

2 ej
7

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

CARACTERIZACION DEL Gen PARA LA SUBUNIDAD PESADA
DE LA ENZIMA GOGAT DE E. coli

Tesis de Licenciatura

de

Alejandro Garciarrubio Granados

alumno de

INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA, UNAM

México, D. F. Ciudad Universitaria

1983



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.

CONTRIBUYENTES

Me es necesario dar los siguientes créditos a las labores de algunas personas que participaron importantemente en esta tesis. El proyecto fué generado y propulsado por el Dr. Francisco Bolivar quien además aportó una serie de ideas y preguntas e hizo varias acertadas correcciones al manuscrito. Edmundo Lozoya realizó la mayor parte de los trabajos preliminares a mi proyecto, construyó el pELG9 del que ésta tesis trata y cuatro de las figuras y toda la introducción son enteramente suyos. Los "Materiales y Métodos" son casi en su totalidad de Elvira Sanvicente de cuya tesis aparecen aquí transcritos. Buena parte de los experimentos que dieron origen a la sección de resultados fueron algunos sugeridos y otros parcialmente realizados por Alejandra Covarrubias. La sección "Discusión y Conclusiones" consta de dos partes. El análisis contