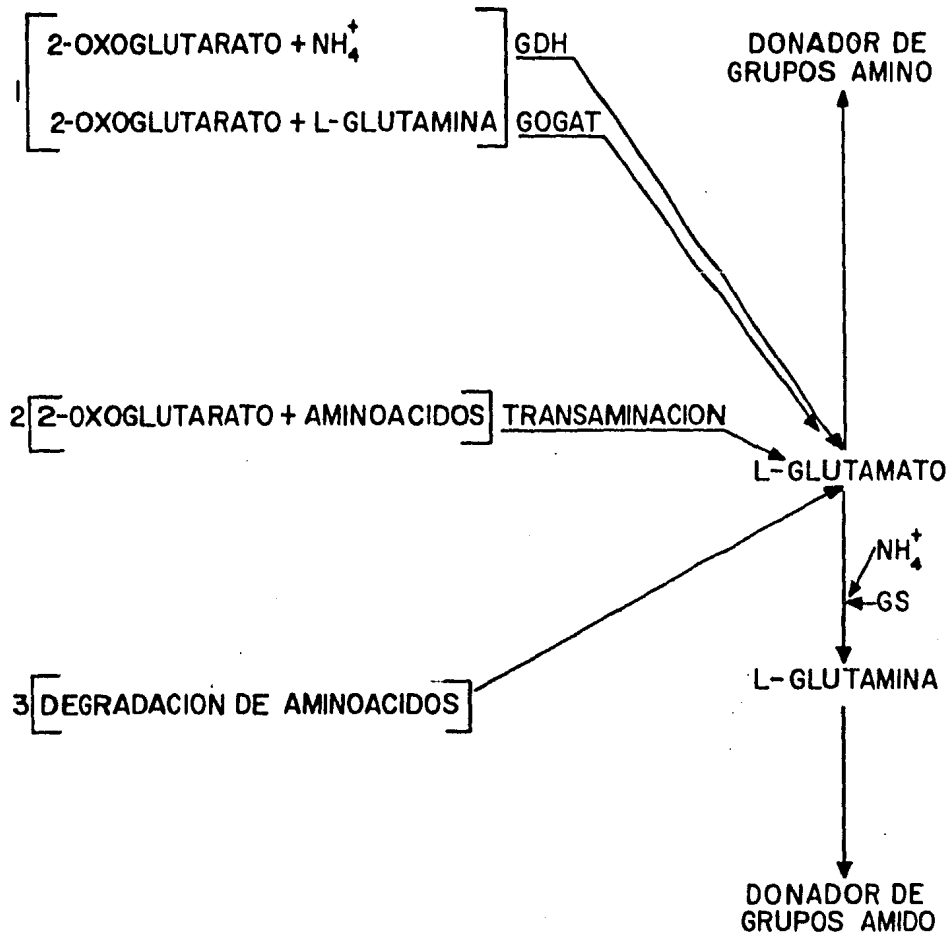


FIGURA 1. Diagrama de las formas de incorporación de amonio a moléculas orgánicas y las tres principales vías de formación de glutamato para llegar a la biosíntesis de glutamina (Tomado de Lozoya, 1982).

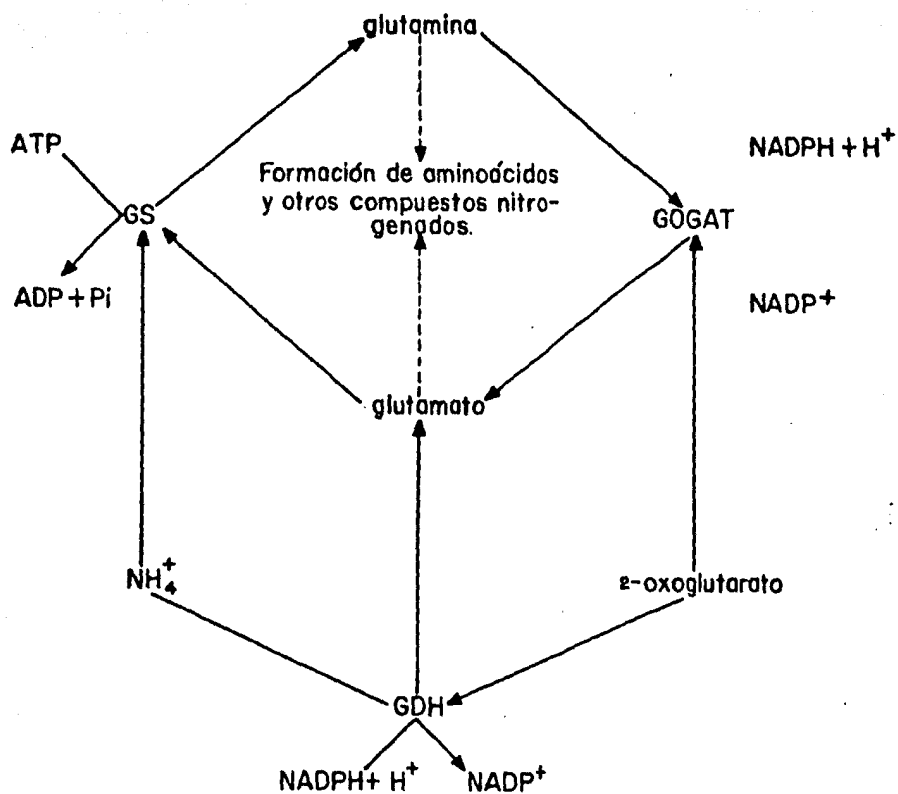


FIGURA 2. Diagrama de la relación e interacción de las enzimas GS, GDH y GOGAT en la asimilación del amonio y su utilización para la formación del glutamato (Tomado de Lozoya, 1982).

niveles de la enzima GDH en E. coli se alteran muy significativamente dependiendo de las condiciones de crecimiento (Varrichio, 1969; Senior, 1975).

Debido a la escasez de datos y a la controversia existente en cuanto a la regulación de esta enzima, se consideró justificable y necesaria una investigación que aportara conocimientos sobre sus mecanismos de regulación, sobre todo tomando en cuenta el papel central que juega esta enzima en el metabolismo celular.

Este proyecto de investigación se está llevando a cabo en el laboratorio del Dr. Francisco Bolívar Zapata en el Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, UNAM en Cuernavaca, Morelos. Las estrategias que se siguieron en el proyecto y los resultados obtenidos hasta el inicio del presente trabajo son los siguientes:

- I. Clonación del gene estructural que codifica para la enzima GDH en E. coli y regiones que le flanquean en un vehículo molecular (Covarrubias et al., 1980).
- II. Determinación de la dirección de transcripción del gene en el fragmento clonado (Sánchez-Pescador et al., 1982).
- III. Secuenciación nucleotídica parcial del gene y de las regiones que le flanquean (Sanvicente et al., 1983).
- IV. Secuenciación nucleotídica completa del gene y de las regiones que le flanquean (Valle et al., 1983 y 1984); identificación preliminar de la región o regiones donde se inicia la transcripción y otras secuencias de ADN posiblemente involucradas en la regulación de la expresión del gene.
- V. Identificación y caracterización tentativas de las regiones involucradas en la regulación de la expresión del gene (Valle et al., 1983).

Con base en la secuencia nucleotídica de la región flanqueadora 3' del gene, se analizó una secuencia de 200 pb posteriores al codón de terminación. Este análisis indica que un transcrito que lleve esta secuencia tiene la capacidad potencial de formar una serie de estructuras secundarias con posibles implicaciones regulatorias (Fig. 3). Una de ellas estaría comprendida en una secuencia que se inicia a 87 pb del codón de terminación, a partir de la cual podría formarse una estructura estable de tallo-asa con las características de un terminador rho independiente (Adhya y Gottesman, 1978; Holmes et al., 1983) (Fig. 4).

Otra de estas posibles estructuras presenta un gran parecido a un ARN de transferencia (Fig. 5) (Becerril et al., 1985), y un dato de interés es el hecho de que guarda un alto grado de similitud en cuanto a su estructura secundaria (en forma de trébol) y su secuencia (35%), con el ARN de transferencia (tARN) para glutamato en E. coli (Sprinzl y Gauss, 1983). Este parecido podría tener un significado específico dado que el gene gdhA codifica para una enzima catalizadora de una reacción que sintetiza específicamente glutamato. Dado esto, podría pensarse que de tener una función regulatoria, esta estructura podría actuar a nivel de traducción del men-

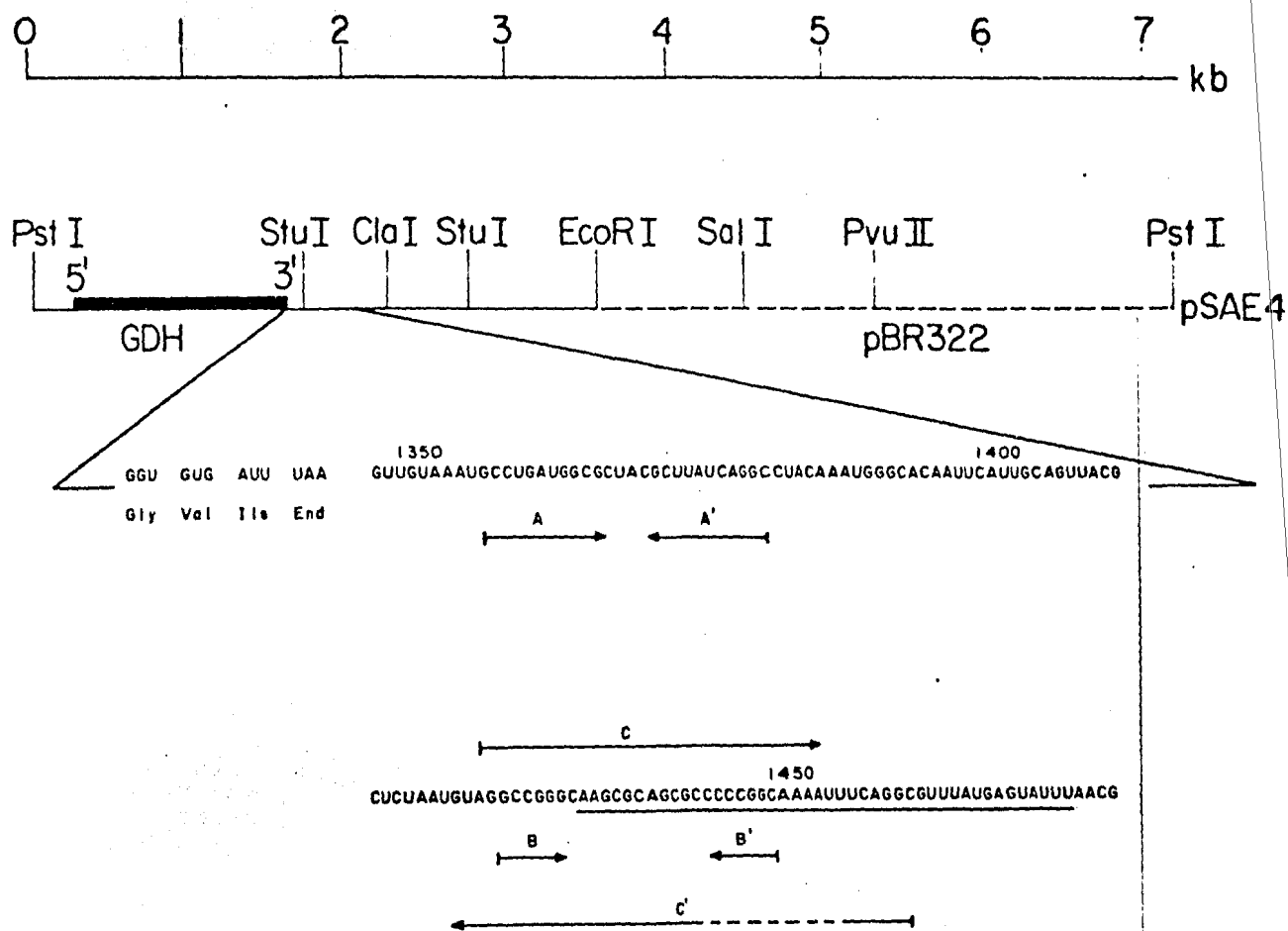


FIGURA 3. Características del extremo flanqueador 3' del gene *gdhA*. Mapa físico del plásmido pSAE4 linealizado a partir del sitio de restricción de la enzima PstI. La línea punteada representa al vector pBR322, la línea continua representa un inserto cromosomal de *E. coli*, y la barra gruesa representa la localización del gene *gdhA*. Los extremos 3' y 5' se hallan indicados. El fragmento detallado contiene la secuencia nucleotídica (correspondiente al mRNA) que codifica para los últimos 3 aminoácidos, el codón de terminación y los siguientes 132 nucleótidos. Tanto la secuencia nucleotídica como la numeración fueron tomados de Valle et al. (1984). Bajo la secuencia se indican varios palíndromos con potencial de formar estructuras secundarias (Ver Discusión en el texto) (Tomado de Becerril et al., 1985, en prensa).

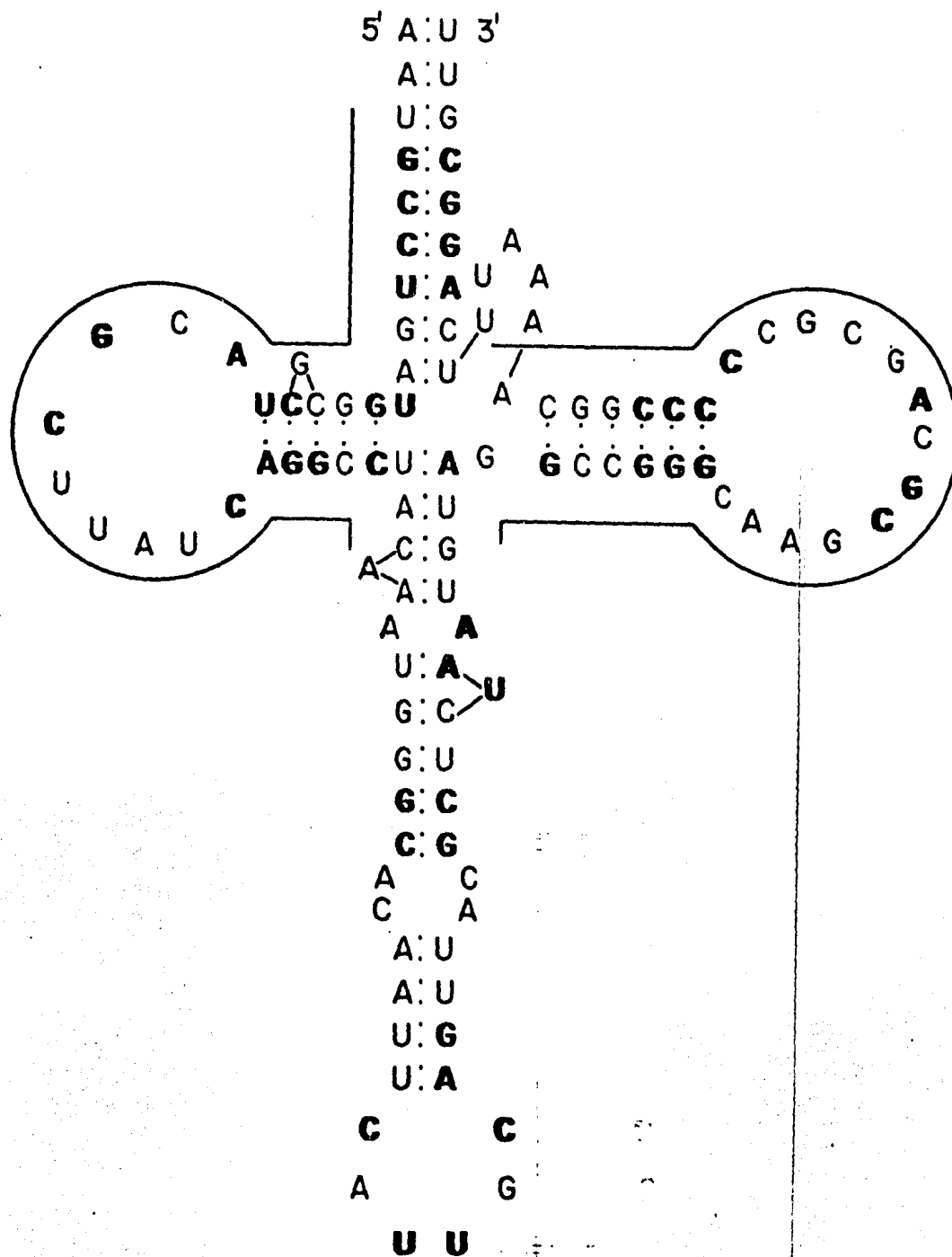


FIGURA 5. Estructura similar a un ARN de transferencia que podría formarse al plegar el transcrito de ARN que comprende los primeros 120 nucleótidos a partir del codón de terminación del gene *gdhA*. La numeración corresponde a la utilizada en la Fig. 3. Las bases representadas en caracteres gruesos corresponden a las del tARN de glutamato. La localización de las secuencias REP está indicada por líneas continuas (Tomado de Becerril et al., 1985).

sajero como parece ser el caso de una estructura similar al tARN de histidina en el operón his de Salmonella typhimurium (Ames et al., 1983).

Otra de las posibles estructuras identificadas inicialmente (Valle, 1984) es casi idéntica (28 identidades de 29 totales) a la secuencia consenso reportada por Higgins et al. (1982) propuesta como un elemento nuevo de importancia en la regulación génica de procariontes. Posteriormente, Stern et al. (1984) llevaron a cabo una revisión más amplia de estas secuencias que denominaron REP (repetitive extragenic palindromic sequences) y proponen una nueva secuencia consenso. Con base en esta se identificó una segunda secuencia REP en el gene gdhA a 35 pb de distancia y en sentido opuesto a la primera.

En su revisión, Stern et al. (1984) encontraron 35 secuencias REP en 16 operones de E. coli principalmente y otras enterobacterias, aunque también las encontraron en unidades transcripcionales monocistrónicas. Todas estas secuencias presentan un alto grado de conservación y es importante hacer notar que no han sido encontradas en fagos o eucariontes. Las secuencias REP constan de 35 pares de bases (pb) y se dan en una o más copias adyacentes, generalmente en sentido opuesto. Cada secuencia comprende una simetría de díada altamente conservada y el potencial de apareamiento en el tallo es muy alto. Por otra parte, al haber dos secuencias encontradas en sentido opuesto, se puede formar otra estructura de tallo-asa de mayor tamaño que la formada por una sola secuencia REP. Estos dos tipos de estructuras son excluyentes. Las figuras 6, 7 y 8 muestran una comparación de las secuencias REP encontradas en el gene gdhA y el consenso, así como las estructuras que se podrían formar dadas ambas secuencias.

Recientemente se ha llevado a cabo en nuestro laboratorio una revisión más extensa de esta secuencia en el genoma de E. coli y otras enterobacterias (Becerril et al., 1985). Con base en esta revisión se ha aumentado una base al consenso reportado por Stern et al. (1984) y se han identificado 16 nuevas secuencias REP localizadas en 9 unidades transcripcionales (Tablas I, II y III). Las secuencias encontradas en el gene gdhA se encuentran entre estas últimas.

Esta revisión aumentó nuestro interés en estas secuencias. Al encontrar estas secuencias en regiones extragénicas, es decir, no codificadoras de ARNs mensajeros, y con base en datos obtenidos a partir de delecciones de estas secuencias en el operón his J-P en Salmonella typhimurium, Stern et al. proponen que estas secuencias podrían tener algún papel importante en la estabilización del mensajero en la célula. Sin embargo, en nuestra revisión (Becerril et al., 1985) se encontraron estas secuencias no solamente en genes que codifican para ARNs mensajeros sino también en algunos operones que codifican para ARNs de transferencia. Por otro lado, adicionalmente a las secuencias REP se hallaron secuencias muy parecidas a ellas (tipo REP) en genes que codifican para ARNs de transferencia y ribosomales. En este último caso un dato interesante es que en estos ARNs dichas secuencias no se encuentran en regiones intercistrónicas sino que forman parte de la región codificadora del gene.

Para tener una visión más clara tanto de las secuencias REP como de las secuencias tipo REP, se pueden distribuir en dos categorías, cada una de ellas subdividida según la región génica que ocupan dichas secuencias o del tipo de ARN en que se encuentren, de la siguiente manera:

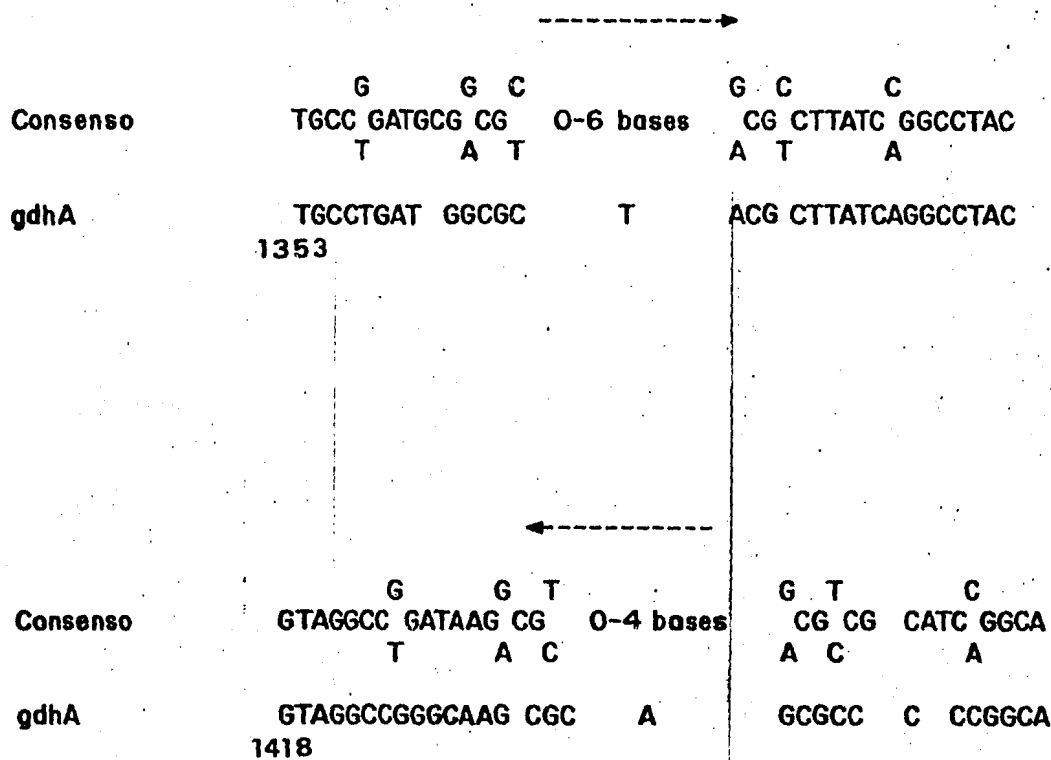


FIGURA 6. Comparación de las dos secuencias REP encontradas en el gene gdhA con los consensos respectivos.

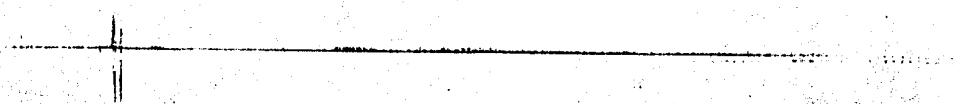


FIGURA 7. Estructuras de tallo-asa que podrían formarse a partir de las secuencias REP consenso. Las estructuras A y B se generaron a partir de las secuencias consenso presentadas en las Tablas II y III respectivamente. La estructura C se generó apareando las estructuras A y B. Cabe hacer notar que las regiones apareadas de A y B son idénticas. Sin embargo, las secuencias CUAC y GUAG conservadas en el extremo 3' en A y en el extremo 5' en B, así como la burbuja central en cada estructura les confieren direccionalidad con respecto al gene proximal (Tomado de Becerril et al., 1985).

.....
7 to 35 b
.....

C.G
A.U
U.A
C.G
G.C
G.C
A.C.G.U
C.G
U.A
A.U
U.A
U.A
C.G

U.C.G.A
G.C
C.G
A.G.C.U
.....

U.C.G.A
G.C
C.G
A.G.C.U
.....

U.C.G.A
G.C
C.G
A.G.C.U
.....

C

.....
0 to 4 b
.....

U.C.G.A
G.C
C.G
A.G.C.U
.....

A G
A C
U.A
A.U
G.C

U.G.C.A
C.G
C.G
G.U.A.G.G.A

B

.....
0 to 6 b
.....

U.C.G.A
G.C
C.G
A.G.C.U
G.C
C U
G U
U.A
A.U
G.C

U.G.C.A
C.G
C.G
U.G.C.C.U.A.C

A



FIGURA B. Estructuras potenciales de tallo-asa formadas a partir de las secuencias REP halladas en el extremo flanqueador 3' del gene gdhA. Cabe hacer notar que no se ha establecido si el mRNA del gene incluye dichas secuencias. Se han representado dos posibles estructuras secundarias (A y B). Así mismo estas dos secuencias pueden aparearse para formar una estructura alternativa, C. El número de bases (de un total de 33) conservadas con respecto a las secuencias consenso se muestra en paréntesis (Tomado de Becerril et al., 1985).

I. SECUENCIAS REP (Ver Tablas I, II y III):

1. Secuencias REP halladas en regiones intercistronicas de genes que codifican para ARNs inestables (mensajeros). La región en que se encuentran estas secuencias puede ser:
 - a) Al final de unidades transcripcionales monocistronicas. (e.g. gdhA, tryp R).
 - b) Entre las regiones codificadoras de un operón. (e.g. his J-Q, his G-D).
 - c) Al final de un operón. (e.g. sdhA, sdcB).
2. Secuencias REP halladas al final de unidades mono o policistronicas de ARNs estables. (e.g. MIRNA, sup BE, tyr tARN).

II. SECUENCIAS TIPO REP (Ver Tabla IV):

1. Secuencias tipo REP formando parte de regiones codificadoras para ARNs de transferencia. (e.g. ile tARN en E. coli y B. subtilis).
2. Secuencias tipo REP formando parte de regiones codificadoras de ARNs ribosomales. (e.g. 16S y 23S en E. coli).

El hecho aislado de encontrar secuencias REP en ARNs más estables que los mensajeros, es por sí mismo interesante ya que se podría pensar que de tener alguna función en la regulación génica esta podría estar no sólo relacionada con la estabilidad del ARN en cuestión. Ahora bien, al encontrar secuencias con un alto grado de similitud a las secuencias REP formando parte de regiones codificadoras de ARNs de transferencia y ribosomales, aumentan las preguntas acerca de su posible función. Una de las posibilidades sería el que estas secuencias tuvieran algún tipo de interacción con proteínas involucradas en los mecanismos de transcripción o traducción de la célula. Estas proteínas podrían ser de tipo modificador como las que interaccionan con bases específicas de ARNs de transferencia, o bien de tipo procesador como las que interaccionan con algunos ARNs ribosomales. Por otro lado, cabe la posibilidad de que el papel de estas secuencias esté limitado a ser de tipo estructural, afectando la arquitectura tanto del ADN y/o la del ARN de tal manera que modificara sus niveles de transcripción y/o traducción.

Si bien existen varias posibilidades en cuanto al papel que estas secuencias REP y tipo REP pudieran tener en la regulación génica en procariontes, no se tienen datos experimentales para apoyar estas suposiciones. De hecho, es muy poco lo que se conoce al respecto. Sin embargo, es claro que este tipo de secuencias no se dan al azar, ya que se han encontrado únicamente en procariontes y exhiben un alto grado de conservación así como una serie de características que sugieren un papel potencial en la organización del genoma del cual forman parte.

TABLA I. Localización de secuencias REP. La localización de cada secuencia REP con respecto al gene proximal (gene más próximo a las secuencias REP identificado con respecto a la dirección de transcripción) se indica con flechas gruesas cuya dirección indica la orientación de dichas secuencias. La dirección de transcripción va de izquierda a derecha. Cada gene está representado por un recuadro con su nombre. En muchos casos, no se sabe si existen genes adicionales más adelante en la secuencia. NI indica que existe un marco abierto de lectura y/o un producto génico, aunque su función es desconocida. S.t. significa Salmonella typhimurium. La secuencia REP incompleta en mtIA (2) indicada por la flecha discontinua puede continuar aunque no se tienen datos adicionales de secuencia. Los casos marcados con asteriscos fueron tomados de Becerril et al. (1985). El resto fueron tomados de Stern et al. (1984).

Las secuencias REP han sido identificadas como parte del mRNA en 8 unidades transcripcionales: glyA (12), hisJ (10), mtIA (2), lacY (4), folA (3), hisG (11), glnALG (16) y rpoD (6).

a. dhuA (5), es el nombre de la región regulatoria del operón de transporte de histidina en S. typhimurium. En este caso, la secuencia REP se halla sobrelapada con el promotor propuesto para hisJ.

b. (7) La secuencia REP está localizada entre la región de -10 y el codón de iniciación ATG de la región codificadora del gene uvrD.

c. (8) No se ha establecido si existe la codificación para un polipéptido pequeño en la región que se encuentra entre la secuencia REP y MIRNA.

d. (13) Las secuencias REP están localizadas en el extremo 3' del operón de tARN. Este es uno de los dos casos en los cuales se han hallado secuencias REP repetidas en tandem.

e. (14) Las secuencias REP están localizadas en el extremo 3' del operón de tARN.

f. (24) Las secuencias REP están localizadas en la región intercistronica de los genes araA y araD del operón araBAD de Salmonella typhimurium LT1 (Lin et al., 1985). En este caso también se presentan en tandem.

NA. (22,23) Las secuencias nucleotídicas que rodean a las secuencias REP no están disponibles (Stern et al., 1984).

(Tomado de Becerril et al., 1985).

TABLA I

Nombre		Distancia del codón de terminación	Separación entre Secuencias REP
1	aroG	49	—
2	mflA	41	—
3	folA	24	—
4	lacY	9	—
5	*dhuA(St.)	a	—
6	*rpoD	3	—
7	*uvrD	b	—
8	MIRNA	c	35
9	spol42	60	25
10	hisJ(St.)	47	20
11	hisG(St.)	6	25
12	glyA	36	35
13	*supBE tRNA	d	5
14	*tyr tRNA	e	13
15	*gdhA	9	34
16	*glnALG	59	14
17	*plsB	12	36
18	lamB	9	7,14
19	ndhA	12	14
20	trpR	4	15,26
21	glnS	20	30,35
22	sdhA	NA	NA
23	sucB	NA	NA
24	*araBAD(S.t.)	14(f)	6,11

TABLA II. Homología entre secuencias REP. Secuencia consenso de REP comparada con las secuencias nucleotídicas mostradas en la Tabla I. La flecha superior indica la orientación de las secuencias REP con respecto al gene proximal identificado. Los números en paréntesis identifican secuencias REP en unidades donde existen más de dos de ellas. Todas las secuencias nucleotídicas son de GenBank (Septiembre, 1984) a excepción de malE, hisG, sucB y sdhA, las cuales fueron tomadas de Stern et al., 1984 (Tomado de Becerril et al., 1985).

TABLA II

Nombre

Secuencia



Consenso

	T	G	C	G	A	T	G	C	G	C	G	C	G	A	T	C	T	T	A	T	C	G	G	C	C	T	A	C												
malE		G	C	C	G	G	A	T	G	G	C		C	G	T		G	A		A	C	G	C	C	T	T	G	T	C	C	G	G	C	C	T	A	C			
sucB (2)		G	C	C	T	G	A	T	G	C	G	A	C	G	C		T	G	A	C		G	C	G	T	C	T	T	A	T	C	A	G	G	C	C	T	A	C	
sucB (4)		G	C	C	T	G	A	T	G	T	G	A	C	G	T		T	T	A	A	C	G	T	G	T	C	T	T	A	T	C	A	G	G	C	C	T	A	C	
sdhA (2)		G	C	C	G	G	A	T	G	C	G		C	G	T		G	A			A	C	G	C	C	T	T	A	T	C	C	G	G	C	C	T	A	C		
M1 RNA	T	G	C	C	G	G	A	T	G	C	G	G	C	G	T		G	A			A	C	G	C	C	T	T	A	T	C	C	T	G	G	C	C	T	A	C	
hisG	C	G	C	C	T	G	A	T	G	G	C		C	G	T							G	C	G	C	T	T	A	T	C	A	G	G	C	C	T	A	C		
polA	T	G	C	C	T	G	A	T	G	C	G		C	T								A	T	G	T	C	T	T	A	T	C	A	G	G	C	C	A	A	C	
glyA (1)	T	G	C	C	G	G	A	T	G	C	G	G	C	G	T		G	A				A	C	G	C	C	T	T	A	T	C	C	G	G	C	C	T	A	C	
qdhA	T	G	C	C	T	G	A	T		G	G	C	G	C			T					A	C	G	C	C	T	T	A	T	C	A	G	G	C	C	T	A	C	
glnALG	C	G	C	C	G	G	A	T	G	C	G	A	C	G	C		A	A	A	T		G	C	G	T	C	T	T	A	T	C	C	G	G	C	C	T	A	C	
trpR (2)	T	G	C	C	G	G	A	T	G	C	G	G	C	G	T		G	A				A	G	G	C	C	T	T	A	T	C	C	G	T	C	C	T	A	C	
hisJ (S.t.)	T	G	C	C	T	G	A	T	G		G	G	C	G	C			T				G	T	G	C	G	T	G	T	C	A	G	G	C	C	T	A	C		
lamB (2)	C	G	C	C	T	G	A	T	G	C	G	A	C	G	C		T	T	G	C		G	C	G	T	C	T	T	A	T	C	A	G	G	C	C	T	A	C	
glnS (3)	T	G	C	C	T	G	A	T	G	C	G		C	T								A	C	G	C	C	T	T	A	T	C	A	G	G	C	C	T	A	C	
plsB	T	G	C	C	G	G	A	T	G	C	G	G	C	G			A	A	A			A	C	G	C	C	T	T	A	T	C	C	G	C	C	T	T	C		
mtIA	T	G	C	C	T	G	A	T	G	C	G		C	G	C		T					G	C	G	C	T	T	A	T	C	A	G	G	C	C	T	A	C		
folA	C	G	C	C	G	G	A	T	G	C	G	A	C	G	C		C	G	G	T	C		G	C	G	T	C	T	T	A	T	C	C	G	G	C	C	T	T	C
lacY	T	G	T	C	G	G	A	T	G	C	G	G	C	G	C		G					A	C	G	C	C	T	T	A	T	C	C	G	A	C	C	A	A	C	
uvrD	T	G	G	C	G	G	A		G		G	G	C	G	T		T					G	C	G	C	T	T	C	T	C	C	G	C	C	C	A	A	C		
tyr tRNA	T	G	C	C	C	G	A	T		G	G	C	A	C			C					A	C	G	T		T	T	A	C	C	C	G	G	G	C	C	T	A	C
ndhA (2)	T	G	C	C	T	G	A	T	G	C	G		C	T									T	C	T	T	A	T	C	A	G	G	C	C	T	A	C			
ndhA (3)	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	C	A	T		A	A				A	C	G	C	C	T	C	A	T	C	C	G	C	C	T	T	G		
supBE tRNA	T	G	T	C	G	A	A	T	G	C	G	A	T	G	T		T	G	A	C		A	C	G	T	C	T	T	A	T	C	C								
supBE tRNA	T	G	T	C	G	G	A	T	G	C	G	A	C	G	C		T	G	C	C		G	C	G	T	C	T	T	A	T	C	C	G	A	C	C	T	A	C	
araBAD (1) (S.t.)	T	G	C	CCG	G	T	G	G	C	A	C		T									G	C	G	T	T	T	A	C	C	GGG	C	C	T	A	C				

TABLA III. Homología entre secuencias REP. Secuencias nucleotídicas de la secuencia consenso de REP complementaria y de las unidades transcripcionales presentadas en la Tabla I. Las indicaciones son las mismas de la Tabla II (Tomado de Bacerril et al., 1985).

TABLA III

Nombre Secuencia



Nombre	Secuencia	←	Secuencia	Nombre
Consenso	G T A G G C C	G	G A T A A G	G T C G C G C A T C C G G C A
		T	A C G C	A C C A G G C A
			0 to 4 b.	
sucB (1)	G T A G A C C G G A T A A G G C A T		T A T	C G C C T T C T C C G G C
sucB (3)	G T A G G T C G G A T A A G G C G C		A	A C G C C G C A T C C G A C
sdhA (1)	G T A G G C C T G A T A A G A C G C		G C A A	G C G T C G C A T C A G G C
sdhA (3)	G T A G G C C T G A T A A G C G C		A	A G C G C A T C A G G C
hisJ	G T A G G C C G G G C A A G G C		A C	A G C C G C C A T C C G G C G
aroG	A C A G G C C T G A T A A G T C G C		G C A	G C G T C G C A T C A G G C A
polA	A C G G G C C G G A T A C G C		C	A C A T C C G G C A
glyA	G T A G G C C T G A T A A G C G T		A	A G C G C A T C A G G C A
gdhA	G T A G G C C G G G C A A G C G C		A	G C G C C C C C G G C A
glnALG	G T A G G C C G G A G C A G G T		G A G T	G C T C T C C A A C G T G A A
trpR (1)	G T A G G C C T G A T A A G A C G T		G	G C G C A T C A G G C A
trpR (3)	G T A G G C A T G A T A A G A C G C		G G C A	G C G T C G C A T C A G G C G
lamB (1)	C T G G G C C G G A T A A G G C G T		T T	A C G C C G C A T T C G G C A
lamB (3)	G T A G G C C G G A T A A G G C G T		T T	A C G C C G C A T C C G G C A
glnS (1)	C T A T G C C G G A T G G G C G T		T T	A C G T C G C A T C C G G C A
glnS (3)	G C A G G C C G G A T A A G G C G T		T C	G C G C C G C A T C C G G C A
dhuA (S.t.)	G T C G G C C T G A T T A A T G G C A C		G A T	A G T C G C A T C G G A A
plsB	G T A G G C C T G A G A A G C G C		C C	A C G C C G C A T C A G G C T
ndhA (1)	G T G G G T C G G A T A A G G C G T		A	A C G C C G C A T C C G A C A
tyr tRNA	G T A G G T C G G A T A A G C G		A	A G C G C A T C C G A C A
M1 RNA	G T A G G C C T G A T A A G C G T		A	A G C G C A T C A G G C A
hisG	G T A G G C C G G A T A A G G C G			

TABLA IV

Nombre	Secuencia	→
Consenso	G T A G G C C G G A T A A G G C G T	0 to 4 b G T C G C A T C C G G C A
	T A C A C	A C
B. subtilis tRNA ile	G c A c G C C T G A T A A G C G T g	A C G T C G g T g g t t CgA (24)
E. coli tRNA ile	G c A G G C C T G A T A A G G G T	A g G T C G g T g g t t C A (24)
E. coli 16S RNA	G T A G t C C G G A T t G G a G T ctgca	A C G T C G AcT C C a t g A (25)
E. coli 23S RNA	G T A a G C C T G c g A A G G C G T gt	G CtG T GaggCA T C CtG G A (28)

TABLA IV. Secuencias tipo REP halladas como parte de genes que codifican para moléculas estables de ARN. En el margen derecho, en paréntesis, se especifica el número de bases (de 35 totales) que son homólogas al consenso. Las bases no homólogas están expresadas en letras minúsculas (Tomado de Becerril et al., 1985).

OBJETIVOS

Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo se pretende llevar a cabo un estudio preliminar del posible papel de las secuencias REP localizadas en el extremo flanqueador 3' del gene gdhA de Escherichia coli. Específicamente, se pretende determinar el efecto de algunas mutaciones que afectan dichas secuencias sobre la concentración celular de la enzima GDH.

MATERIALES

1. Cepas:

Las cepas de Escherichia coli que se utilizaron son las siguientes:

HB101: [F⁻ hsd S20, (r₆⁻, m₈⁻) rec AB, ara-14, pro A₂, lac Y1, gal K, rps L20, (Sm^r), xyl-5, mtl-1, sup E44, λ⁻]

CSS20: [Hfr C, trp A58, met B, gly V, su 58]

PA340: [F⁻, rec A⁻, thr-1, leu-6, thi-1, lac Y1, mol A1, λ^R, xyl-7, xyl -7, ara-13, mtl-2, ton A2, gal-6, his-1, arg H1, str-9, λ⁻, gdh-1, glt B31]

2. Plásmidos:

Los plásmidos que se utilizaron están descritos en la sección de Resultados.

3. Moléculas sintéticas:

Se utilizó un adaptador de Eco RI. Esta molécula sintética consiste en un decámero de nucleótidos con la secuencia CCGAATTCGG la cual contiene un sitio de restricción para la enzima Eco RI. El adaptador fue sintetizado por el Químico Mario Alberto Cuevas en el laboratorio del Dr. Xavier Sorberón, en el mismo centro de investigación donde se realizó esta tesis.

4. Medios de Cultivo:

Medio Luria líquido:

Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
NaOH 2.5 N	1 ml
H ₂ O bidestilada	1 l (aforar)

Se esteriliza todo Junto.

Para medio Luria sólido se agregan 15 g de agar-agar antes de aforar a 1 l y una vez estéril se vierten de 10 a 20 ml de medio en cada caja de Pe-

tri; el medio debe estar caliente para que no solidifique antes de tiempo.

Medio M9:

CaCl ₂ 0.01 M	10 ml
MgSO ₄ 0.1 M	10 ml
Glucosa al 20%	20 ml
Sales M9 10X	100 ml
Aminoácidos requeridos (auxotrofías)	Según la cepa
H ₂ O bidestilada	1 l (aforar)

Estos ingredientes se esterilizan cada uno por separado.

Sales M9.

Na ₂ HPO ₄	70 g
KH ₂ PO ₄	30 g
NaCl	5 g
NH ₄ Cl	10 g
H ₂ O	1 l (aforar)

Estos ingredientes se esterilizan juntos.

Aminoácidos requeridos (auxotrofías) por litro de Medio M9:

PA340			CS520	
* Treonina	1.0%	10 ml	+ Triptofano 0.5%	10 ml
* Leucina	1.0%	10 ml	* Metionina 0.7%	10 ml
* Arginina	1.0%	10 ml		
* Histidina	0.5%	10 ml		
+ Glutámico	0.2%	10 ml		
+ Vitamina B1	0.1%	1 gota		

- * Estos aminoácidos se esterilizan por autoclave.
- + Estos aminoácidos se esterilizan por filtración.

Medio Mínimo "NN" (para 100 ml):

PA340			CS520		
(NH ₄ Cl 15 mM)			(NH ₄ Cl 1 mM)		
1 ml	NH ₄ Cl 8%	66 µl	1 ml	NH ₄ Cl 8%	66 µl
13 ml	mezcla NN	13 ml	13 ml	mezcla NN	13 ml
1 ml	Treonina	1 ml	1 ml	Triptofano	1 ml
1 ml	Leucina	1 ml	1 ml	Metionina	1 ml
1 ml	Arginina	1 ml			
1 ml	Histidina	1 ml			
1 gota	Vit B1	1 gota			

aforar a 100 ml

Mezcla NN (para 500 ml de medio mínimo "NN"):

Sales "NN" 10X	50 ml
MgSO ₄ 0.1 M	5 ml
CaCl ₂ 0.01 M	5 ml
Glucosa al 20%	5 ml
o	
Glicerol al 50%	5 ml

Sales "NN" 10X (para 100 ml de sales = para 1 l de medio mínimo "NN"):

KH ₂ PO ₄	13.6 g
K ₂ SO ₄	2.61 g
FeSO ₄	1 granito
KOH 10 M	10 ml
H ₂ O	100 ml (aforar)

Medio Mínimo "NN" sólido (para 100 ml):

Sales "NN" 2X	50 ml
Glucosa al 20%	1 ml
MgSO ₄ 0.1 M	1 ml
NH ₄ Cl 8%	1 ml (15 mM)
o	
NH ₄ Cl 8%	66 µl (1 mM)
Agar-agar 3.4%	47 ml

Se vierten de 10 a 20 ml de medio en cada caja de Petri.

5. Antibióticos:

	Medio Luria		Medio Mínimo "NN"	
	líquido	sólido	líquido	sólido
estreptomocina	0.200 mg/ml	0.20 mg/ml	0.1000 mg/ml	0.100 mg/ml
tetraciclina	0.015 mg/ml	0.03 mg/ml	0.0075 mg/ml	0.015 mg/ml

6. Enzimas:

Endonucleasas de Restricción.

Todas las endonucleasas de restricción fueron adquiridas en New England Biolabs, U.S.A.:

Enzima	Condiciones de Reacción
Eco RI	TRIS-HCL 100 mM pH 7.5 MgCl ₂ 5 mM NaCl 50 mM 37 °C
StuI	TRIS-HCL 10 mM pH 7.9 MgCl ₂ 10 mM NaCl 100 mM 37 °C
Hae III	TRIS-HCL 50 mM pH 7.5 MgCl ₂ 5 mM 37 °C
Hpa II	TRIS-HCL 20 mM pH 7.4 MgCl ₂ 10 mM DTT 1 mM 37 °C
NruI	TRIS-HCL 6 mM pH 7.4 MgCl ₂ 6 mM NaCl 50 mM β-ME 6 mM ASB 100 mM 37 °C
Otras Enzimas.	
Ligasa (Purificada según Tait et al., 1980)	TRIS-HCL 20 mM pH 7.6 MgCl ₂ 10 mM DTT 10 mM ATP 5 mM (en TRIS 0.1 M pH 7.4) (New England Bio Labs) 12 °C
RNAsa A (Sigma)	Preparación: 10 mg/ml en : NaOAc 0.1 M -3 EDTA 3.3 X 10 ⁻³ M pH 5 calentar a 85 °C durante 10 min utilizar a 37 °C
Kinasa (New England Bio Labs)	TRIS-HCL 70 mM PH 7.6 MgCl ₂ 10 mM DTT 5 mM γ-ATP ³² P 60 mM (New England Bio Labs)
Lisozima (Sigma)	5 mg/ml en : TRIS-HCL 25 mM pH 8 incubar a 20 °C

Abreviaturas: DTT: ditiotreitól; β -ME: β -mercaptoetanol; ASB: albúmina de suero bovino.

7. Reactivos:

Los reactivos utilizados se adquirieron en las siguientes casas comerciales:

J.T. Baker de México: cloruro de sodio, EDTA, dextrosa, hidróxido de sodio, acetato de potasio, ácido acético glacial, isopropanol, etanol absoluto, fenol, carbonato de sodio, cloruro de magnesio, glicerol, sulfato de zinc, cloroformo, cloruro de potasio, fosfato de sodio dibásico, fosfato de potasio monobásico, cloruro de amonio, sulfato de magnesio, sulfato de potasio dibásico, sulfato ferroso e hidróxido de potasio.

Sigma de México: ioduro de propidio, TRIS, aceite de parafina, TRISMA-base, acetato de sodio anhidro, follin-cicalteau, albúmina bovina, ditiotreitól, tetraciclina, cloramfenicol, estreptomycin, ácido -cetoglutarico, arginina, vitamina B1 (tiamina) y NADPH.

Merck de México: etanol absoluto, fenol, cloruro de calcio, agar-agar, treonina, leucina, histidina, metionina y triptofano.

Bio-rad Laboratories (U.S.A.): agarosa, acrilamida, bisacrilamida, resina Dowex, azul de bromofenol, xilencianol, persulfato de amonio y TEMED.

Difco Laboratories (U.S.A.): casaminoácidos, bactotripton y extracto de levadura.

Bayer de México: ampicilina (Binotal).

Calbiochem Laboratories (U.S.A.): bromuro de etidio.

Kawecki Berylco Ind., Inc.(U.S.A.): cloruro de cesio.

FMC Corporation (U.S.A.): agarosa de bajo punto de fusión.

Serva (U.S.A.): resina BND.

METODOLOGIA.

- I. Purificación de ADN de plásmido.
- II. Transformación de ADN en E. coli.
- III. Microensayos de ADN de plásmido.
- IV. Electroforesis de ADN en geles de agarosa y acrilamida.
- V. Electroelución de fragmentos de ADN de geles.
- VI. Columnas de resina BND.
- VII. Purificación de fragmentos de ADN por agarosa de bajo punto de fusión.
- VIII. Lisis de células bacterianas por sonicación.
- IX. Cuantificación de actividad de la enzima GDH.
- X. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.
- XI. Cuantificación de plásmido en geles.

I. Purificación de ADN de plásmido.

El ADN de plásmido se prepara mediante la amplificación de cultivos en fase de crecimiento exponencial mediante la adición de cloramfenicol cuando el plásmido no codifica para dicha resistencia o espectinomicina en el caso contrario. La extracción y purificación se lleva a cabo por el método de Maniatis et al. (1982) con algunas modificaciones y que consta de los siguientes pasos:

- 1) Las células portadoras del plásmido por purificar se incuban en 10 ml de medio Luria a 37 °C y con agitación (200 rpm) toda la noche.
- 2) Se agregan 0.1 ml de este cultivo a 25 ml de Luria. Se incuba a 37 °C con agitación hasta que el cultivo alcance la fase logarítmica tardía (OD 595 = 0.6).
- 3) Se inoculan los 25 ml a 500 ml de medio M9 preincubado a 37°C y se incuba 2.5 hrs con agitación. La OD 595 debe ser aproximadamente de 0.4.
- 4) Se añaden 170 µg/ml de cloramfenicol o 300 µg/ml de espectinomicina para amplificar el plásmido.
- 5) Se incuba a 37°C por 12 a 14 hrs con agitación.
- 6) Se centrifugan las células a 5,520 g por 10 min.
- 7) Se lavan las células con 100 ml. de STE frío (NaCl 0.1 M, TRIS-HCL 10 mM pH 7.8 y EDTA 1 mM).
- 8) Se resuspenden las células en 10 ml de la solución I y se añaden 5 mg/ml de lisozima.

Solución I

glucosa	50 mM
TRIS-HCL	25 mM pH 8
EDTA	10 mM

9) Se transfiere a un tubo de ultracentrifuga y se incuba 5 min a temperatura ambiente.

10) Se añaden 20 ml de solución II recién preparada y a 0 °C. Se tapa el tubo y se mezcla su contenido por inversión repetida. Se incuba 10 min en hielo.

Solución II

NaOH	0.2 N
SDS	1.0 %

11) Se añaden 15 ml de una solución 5 M de acetato de potasio fría preparada de la siguiente manera: a 60 ml de acetato de potasio 5 M se añaden 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de agua. La solución resultante es 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato. Se tapa el tubo y se mezcla por inversión violenta. Se incuba 10 min en hielo.

12) Se centrifuga a 48,400 g, 20 min a 4 °C.

13) Se transfieren cantidades iguales de sobrenadante a 2 tubos Corex de 30 ml.

14) Se añaden 0.6 volúmenes de isopropanol a cada tubo. Se mezcla bien y se incuba 15 min a temperatura ambiente.

15) Se centrifuga a 17,400 g por 30 min a temperatura ambiente.

16) Se descarta el sobrenadante. Se lava el botón (sedimento) con etanol al 70% a temperatura ambiente. Se elimina el etanol y se seca el botón con vacío.

17) Se disuelve el ADN en TE pH 8 (TRIS-HCL 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8) a una concentración de por lo menos 100 µg/ml.

18) Se añade ARNasa libre de ADNasa a una concentración final de 19 µg/ml. Se incuba 1 hr a temperatura ambiente.

19) Se prepara un tubo de ultracentrifuga que contenga 4 ml de NaCl 1 M disuelto en TE. Se pone la solución de ADN sobre la solución de NaCl. Se llena el tubo con TE. Se centrifuga 6 hrs a 40 K a 20 °C en ultracentrifuga (rotor SWSO.1). El ADN se sedimenta en el fondo del tubo mientras que el ARN permanece en el sobrenadante.

20) Se descarta el sobrenadante. Se disuelve el botón de ADN en el volumen deseado de TE.

21) Se mide el volumen de la solución de ADN. Por cada ml añadir 1 g de CsCl sólido. Se mezcla en tubos especiales para ultracentrifuga hasta que la sal se disuelva.

- 22) Se añaden 0,8 ml de solución de yoduro de propidio (10 mg/ml) por cada 10 ml de solución de CsCl. Se mezcla por inversión repetida.
- 23) Se ultracentrifuga a 38 K 20 hrs a 20 °C en un rotor Beckman SW50.1.
- 24) Deben verse 2 bandas de ADN en luz ordinaria. La superior consiste en ADN cromosomal lineal y ADN de plásmido circular abierto; la banda inferior consiste en ADN de plásmido circular cerrado y superenrollado.
- 25) Se colecta la banda inferior haciendo un orificio en el fondo del tubo y controlando el goteo.
- 26) El líquido colectado se diluye 1:1 con buffer Dowex (NaCl 1 M, TRIS-HCL 50 mM, EDTA 1 mM) y se pasa dos veces por una columna de resina Dowex AG 50W-X8 para eliminar el yoduro de propidio.
- 27) Posteriormente, el líquido se dializa haciendo 3 cambios de 1,000 volúmenes de buffer TE y se precipita con 1/25 de volumen de NaCl 5 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, congelando en hielo seco.
- 28) Se centrifuga a 12,100 g una hora. Se elimina el etanol y se seca al vacío.
- 29) Se resuspende en 0.5 a 1 ml de agua bidestilada estéril y se mide la DO para determinar la concentración de ADN.

II. Transformación de una cepa de *Escherichia coli*.

Este método se llevó a cabo según el método descrito por Cohen et al. (1972) con algunas modificaciones:

- 1) Se centrifugan 30 ml de cultivo de la cepa que se desea transformar a $DO_{595} = 0.4$ en crecimiento exponencial en medio Luria a 5,110 g 10 min y se lava el botón con 15 ml de NaCl 10 mM frío.
- 2) Se resuspende el sedimento en 15 ml de $CaCl_2$ 30 mM frío y se mantiene en hielo durante 20 min.
- 3) Se centrifugan las células 10 min a 5,110 g y se resuspenden en 2 ml de la misma solución de $CaCl_2$.
- 4) Inmediatamente se agregan 0.2 ml de esta suspensión a un tubo que contenga 0.1 μ g de ADN del plásmido por transformar en 0.1 ml de $CaCl_2$ frío.
- 5) Se mezcla suavemente y se mantiene el tubo 60 min a 0 °C.
- 6) Se da a las células un choque térmico a 42 °C durante 70 segundos e inmediatamente se pasan a 0 °C durante 5 min.
- 7) Se agregan 3 ml de Luria y se incuba a 37 °C con agitación durante 2 hrs.
- 8) Se inoculan de 0.1 a 0.2 ml del cultivo transformado en cajas de

Petri con medio Luria sólido con el antibiótico necesario para la selección de las colonias transformantes.

- 9) Se incuban las cajas a 37 °C durante 16 hrs al menos.

III. Microensayo de ADN de plásmido.

Se utilizó el método de lisis alcalina descrito por Maniatis et al. (1982).

- 1) Se inoculan 3 ml de medio Luria que contiene el antibiótico adecuado con una colonia bacteriana aislada. Se incuba a 37 °C toda la noche con agitación (200 rpm).

- 2) Se centrifugan 1.5 ml del cultivo 2.5 min a 12 K en una microfuga. Se guarda el resto del cultivo en refrigeración.

- 3) Se decanta el medio dejando el botón de bacterias lo más seco posible.

- 4) Se resuspende el botón en 100 µl de la solución I fría (ver I-8). En este caso se le añaden 4 µg/ml de lisozima en polvo antes de usarla.

- 5) Se incuba 5 min a temperatura ambiente. El tubo debe estar abierto durante este período.

- 6) Se añaden 200 µl de solución II fría y recién preparada (ver I-10). Se tapa el tubo y se mezcla el contenido por inversión rápida dos o tres veces suavemente. Se incuba 5 min en hielo.

- 7) Se añaden 150 µl de solución III (ver I-11). Se tapa el tubo y se agita ligeramente en posición invertida durante 10 segundos. Se incuba en hielo.

- 8) Se centrifuga a 12 K durante 5 min a 4 °C.

- 9) Se pasa el sobrenadante a un tubo nuevo.

- 10) Se añade un volumen igual de fenol y otro de cloroformo. Se mezcla bien en Vortex. Se centrifuga 2 min a 12 K y se pasa el sobrenadante a un tubo nuevo con cuidado de no arrastrar fenol.

- 11) Se añaden 2.5 volúmenes de etanol a temperatura ambiente. Se mezcla bien. Se incuba 2 min a temperatura ambiente.

- 12) Se centrifuga 5 min a 12 K a temperatura ambiente.

- 13) Se decanta el sobrenadante y se añade 1 ml de etanol al 70% a temperatura ambiente. Se mezcla bien y se incuba 2 min a la misma temperatura.

- 14) Se descarta el sobrenadante y se seca el botón en un desecador al vacío.

- 15) Se resuspende el botón de ADN de plásmido seco en 20 µl de agua

bidestilada y filtrada.

16) Se lleva a cabo la digestión con la enzima de restricción adecuada y se corre en un gel de agarosa o acrilamida según sea el caso (ver IV).

IV. Electroforesis de ADN en Geles de Agarosa y Acrilamida.

La electroforesis se llevó a cabo conforme a las condiciones descritas por Bolivar et al. (1977):

1) Se disuelve por ebullición agarosa en polvo al 1% durante 1 min en una solución TRIS-Boratos-EDTA (TRISbase 90 mM, EDTA 2.5 mM y H_3BO_3 90 mM, pH 8.2).

2) Se sellan las uniones de placas y separadores con agarosa. Se vacía la agarosa o acrilamida según el tipo de gel y se deja solidificar.

3) Las muestras, en un volumen final de 15 a 39 μ l por carril (0.3 a 1 μ g de ADN por carril) se disuelven en 6 μ l de mezcla de parado "SM" (para 10 ml: 6 g de urea, 1 ml de azul de bromofenol al 0.5% en agua y 1 ml de xilencianol al 0.5% en agua) y se colocan con cuidado en los carriles del gel ya montado en una cámara de electroforesis con buffer TRIS-Boratos-EDTA.

4) Las electroforesis se realizan a 150 V para geles de agarosa y a 200 V para geles de acrilamida durante aproximadamente 60 min.

5) Una vez transcurrido este tiempo, el gel se saca y se sumerge en una solución de bromuro de etidio (4 mg/ml) durante 1 a 5 min y se coloca sobre un transiluminador de luz ultravioleta. El ADN se observa como bandas fluorescentes.

Los geles de acrilamida para ADN se usan para fragmentos menores de 1,000 pb y se preparan de la siguiente manera:

1) Se mezclan 3 ml de buffer TRIS-Boratos-EDTA 10X, 19.4 ml de agua, 7.5 ml de una solución de acrilamida-bisacrilamida (29.2% y 0.8% respectivamente), 140 μ l de persulfato de amonio al 10% y 14 μ l de TEMED.

2) Se mezcla bien la solución y se vacía rápidamente en las placas de vidrio.

3) Se deja polimerizar de 15 a 20 min a temperatura ambiente o bien, de 5 a 10 min a 65 °C.

Para tomar fotografías de los geles, se utiliza un filtro de gelatina amarillo #9 Kodak-Wratten y película Kodak Royal Pancromática (10.2 X 12.7 cms).

V. Electroelución de Fragmentos de ADN en Geles.

1) El ADN digerido con la endonucleasa de restricción correspondiente se somete a electroforesis en gel de agarosa o acrilamida según sea el caso. Una vez identificada la banda de ADN que se desea purificar, se corta del gel con un bisturí y se coloca en una cámara de electroelución (en fragmentos

de 0.5 cms² aproximadamente) sumergidos en buffer TE.

2) Se establece un puente de corriente eléctrica entre dos cámaras utilizando buffer TEA:

Buffer TEA (2X)

TRIS-base	193.6 g
NaOAc anhidro	65.6 g
Na ₂ EDTA	29.6 g

Se ajusta el pH a 8.1 utilizando ácido acético y se lleva a un volumen final de 4 l con agua. Para utilizarlo se diluye al 50%.

3) Se mantiene un voltaje de 100 V durante 3 hrs a 4 °C.

4) Se invierte la corriente durante 30 segundos para que el ADN adherido a las membranas de la cámara de electroelución se separe.

5) El ADN electroeluido se recupera directamente de la cámara en el amortiguador TE.

6) Para concentrar y limpiar el ADN electroeluido se pasa por una columna de Servacel (ver VI).

Con el fin de asegurarse que todo el ADN ha sido electroeluido del gel, un fragmento de este se tinte con bromuro de etidio y se observa con luz UV. Si no se observa fluorescencia significa que todo el ADN ha sido electroeluido. De lo contrario, se continúa la electroelución. Las membranas deben revisarse de la misma manera y en caso de que todavía tengan ADN adherido deberán someterse a corriente invertida una vez más.

VI. Columnas de Servacel (Benzoyl-Naphtoyl DEAE Celulosa).

Las columnas de Servacel tienen como función concentrar y limpiar el ADN en solución, principalmente cuando este proviene de una electroelución.

1) La resina se hidrata en buffer de lavado.

Buffer de lavado

TRIS-HCL	10 mM pH 7.5
NaCl	10 mM

2) Se monta una columna de 0.5 cm de diámetro y 10 cm de alto.

3) Se empaca la columna con 0.5 a 1.0 cm de resina y se lava con 10 ml de buffer de lavado.

4) Se pasa la muestra electroeluida sin diluir por la columna. El ADN debe estar resuspendido en buffer TE.

5) Se lava la columna con dos volúmenes de buffer de lavado.

6) Para eluir el ADN que está unido a la resina se pasan 500 μ l de buffer de elución.

Buffer de elución

TRIS-HCL 1 mM pH 8
NaCl 1 mM
etanol 15 %

7) Se agregan dos volúmenes de etanol a -20°C para precipitar el ADN y se congela en hielo seco o se deja por lo menos 3 hrs a -20°C .

8) Se centrifuga 10 min a 12 K en una microfuga y se elimina el sobrenadante.

9) Se lava el botón con etanol al 70% y se vuelve a centrifugar y a tirar el sobrenadante.

10) Se seca el botón al vacío y se resuspende en un volumen pequeño de agua bidestilada y estéril.

11) La resina debe guardarse hasta estar seguro de que el ADN fué eluído.

NOTA: Una vez hidratada la resina debe guardarse en refrigeración.

VII. Purificación de Fragmentos de ADN en Agarosa de Bajo Punto de Fusión.

1) La electroforesis del ADN digerido por la endonucleasa de restricción adecuada se lleva a cabo por el procedimiento normal, a excepción del tipo de agarosa. Esta debe ser de bajo punto de fusión y debe ir al 1% si el fragmento es mayor de 500 pb o al 2% si es menor a este tamaño.

2) El gel se tinte con bromuro de etidio y se observa con luz UV.

3) Una vez identificada la banda de ADN que se desea purificar, se corta del gel con un bisturí y se coloca en un tubo eppendorf de 1.5 ml.

4) Se funde la agarosa que contiene el fragmento a 65°C en un baño María durante 3 a 5 min.

5) Inmediatamente se agrega un volumen de fenol saturado en agua a temperatura ambiente y se agita muy bien en un Vortex durante 1 min.

6) Se centrifuga a 12 K en un microfuga durante 2 minutos para separar la fase de fenol.

7) Se pasa el sobrenadante a otro tubo con cuidado de no arrastrar el fenol.

8) Se precipita el fragmento con 1/10 de NaOAc 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto congelando en hielo seco de 5 a 10 min.

9) Se centrifuga a 12 K, 8 min y se tira el sobrenadante.

10) Se lava el botón de ADN con etanol al 70%, se centrifuga una vez más y se tira el sobrenadante.

11) Se seca el botón de ADN al vacío y se resuspende en un volumen pequeño de agua bidestilada y filtrada.

VIII. Lisis de Células Bacterianas por Sonicación.

La lisis de las células se realizó mediante sonicación en un aparato Soniprep modelo 150. El procedimiento es el siguiente:

1) Las células se lavan con 1 ml de NaCl 10 mM y se resuspenden en 600 µl de buffer de sonicado:

Buffer de Sonicado

TRIS-HCl	50 mM pH 7.6
β-mercaptoetanol	10 mM

- 2) La suspensión, en un tubo eppendorf se coloca en hielo para evitar que la muestra se caliente en exceso por el sonicado.
- 3) Se dan de 3 a 5 pulsos de 25 segundos cada uno utilizando la máxima potencia del aparato hasta que la suspensión de células se aclare.
- 4) Se centrifugan las muestras sonicadas a 12 K durante 15 min a 4 °C.
- 5) Se pasan los sobrenadantes a tubos nuevos.

La temperatura debe mantenerse por debajo de 10 °C para evitar la desnaturalización de las proteínas. A partir de ese momento, el sonicado debe mantenerse a 4 °C.

IX. Cuantificación de Actividad de la Enzima GDH.

La cuantificación de la actividad de GDH se llevó a cabo según la técnica descrita por Covarrubias et al. (1980).

La mezcla de reacción para GDH contiene:

TRIS-HCL 0.1 M pH 7.6	25.0 ml
NH ₄ Cl 1 M	1.0 ml
α-cetoglutarato 0.2 M pH 7.6 en TRIS-HCL 0.1 pH 7.6	1.5 ml

Las mezclas control para registrar actividad basal ajena a GDH son los siguientes:

Sin α-cetoglutarato:

TRIS-HCL 0.1 M pH 7.6	25.0 ml
NH ₄ Cl 1 M	1.0 ml
H ₂ O	1.5 ml

Sin NH_4Cl :

TRIS-HCL 0.1 M pH 7.6	25.0 ml
H ₂ O	1.0 ml
α -cetoglutarato 0.2 M pH 7.6 en TRIS-HCL 0.1 M pH 7.6	1.5 ml

Todas las soluciones deben mantenerse en frío.

- 1) Las lecturas se llevan a cabo en un espectrofotómetro Beckman DU 8 a 340 nm utilizando la mezcla de reacción completa como blanco.
- 2) Se mezclan directamente en las celdas: 935 μl de coctel completo, 25 μl de extracto celular (sonicado) y 40 μl de NADPH (6 mg/ml en TRIS-HCL 0.1 M pH 7.6) recién preparado.
- 3) Se lee la disminución de absorbancia (i.e. oxidación de NADPH vs. tiempo).
- 4) Se repite el procedimiento con las mezclas de control (sin α -cetoglutarato y sin NH_4Cl).
- 5) Una vez descartada la actividad basal (en caso de haberla) se procede a leer las muestras de extracto celular utilizando la mezcla completa y reemplazando el NADPH con H_2O en el blanco.

X. Cuantificación de Proteínas por el Método de Bradford.
(Bradford, 1976).

El reactivo de Bradford contiene (para 1 lt):

azul brillante Coomassie G-250	100 mg
etanol al 95%	50 ml
ácido fosfórico al 85% (w/v)	100 ml
H_2O bidestilada	850 ml

Para la curva patrón:

- 1) Se preparan soluciones de albúmina bovina de 0.25, 0.50, 0.75 y 1.0 mg/ml.
- 2) A 2.5 ml de reactivo se agregan de 50 o 100 μl de cada una de las soluciones control y se deja desarrollar la reacción durante 2 min.
- 3) Se lee la absorbancia de la reacción a 595 nm en un espectrofotómetro.
- 4) Se grafican los resultados como absorbancia vs concentración de las soluciones control y se calcula la pendiente de la recta.

Para las muestras de los extractos a leer:

- 1) A 2.5 ml de reactivo se agregan de 50 o 100 μ l de extracto celular (sonicado) y se deja desarrollar la reacción durante dos min.
- 2) Se lee la absorbancia de las reacciones a 595 nm.

La concentración de proteína en las muestras se puede entonces calcular con base en los parámetros de la curva patrón.

XI. Cuantificación Proporcional de Plásmidos en Geles.

- 1) Se toman alícuotas de los cultivos de las bacterias portadoras de los distintos plásmidos que se desean comparar de tal manera que cada alícuota tenga el mismo número de células aproximadamente. Esto se puede hacer obteniendo los valores de absorbancia de cada cultivo en un espectrofotómetro y ajustando así los volúmenes de las respectivas alícuotas.
- 2) Se mezclan los volúmenes de los distintos cultivos en cuestión, en este caso 4 cultivos, cada uno con un plásmido diferente, en un solo tubo.
- 3) Se purifica el ADN de las bacterias ya mezcladas (ver III).
- 4) Una vez purificado, el ADN de los plásmidos se digiere con una enzima de restricción que tenga un sitio único de corte en cada uno de los tres plásmidos, en este caso PstI, de manera que queden linealizados.
- 5) Las muestras ya digeridas se corren en un gel de agarosa al 1% con controles de peso molecular para cada plásmido en carriles adicionales.
- 6) Se toma una fotografía del gel (ver IV).
- 7) Se utiliza el negativo de la fotografía para hacer un barrido densitométrico de los carriles que llevan las muestras utilizando para esto un espectrofotómetro Beckman DU 8.
- 8) Se grafican los resultados del barrido y se calcula el área bajo la curva de los picos que corresponden a cada plásmido. Los resultados finales se dan en porcentajes tomando como 100% el valor de la banda más densa, la cual representa al plásmido más abundante.

NOTA: Estos valores se utilizan para ajustar los valores de actividad de GDH para las cepas portadoras de cada plásmido, por lo que las muestras para este ensayo deben tomarse de los mismos cultivos que se utilizan para determinar las actividades mencionadas.

XII. Ajuste de los Valores de Actividad de GDH.

Los valores de actividad de GDH obtenidos para la cepa PA340 transformada con los distintos plásmidos, fueron ajustados proporcionalmente con base en la abundancia relativa así como el tamaño (en pb) de los mismos. Para ello se tomó como referencia el de mayor tamaño que es el pSAE4 (7,200 pb), siendo el pBB5 de 6,200 pb, y el pBB6 y el pBB6L de 4,200 pb. El ajuste se

llevó a cabo de la siguiente manera:

Plásmido	pb	Designación
pSAE4	7,200	A
pBB5	6,200	B
pBB6	4,200	C
PBB6L	4,200	D

Para el ajuste de la actividad registrada para el pBB5 (B) se realizó el siguiente cálculo:

$$AFB = \frac{\%B}{A/B (\%A)} (AEB)$$

donde,

AFB = Actividad Final de B

%B = Porcentaje de abundancia relativa del plásmido B

A/B = Relación de tamaño (en pb) de los plásmidos A y B

%A = Porcentaje de abundancia relativa del plásmido A

AEB = Actividad Específica de B

Las actividades finales para los plásmidos restantes fueron ajustadas por medio del mismo cálculo sustituyendo los valores correspondientes.

RESULTADOS

Construcción de Mutantes por Deleciones de Secuencias REP.

Stern et al., (1984) con base en sus experimentos con el operón his de S. typhimurium (ver Introducción) propone a las secuencias REP como elementos que podrían tener algún papel en la regulación génica en procariontes.

Para determinar el posible papel de estas secuencias en los niveles del producto del gene gdhA en E. coli se procedió a la construcción de plásmidos portadores de deleciones de una de las dos secuencias REP presentes en la región flanqueadora 3' del gene.

Todos los plásmidos fueron construídos a partir del plásmido pSAE4 (Sánchez-Pescador et al., 1982) el cual lleva clonado el gene gdhA y sus regiones flanqueadoras en el vehículo molecular pBR322 (Bolivar et al., 1977) (Fig. 3).

Se utilizaron dos sitios de restricción únicos para la enzima StuI localizados en la región flanqueadora 3' del gene (posiciones 1375 y 2375 en la secuencia nucleotídica), el primero de los cuales se encuentra en la parte final de la primera secuencia REP del gene. Así mismo se utilizó un sitio único para la enzima NruI localizado en el vehículo molecular a aproximadamente 2,000 pares de bases (pb) del segundo sitio de StuI (Fig. 9).

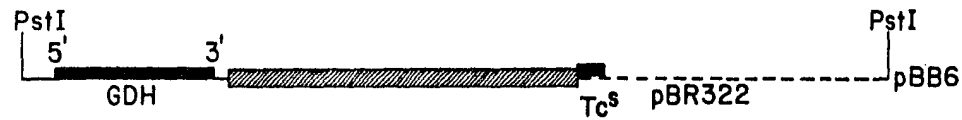
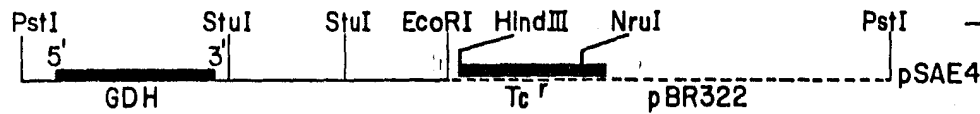
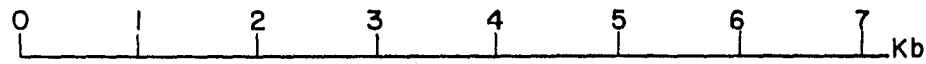
El plásmido pBB5 se construyó con una digestión del pSAE4 con la enzima StuI y ligando sobre sí mismo el fragmento más grande, por lo cual, este plásmido lleva una deleción StuI-StuI que comprende 1,000 pb (Fig. 9a).

El plásmido pBB6 se construyó haciendo una doble digestión StuI-NruI, purificando el fragmento más grande y ligándolo sobre sí mismo de manera que este plásmido lleva una deleción StuI-NruI de aproximadamente 3,000 pb (Fig. 9a).

Por último, el plásmido pBB6L es una modificación del plásmido anterior. Este fué construído debido a que la deleción del plásmido anterior no solamente elimina la segunda secuencia REP del gene, sino que también elimina una pequeña parte, aunque muy conservada de la primera secuencia que aparentemente le confiere direccionalidad (ver pie de Figura 7). Debido a esto se pensó que este hecho podría afectar de alguna manera el posible reconocimiento de esta estructura o su direccionalidad con respecto al gene proximal. Por lo tanto, se digirió el pSAE4 con StuI y NruI y se purificó el fragmento más grande. Este se ligó sobre sí mismo, esta vez en presencia de un adaptador para la enzima EcoRI, que consiste en un decámero con la secuencia CCGAATTCGG, y contiene un sitio de restricción para dicha enzima. Clonando este adaptador en el fragmento purificado se reconstituiría la secuencia CC en el extremo 3' de la primera secuencia REP a diferencia de la secuencia CG en el plásmido pBB6 (Fig. 10). La primera C constituiría, apareada con la G correspondiente en la secuencia palindrómica, la base del tallo de la posible estructura secundaria. La segunda C constituiría la primera base de la secuencia terminal

(a)

(b)



CCGAATTCGG

ADAPTADOR DE
EcoRI

ACTIVIDAD DE GDH (%)			
CONDICIONES DE CULTIVO			
NH ₄ Cl 15mM + Glucosa 11 mM.	NH ₄ Cl 1mM + Glucosa 11mM.	NH ₄ Cl 15mM + Glicerol 22mM.	NH ₄ Cl 1mM + Glicerol 22mM.

100.0	100.0	100.0	100.0
-------	-------	-------	-------

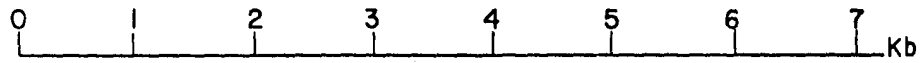
52.2	52.1	47.7	55.7
------	------	------	------

55.7	70.0	70.0	53.0
------	------	------	------

66	71	71.6	63.6
----	----	------	------

(a)

(b)



ACTIVIDAD DE GDH (%)

CONDICIONES DE CULTIVO



NH ₄ Cl 15mM + Glucosa 11 mM.	NH ₄ Cl 1mM + Glucosa 11mM.	NH ₄ Cl 15mM + Glicerol 22 mM.	NH ₄ Cl 1mM + Glicerol 22 mM.
---	---	--	---

100.0	100.0	100.0	100.0
-------	-------	-------	-------



52.2	52.1	47.7	55.7
------	------	------	------



55.7	70.0	70.0	53.0
------	------	------	------



66	71	71.6	63.6
----	----	------	------

CCGAATTCGG

ADAPTADOR DE
EcoRI

FIGURA 10. Diagrama detallado de las manipulaciones efectuadas en el extremo 3' de la primera secuencia REP del gene gdhA. A) Manipulaciones efectuadas en el plásmido pSAE4 que dieron origen al plásmido pBB5. Se digirió al plásmido con StuI. Posteriormente se ligó sobre sí mismo el fragmento más grande de los dos resultantes. B) Manipulaciones efectuadas en el mismo plásmido que dieron origen al plásmido pBB6. Se digirió el plásmido pSAE4 con las enzimas StuI y NruI. Posteriormente se ligó sobre sí mismo el fragmento más grande de los resultantes. C) Manipulaciones efectuadas en el mismo plásmido que dieron origen al plásmido pBB6L. Se siguió el mismo protocolo del plásmido pBB6 excepto que se puso a ligar el fragmento más grande esta vez en presencia de una molécula adaptadora de EcoRI.

RESULTADOS

Construcción de Mutantes por Deleciones de Secuencias REP.

Stern et al., (1984) con base en sus experimentos con el operón his de S. typhimurium (ver Introducción) propone a las secuencias REP como elementos que podrían tener algún papel en la regulación génica en procariontes.

Para determinar el posible papel de estas secuencias en los niveles del producto del gene gdhA en E. coli se procedió a la construcción de plásmidos portadores de deleciones de una de las dos secuencias REP presentes en la región flanqueadora 3' del gene.

Todos los plásmidos fueron contruidos a partir del plásmido pSAE4 (Sánchez-Pescador et al., 1982) el cual lleva clonado el gene gdhA y sus regiones flanqueadoras en el vehículo molecular pBR322 (Bolivar et al., 1977) (Fig. 3).

Se utilizaron dos sitios de restricción únicos para la enzima StuI localizados en la región flanqueadora 3' del gene (posiciones 1375 y 2375 en la secuencia nucleotídica), el primero de los cuales se encuentra en la parte final de la primera secuencia REP del gene. Así mismo se utilizó un sitio único para la enzima NruI localizado en el vehículo molecular a aproximadamente 2,000 pares de bases (pb) del segundo sitio de StuI (Fig. 9).

El plásmido pBB5 se construyó con una digestión del pSAE4 con la enzima StuI y ligando sobre sí mismo el fragmento más grande, por lo cual, este plásmido lleva una deleción StuI-StuI que comprende 1,000 pb (Fig. 9a).

El plásmido pBB6 se construyó haciendo una doble digestión StuI-NruI, purificando el fragmento más grande y ligándolo sobre sí mismo de manera que este plásmido lleva una deleción StuI-NruI de aproximadamente 3,000 pb (Fig. 9a).

Por último, el plásmido pBB6L es una modificación del plásmido anterior. Este fué construido debido a que la deleción del plásmido anterior no solamente elimina la segunda secuencia REP del gene, sino que también elimina una pequeña parte, aunque muy conservada de la primera secuencia que aparentemente le confiere direccionalidad (ver pie de Figura 7). Debido a esto se pensó que este hecho podría afectar de alguna manera el posible reconocimiento de esta estructura o su direccionalidad con respecto al gene proximal. Por lo tanto, se digirió el pSAE4 con StuI y NruI y se purificó el fragmento más grande. Este se ligó sobre sí mismo, esta vez en presencia de un adaptador para la enzima EcoRI, que consiste en un decámero con la secuencia CCGAATTCGG, y contiene un sitio de restricción para dicha enzima. Clonando este adaptador en el fragmento purificado se reconstituiría la secuencia CC en el extremo 3' de la primera secuencia REP a diferencia de la secuencia CG en el plásmido pBB6 (Fig. 10). La primera C constituiría, apareada con la G correspondiente en la secuencia palindrómica, la base del tallo de la posible estructura secundaria. La segunda C constituiría la primera base de la secuencia terminal

FIGURA 9. (a) Mapas físicos de los plásmidos pSAE4, pBB5, pBB6 y pBB6L linealizados a partir del sitio de restricción de Pst I. Las líneas punteadas representan el vector pBR322, las líneas continuas representan insertos cromosomales de E. coli y las barras gruesas indican la localización de los genes gdhA y de resistencia a tetraciclina (Tc^r). Las áreas sombreadas indican deleciones. En el mapa del plásmido pBB6L se indica la posición de la inserción de la molécula adaptadora de Eco RI.

(b) Actividad de la enzima GDH bajo diferentes condiciones metabólicas de cultivo en la cepa PA340 transformada con cada uno de los plásmidos mencionados. Se observó que los valores absolutos de actividad de GDH variaban ligeramente de día a día. Sin embargo los valores relativos correspondientes a cepas ensayadas el mismo día son constantes. Por lo tanto, los valores de actividad se expresan como porcentajes relativos.

Enzima de Restricción

StuI

NruI

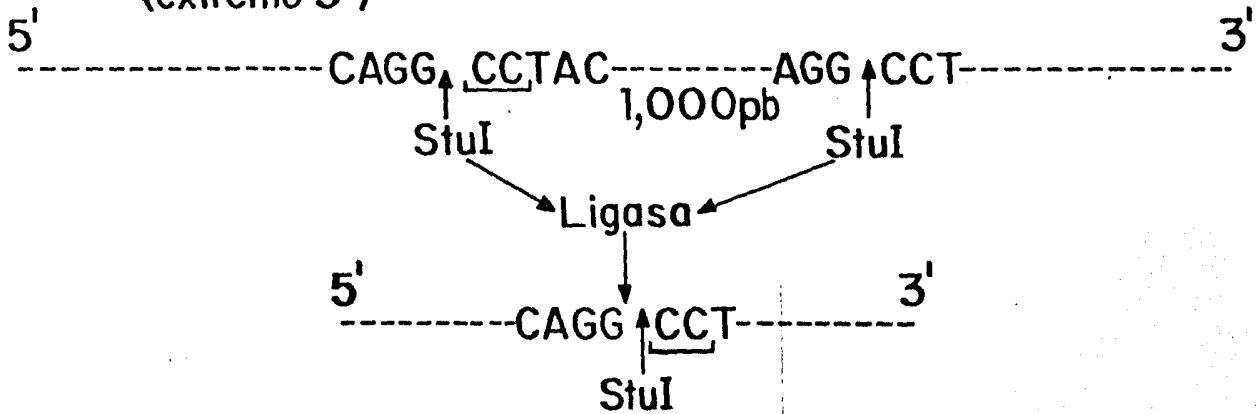
Sitio de Corte

AGG CCT

TCG CGA

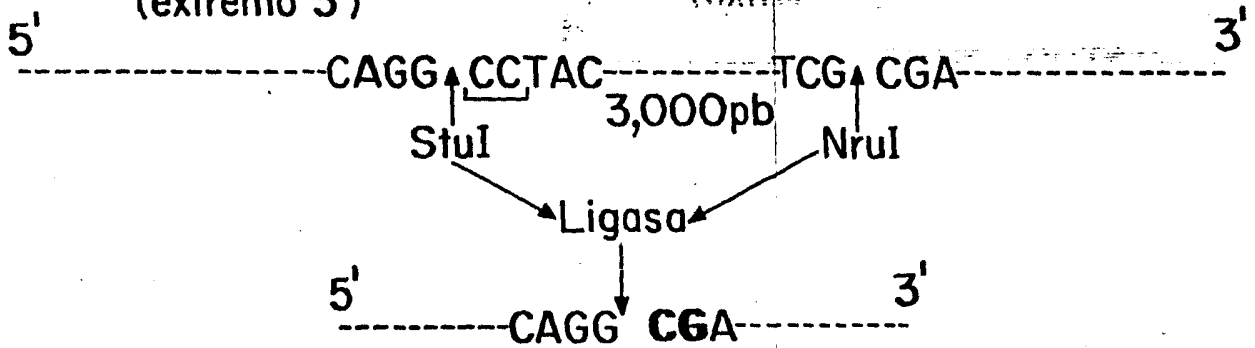
A) 1a. Secuencia REP

(extremo 3')



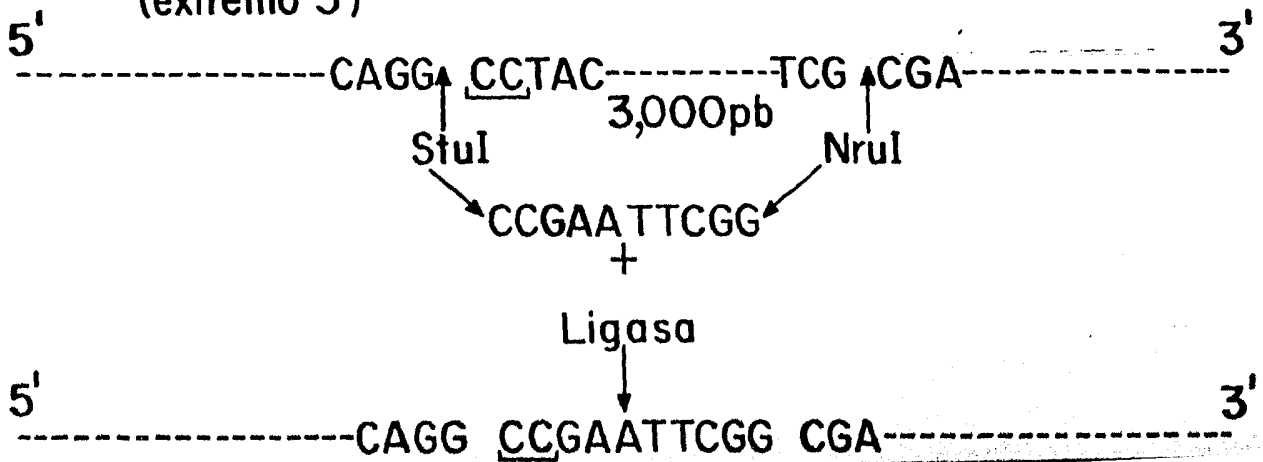
B) 1a. Secuencia REP

(extremo 3')



C) 1a. Secuencia REP

(extremo 3')



CUAC de la secuencia REP. Es esta secuencia, Junto con la que forma parte de una burbuja dentro del tallo de la estructura la que aparentemente le confiere direccionalidad con respecto al gene proximal (Figs. 7 y 8).

Transformación de Plásmidos y Selección de Clonas.

Los plásmidos se transformaron en la cepa PA340 y las colonias resultantes fueron seleccionadas de la siguiente manera:

El plásmido pBB5 lleva el gene que codifica para resistencia a tetraciclina por lo que su selección se llevó a cabo inoculando las células resultantes de su transformación en cajas de medio Luria con este antibiótico, de tal manera que sólo crecerían las colonias que portaran el plásmido.

Los plásmidos pBB6 y pBB6L no presentan resistencia a tetraciclina ya que el gene que codifica para dicha resistencia esta comprendido en la deleción que llevan . Por lo tanto las células resultantes fueron seleccionadas en cajas con medio mínimo carente de glutámico y con estreptomycin. Dado que la cepa PA340 es resistente a este antibiótico, pero no puede por sí sola crecer en ausencia de glutámico, ya que su fenotipo es gdh-1, glt B31, sólo crecerían las colonias de esta cepa que portaran los plásmidos que llevan clonado el gene gdhA ya que estos son capaces de complementar la auxotrofia para este aminoácido.

Posteriormente se hicieron microensayos de algunas de las colonias seleccionadas y se digirieron los ADNs correspondientes con las enzimas adecuadas: StuI para el pBB5, PstI para el pBB6 y Eco RI para el pBB6L.

Tomando en cuenta que el plásmido original (pSAE4) comprende 7,200 pb se esperaba, en el primer caso un plásmido con un solo sitio para StuI, y por lo tanto lineal, de 6,200 pb ya que la deleción StuI-Stu-I es de 1,000 pb.

En el segundo caso se esperaba un plásmido de aproximadamente 4,200 pb ya que la deleción StuI-NruI comprende unos 3,000 pb. La razón por la cual se utilizó la enzima PstI se debe a que después de la manipulación enzimática, los sitios de restricción de StuI y NruI no se regeneran como en el caso de la deleción StuI-StuI en la cual se regenera un sitio de restricción para esta enzima. Dado esto, se procedió a utilizar una enzima de sitio único en el plásmido con el único fin de linealizarlo y apreciar claramente su tamaño en el gel.

Por último, para el pBB6L se esperaba un plásmido de igual tamaño que en el caso anterior de aproximadamente 4,200 pb, pero que presentara un sitio único para la enzima Eco RI. El pSAE4 originalmente presenta un sitio único para esta enzima, sin embargo este queda eliminado ya que se encuentra en la deleción efectuada en este plásmido. Por lo tanto la presencia de este sitio de restricción en el pBB6L implica que este está siendo aportado por la molécula adaptadora de Eco RI (Fig. 11).

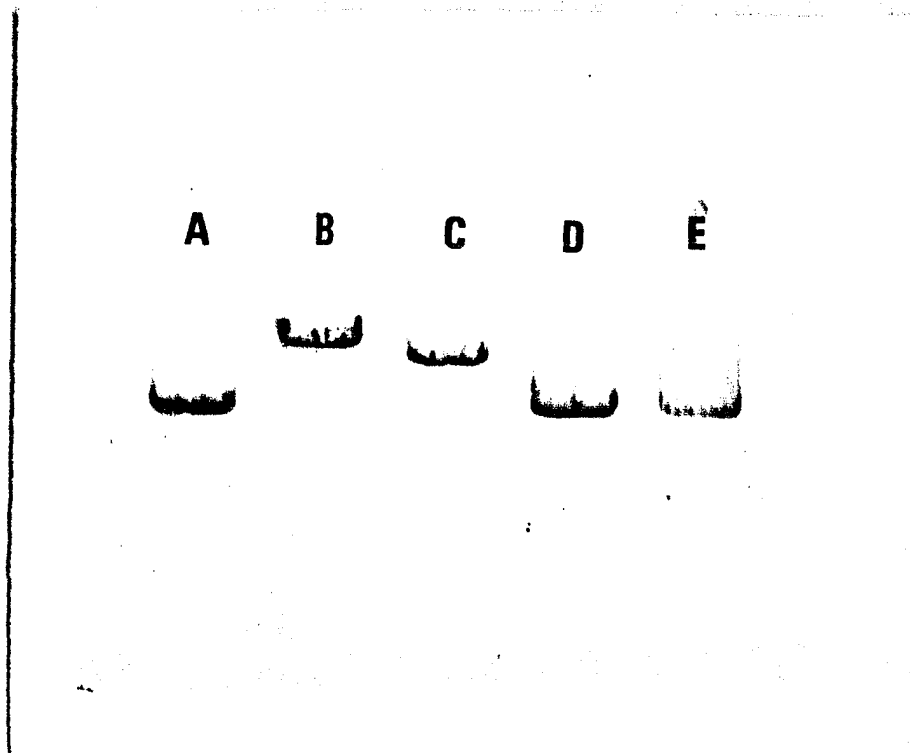


FIGURA 11. Fotografía de un gel de agarosa al 1% que muestra los siguientes plásmidos: A. Control de peso molecular de 4,200 pb, (plásmido pSAE 422). B. Plásmido pSAE4 digerido con Eco RI (7,200 pb). C. Plásmido pBB5 digerido con StuI (6,200 pb). D. Plásmido pBB6 digerido con PstI (4,200 pb). E. Plásmido pBB6L digerido con Eco RI (4,200 pb).

Condiciones Metabólicas de Crecimiento Bacteriano.

La cepa PA340 que contiene los plásmidos pSAE4, pBB5, pBB6 y pBB6L se cultivó en medio mínimo sin glutámico, como presión selectiva para los plásmidos, variando las condiciones de fuentes de nitrógeno y carbono según se muestra en la Tabla V.

Tabla V.

Medio	Fuente de Nitrógeno	Fuente de Carbono
1	NH ₄ Cl 15 mM	Glucosa 11 mM
2	NH ₄ Cl 15 mM	Glicerol 22 mM
3	NH ₄ Cl 1 mM	Glucosa 11 mM
4	NH ₄ Cl 1 mM	Glicerol 22 mM

Medición de Actividad de GDH.

La actividad de la enzima GDH se midió según se especifica en Métodos, utilizando como control la cepa CS520, silvestre para el gene gdhA. De esta manera, se verificó que la relación entre las actividades de la enzima en las diferentes condiciones metabólicas se mantiene tanto en la cepa silvestre como en la mutante transformada con los distintos plásmidos.

Se encontró que los valores absolutos de actividad varían un tanto de experimento a experimento. Sin embargo, los valores relativos obtenidos en cada experimento son constantes. Por lo tanto la Figura 9b presenta los resultados obtenidos en valores porcentuales.

Cuantificación de Plásmido en Geles.

La cuantificación de plásmido se llevó a cabo a partir de los cultivos que se utilizaron para medir la actividad de la enzima, por medio de un barrido densitométrico de los negativos de los geles. Para ello se utilizó un espectrofotómetro Beckman DU 8. La figura 12 presenta los resultados obtenidos para una de las muestras.

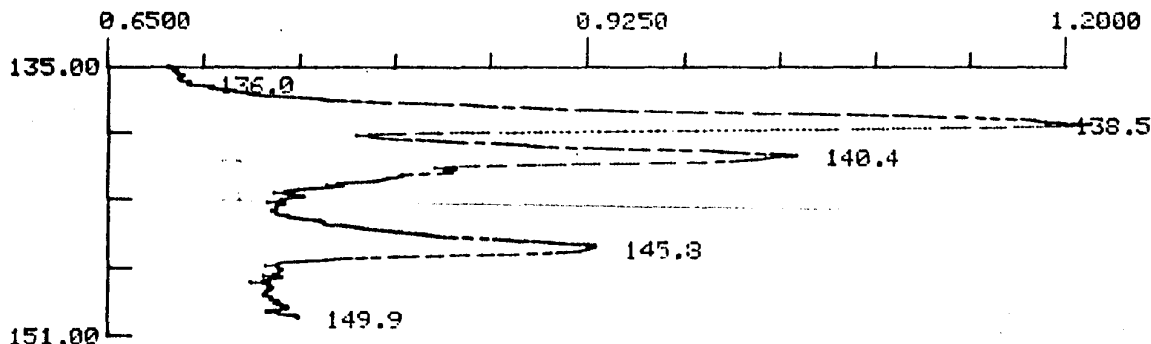
Los valores obtenidos de esta cuantificación fueron utilizados para ajustar la actividad enzimática de GDH de acuerdo a la abundancia relativa de los diferentes plásmidos en la cepa PA340 cultivada bajo las condiciones metabólicas descritas anteriormente. Este ajuste se llevó a cabo según se describe en Métodos.

218

BECKMAN INSTRUMENTS INC., IRVINE, CALIFORNIA U.S.A.

6. 590491

SELECT AREA CALC MIN PEAK 0.60 SENSITIVITY 7



PEAK #	PEAK MM	ABS	RESULT
1	136.0	0.697	P
	138.3	1.184	S
2	138.5	1.216	P*
	139.2	0.800	U
3	140.4	1.045	P*
	141.1	0.845	U
	142.1	0.783	U
	142.6	0.753	U
	143.2	0.748	U
4	145.8	0.931	P*
	146.8	0.747	U
	147.4	0.746	U
	147.8	0.739	U
5	149.9	0.760	P

BACKGROUND LINE:
 START 136.2 MM 0.750 A
 END 146.8 MM 0.750 A

PEAK MM	AREA	% AREA	START MM	END MM
138.5	0.5502	49.81	136.2	139.2
140.4	0.3341	30.25	139.2	141.1
145.8	0.2202	19.93	143.2	146.8

Condiciones Metabólicas de Crecimiento Bacteriano.

La cepa PA340 que contiene los plásmidos pSAE4, pBB5, pBB6 y pBB6L se cultivó en medio mínimo sin glutámico, como presión selectiva para los plásmidos, variando las condiciones de fuentes de nitrógeno y carbono según se muestra en la Tabla V.

Tabla V.

Medio	Fuente de Nitrógeno	Fuente de Carbono
1	NH ₄ Cl 15 mM	Glucosa 11 mM
2	NH ₄ Cl 15 mM	Glicerol 22 mM
3	NH ₄ Cl 1 mM	Glucosa 11 mM
4	NH ₄ Cl 1 mM	Glicerol 22 mM

Medición de Actividad de GDH.

La actividad de la enzima GDH se midió según se especifica en Métodos, utilizando como control la cepa CS520, silvestre para el gene *gdhA*. De esta manera, se verificó que la relación entre las actividades de la enzima en las diferentes condiciones metabólicas se mantiene tanto en la cepa silvestre como en la mutante transformada con los distintos plásmidos.

Se encontró que los valores absolutos de actividad varían un tanto de experimento a experimento. Sin embargo, los valores relativos obtenidos en cada experimento son constantes. Por lo tanto la Figura 9b presenta los resultados obtenidos en valores porcentuales.

Cuantificación de Plásmido en Geles.

La cuantificación de plásmido se llevó a cabo a partir de los cultivos que se utilizaron para medir la actividad de la enzima, por medio de un barrido densitométrico de los negativos de los geles. Para ello se utilizó un espectrofotómetro Beckman DU 8. La figura 12 presenta los resultados obtenidos para una de las muestras.

Los valores obtenidos de esta cuantificación fueron utilizados para ajustar la actividad enzimática de GDH de acuerdo a la abundancia relativa de los diferentes plásmidos en la cepa PA340 cultivada bajo las condiciones metabólicas descritas anteriormente. Este ajuste se llevó a cabo según se describe en Métodos.

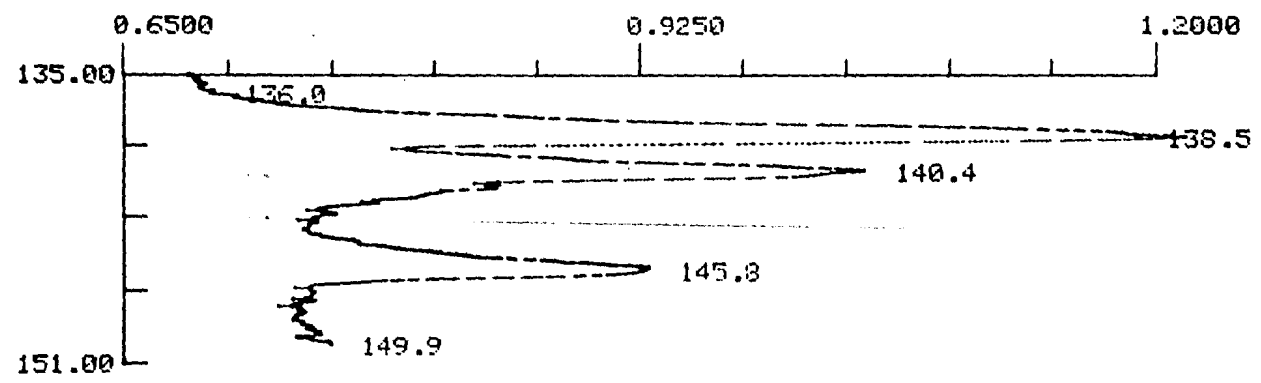
FIGURA 12. Gráfica del barrido densitométrico del carril de un gel que contenía los plásmidos pSAE 4, pBB5 y pBB6, linealizados con la enzima PstI. Se grafica absorbancia a 700 nm vs. cms en el carril a partir del punto de origen de corrimiento de la muestra (ver Metodología). En la parte inferior izquierda, se dan todos los picos (P) y valles (V) que se registran en el negativo del gel, su posición en mm y su absorbancia. A partir de estos datos, se separan los picos y valles correspondientes a las bandas de DNA del gel. En la parte inferior derecha se muestran los datos de estos últimos en términos de posición en mm, área, porcentaje de área relativo y sitios de inicio y término de cada uno de los picos. Los barridos densitométricos se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Beckman DU 8.

218

BECKMAN INSTRUMENTS INC., IRVINE, CALIFORNIA U.S.A.

no. 590491

SELECT AREA CALC MIN PEAK 0.60 SENSITIVITY 7



PEAK #	PEAK MM	ABS	RESULT
1	136.0	0.697	P
	138.3	1.184	S
2	138.5	1.216	P*
	139.2	0.800	U
3	140.4	1.045	P*
	141.1	0.845	U
	142.1	0.783	U
	142.6	0.753	U
	143.2	0.748	U
4	145.8	0.931	P*
	146.8	0.747	U
	147.4	0.746	U
	147.8	0.739	U
5	149.9	0.760	P

BACKGROUND LINE:
 START 136.2 MM 0.750 A
 END 146.8 MM 0.750 A

PEAK MM	AREA	% AREA	START MM	END MM
138.5	0.5502	49.81	136.2	139.2
140.4	0.3341	30.25	139.2	141.1
145.8	0.2202	19.93	143.2	146.8

DISCUSION

La delección de las dos secuencias REP encontradas en el operón his de Salmonella typhimurium, trae como consecuencia una disminución de un 50% en el producto codificado por el gene anterior a estas secuencias (Stern et al., 1984). En el caso del gene gdhA, la delección efectuada comprende solamente una de las dos secuencias REP de la región flanqueadora 3' del gene. Sin embargo, los resultados obtenidos indican que también en este caso se observa una disminución de alrededor de un 50% en la actividad del producto codificado por gdhA independientemente de las condiciones metabólicas, la magnitud de la delección o el número de copias de los distintos plásmidos en la célula.

La delección efectuada en el plásmido pBB5 comprende 1,000 pb dentro de los cuales se encuentra una secuencia que se ha identificado como un posible terminador rho independiente del gene. Este hecho hizo pensar, que al eliminar este terminador, se podría originar un transcrito del gene que fuera inestable y que por lo tanto, la disminución de la actividad de la enzima GDH pudiera deberse a una causa adicional a la delección de la segunda secuencia REP. Debido a esto, la construcción del plásmido pBB6 se efectuó de tal manera que al hacer una delección de 3,000 pb se acercara el extremo flanqueador 3' de gdhA a un terminador que es funcional para el gene que codifica para la resistencia a tetraciclina en el vehículo molecular. Este terminador se encuentra muy cercano al sitio de restricción de NruI que se utilizó para hacer la delección. Los resultados muestran que el efecto de ambas delecciones es el mismo, lo cual indica que las secuencias que siguen a la delección no parecen alterar su efecto. Por otro lado, un análisis de estos resultados indica que las distintas condiciones metabólicas utilizadas no parecen alterar el efecto de los distintos plásmidos en la actividad de GDH.

Como se mencionó en Resultados, la delección efectuada en el plásmido pBB6 comprende 4 pb correspondientes a la primera secuencia REP. Esta secuencia CTAC es aparentemente uno de los factores que le confieren direccionalidad a esta secuencia REP con respecto al gene proximal y a la segunda secuencia REP que se encuentra en dirección contraria. En esta segunda secuencia REP, la secuencia CTAC esta remplazada por la secuencia GTAG. Al digerir con StuI y NruI, y volver a ligar el fragmento más grande estas cuatro bases de la primera secuencia REP quedan modificadas (Fig. 10 B). De hecho, la primera C queda remplazada por una G. Debido a que este hecho pudiera afectar de alguna manera el posible reconocimiento de la estructura o su direccionalidad con respecto al gene proximal, se cambió esta G por la C original através de la clonación de una molécula adaptadora de Eco RI (Fig. 10 C). Los resultados obtenidos indican que la ligera diferencia que los plásmidos pBB6 y pBB6L exhiben en la parte final de la primera secuencia REP no alteran el efecto de la delección. Una vez más, las actividades específicas obtenidas para estos plásmidos no se vieron afectadas por las distintas condiciones metabólicas utilizadas, la magnitud de la delección o el número de copias de los plásmidos en la célula.

Posibles Funciones de las Secuencias REP en la Regulación Génica en Procariontes.

Con el objeto de tratar de dilucidar el posible papel que juegan las secuencias REP en la regulación génica es necesario analizar la información que se tiene acerca de sus características. El análisis detallado de la base de datos GenBank (Becerril et al., 1985), permitió aumentar el número de secuencias halladas de 35 a 51, y el número de unidades transcripcionales en las que se encuentran de 16 a 25 (Ver Tablas II y III. A partir de estos datos fué posible obtener más información.

Por un lado, la secuencia consenso propuesta por Stern, et al. (1984) fué aumentada de 32 a 33 pb y se encontró que las asas de estas estructuras presentan un tamaño restringido que va de 0 a 4 pb en el caso de la secuencia consenso, y de 0 a 6 pb en la secuencia palindrómica correspondiente. Otro dato interesante es que dos de las nueve secuencias nuevas reportadas por nuestro laboratorio se encuentran sobrelapadas con secuencias regulatorias. En el caso de dhuA, la secuencia REP está sobrelapada con el promotor hisJ, mientras que en uvrD, se encuentra entre la región de -10 del promotor y el codón ATG que inicia la secuencia codificadora del gene.

Con base en los datos obtenidos con el operón his de S. typhimurium, Stern et al., (1984) proponen que la función de las secuencias REP a nivel de regulación génica podría estar relacionada con la estabilidad del mensajero. Esta función podría darse de dos maneras: las secuencias REP podrían tener un papel pasivo en el cual las secuencias invertidas sirvieran como bloqueo para una actividad exonucleolítica 3'----->5' en el ARN, o bien podrían alterar la estabilidad del mensajero actuando como sustrato para algún tipo de corte por endonucleasas. Un dato que parecía apoyar esta suposición era el hecho de que estas secuencias solamente habían sido encontradas en regiones intercistrónicas de especies inestables de ARNs, es decir en ARNs mensajeros. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, estas secuencias ya se han encontrado en especies más estables de ARNs.

En los casos de los operones sup BE (gln tARN) y tyr tARN se encontró que ambos presentan dos secuencias REP en sus respectivos extremos flaqueadores 3' (ver Tabla I). Adicionalmente, es de gran interés el hecho de que se hayan encontrado secuencias con un alto grado de similitud a las secuencias REP como parte de las regiones que codifican para el ARN de transferencia para la isoleucina tanto en E. coli como en Bacillus subtilis así como para los ARNs ribosomales 16S y 23S en E. coli (ver Tabla IV). En cuanto a estos últimos casos de secuencias tipo REP, cabe enfatizar dos puntos de interés: (1) Las secuencias fueron encontradas formando parte de la región codificadora del gene estructural, no en regiones intercistrónicas; y (2) En ambos casos, estas secuencias tipo REP han sido involucradas en interacciones con proteínas de tipo modificador o ribosomales.

Específicamente, la secuencia encontrada en el ARN ribosomal 16S de E. coli ha sido involucrada en la interacción de esta molécula con la proteína ribosomal S7 (Prince et al., 1983; Noller, 1984) mientras que la encontrada en el ARN ribosomal 23S forma parte de un dominio estructural que interacciona con las proteínas L7, L10, L11, L12 y EF-G (factor de elongación G), todas ellas ribosomales (Prince et al., 1983).

Por otro lado, en las secuencias halladas en los tARNs para isoleucina (en E. coli y B. subtilis) y en el operón que codifica para el tARN de tirosina, se encuentra la secuencia TAA (UAA en el mensajero), que a su vez forma parte de la secuencia consenso REP. Esta secuencia es considerada importante para la modificación de la primera A (adenina) en varios tARNs (Tsang et al., 1983). Con referencia a estos datos cabe mencionar que se han encontrado secuencias de tipo tARN en varios virus eucariontes, las cuales son reconocidas y aminoaciladas por enzimas del hospedero a pesar de una desviación significativa con respecto al consenso de una estructura de tARN (Haenni et al., 1982).

Como se mencionó anteriormente una de las posibles estructuras secundarias presentes en la región 3' del gene gdhA es una estructura muy similar a un tARN. De hecho, esta similitud se eleva a un 35% con respecto al tARN de glutamato de E. coli (Sprinzl y Gauss, 1983). Esto podría sugerir una posible función de esta estructura, ya que siendo similar al tARN de un aminoácido sintetizado por la acción enzimática del producto del gene, se podría pensar que pudiera ser reconocida por una enzima de tipo modificador de tARN. A este respecto, se han publicado datos similares para el operón his de S. typhimurium en el cual se ha encontrado una estructura de tipo tARN muy similar al tARN de histidina en la región líder del mensajero del operón (Ames et al., 1983). Los autores proponen que dado que cada enzima de tipo modificador se une a una región de ARN con una estructura secundaria y secuencia específicas (Tsang, 1983), las enzimas modificadoras forman un grupo de proteínas que podrían actuar como detectoras de estados de tensión metabólica, y en este caso, posiblemente se tratara de niveles de tARN de histidina, para la regulación génica.

Por otra parte, existe la posibilidad de que estas secuencias pudieran interactuar con proteínas ribosomales regulando la tasa de traducción del mensajero. Este proceso pudiera deberse a una protección de tipo estérico contra la degradación del mensajero.

Si bien las secuencias REP pudieran jugar algún papel en la regulación génica a través de las hipótesis mencionadas, no debe descartarse la posibilidad de que estas secuencias tengan otro tipo de función. Stern et al. (1984) sugieren que un papel alternativo pudiera estar relacionado únicamente con la estructura y organización del cromosoma bacteriano, aportando sitios de unión a proteínas específicas. Estas proteínas podrían ya sea anclar el ADN, o bien, delimitar dominios estructurales o funcionales.

Otra función alternativa de estas secuencias, las relaciona con la evolución génica (Gilson et al., 1984; Stern et al., 1984). Gilson et al., han observado ciertas homologías a nivel de secuencia entre las secuencias REP y los transposones de tipo IS. Adicionalmente, Stern et al., han obtenido algunas evidencias experimentales de recombinación entre secuencias REP en plásmido y cromosoma. Estos autores sugieren que estas secuencias pudieran promover rearrreglos genómicos que afectarían tanto la expresión como la evolución génicas.

Si bien son muchas las posibles funciones de las secuencias REP en la regulación génica en procariontes, es muy poco lo que se sabe al respecto. Queda mucho que indagar acerca de su origen y funciones. Sin embargo, es claro que este tipo de secuencias no se deben al azar, no solo debido al alto grado de conservación que presentan, sino a que exhiben toda una serie de características muy particulares que las hacen de gran interés. Es posible

que al ir dilucidando sus posibles funciones en cada una de las unidades transcripcionales en que se han encontrado, se pueda llegar a esclarecer el papel que Juegan en el complejo fenómeno de la regulación génica, y que lejos de ser un mecanismo de regulación muy especializado y poco frecuente, este resulte ser un mecanismo bastante más generalizado de lo que se pensó en un principio.

BIBLIOGRAFIA

1. ADHYA, S. and GOTTESMAN, M. (1978): Control of transcription termination. Ann. Rev. Biochem. 47: pp. 967-996.
2. AMES, B.N., TSANG, T.H., BUCK, M. and CHRISTMAN, M.F. (1983): The leader of the histidine attenuator region resembles tRNA His: Possible general regulatory implications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: pp. 5240-5242.
3. BECERRIL, B., VALLE, F., MERINO, E., RIBA, L. and BOLIVAR, F. (1985): Repetitive extragenic palindromic (REP) sequences in the Escherichia coli gdhA gene. Gene, (en prensa).
4. BOLIVAR, F., RODRIGUEZ, R.L., GREENE, P.J., BETLACH, M.C., HEYNEKER, H.L., BOYER, H.W., CROSA, J.H. and FALKOW, S. (1977): Construction and characterization of new cloning vehicles, II. A multipurpose cloning system. Gene 2: pp. 95-113.
5. BRADFORD, M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem. 72: pp. 248-254.
6. COHEN, S.N., CHANG, A.C.Y. and HSU, L. (1972): Genetic transformation of Escherichia coli by R factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 69: 2110-2114.
7. COVARRUBIAS, A., SANCHEZ-PESCADOR, R., OSORIO, A., BOLIVAR, F. and BASTARRACHEA, F. (1980): Col E1 hybrid plasmids containing Escherichia coli genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine. Plasmid 3: pp. 150:164.
8. GILSON, E., CLEMENT, J.M., BRUTLAG, D. and HOFNUNG, M. (1984): A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in E. coli. EMBO J. 3: pp. 1417-1421.
9. GREEN, C.J. and VOLD, B.S. (1983): Sequence analysis of a cluster of twenty-one tRNA genes in Bacillus subtilis. Nucl. Acids Res. 11: pp. 5763-4774.
10. HAENNI, A., JOSHI, S. and CHAPEVILLE, F., (1982), in COHN, W.E. (ed.): Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. Academic Press, New York, U.S.A: pp 85-102.
11. HIGGINS, C.F., AMES, G.F.L., BARNES, W.H., CLEMENT, J.M. and HOFNUNG, M. (1982): A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. Nature 298: pp. 760-762.
12. HOLMES, W.M., PLATT, T. and ROSENBERG, M. (1983): Termination of transcription in Escherichia coli. Cell 32: pp. 1029-1032.
13. LIN, H.C., LEI, S.P., STUDNICKA, G. and WILCOX, G. (1985): The ara

BAD operon of Salmonella typhimurium, LT1. III. Nucleotide sequence of araD and its flanking regions, and primary structure of its product, L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase. Gene 34, (en prensa).

14. LOZOYA, E. (1982): Aislamiento y caracterización de los genes que codifican para las subunidades de la enzima glutamato sintasa de Escherichia coli K-12. Tesis de Maestría, UACPyP-CCH, México.

15. MANIATIS, T., FRITSCH, E. and SAMBROOK, J. (1982). Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A., 545 pp.

16. McFARLAND, N, McCARTER, L., ARTZ, S. and KUSTU, S. (1981): Nitrogen regulatory locus "glnR" of enteric bacteria is composed of cistrons ntrB and ntrC: Identification of the protein products. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: pp. 2135-2139.

17. HERRICK, H.J. (1982): A new model for nitrogen control. Nature 297: pp. 362-363.

18. NOLLER, H.F. (1984): Structure of ribosomal RNA. Ann. Rev. Biochem. 53: pp. 119-162.

19. PAHEL, G., ZELENETZ, A. and TYLER, B. (1978): gltB gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in Escherichia coli. J. Bact. 133: pp. 134-148.

20. PRINCE, J.B., GUTELL, R.R. and GARRETT, R.A. (1983): A consensus model of the Escherichia coli ribosome. Trends Biochem. Sci. 8: pp. 359-363.

21. SAKAMOTO, N., KOTRE, A.M. and SAVAGEAU, M.A. (1975): Glutamate dehydrogenase from Escherichia coli: Purification and properties. J. Bac. 124: pp. 775-783.

22. SANCHEZ-PESCADOR, R., SANVICENTE, E., VALLE, F. and BOLIVAR, F. (1982): Recombinant plasmids carrying the glutamate dehydrogenase gene from Escherichia coli K-12. Gene 17: pp. 1-8.

23. SANVICENTE, E., SANCHEZ-PESCADOR, R., VALLE, F. and BOLIVAR, F. (1983): Evidencias bioquímicas de la presencia del gene estructural de la deshidrogenasa glutámica de Escherichia coli K-12 en plásmidos recombinantes. Bol. Est. Med. y Biol. 32: pp. 225-232.

24. SENIOR, P.J. (1975): Regulation of nitrogen Metabolism in Escherichia coli and Klebsiella aerogenes: Studies with the continuous culture technique. J. Bact. 123: pp. 407-418.

25. SPRINZL, M. and GAUSS, D.H. (1983): Compilation of tRNA sequences. Nucl. Acids Res. 12: r1-r57.

26. STERN, M.J., AMES, G.F.L., SMITH, N.H., ROBINSON, E.C. and HIGGINS, C.F. (1984): Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. Cell 37: pp. 1015-1026.

27. STREICHER, S.A., DELEO, A.B. and MAGASANIK, B. (1976): Regulation of enzyme formation in Klebsiella aerogenes by episomal glutamate synthetase in Escherichia coli. J. Bact. 127: pp. 184-192.

28. TAIT, R.C., RODRIGUEZ, R.L. and WEST, R.W. (1980): The rapid purification of T4 DNA ligase from T4 lysogen. J. Biol. Chem. 255: pp. 813-914.
29. TSANG, T.H., BUCK, M. and AMES, B.N. (1983): Sequence specificity of tRNA-modifying enzymes. An analysis of 258 tRNA sequences. Biochem. Biophys. Acta 741: pp. 180-196.
30. TYLER, B. (1978): Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. Ann. Rev. Biochem. 47: pp. 1127-1162.
31. VALLE, F. (1984): Estudio de las regiones de regulación del gene estructural de la enzima glutamato deshidrogenasa de Escherichia coli K-12. Tesis de Maestría, UACPyP-CCH. México.
32. VALLE, F., BECERRIL, B., CHEN, E., SEEBURG, P., HEYNEKER, H. and BOLIVAR, F. (1984): Complete nucleotide sequence of the glutamate dehydrogenase gene from Escherichia coli K-12. Gene 27: pp. 193-199.
33. VALLE, F., SANVICENTE, E., SEEBURG, P., COVARRUBIAS, A., RODRIGUEZ, R.L. and BOLIVAR, F. (1983): Nucleotide sequence of the promoter and amino terminal region of the glutamate dehydrogenase structural gene of Escherichia coli. Gene 23: pp. 199-209.
34. VARRICHIO, F. (1969): Control of glutamate dehydrogenase synthesis in Escherichia coli. Biochem. Biophys. Acta. 177: pp. 560-564.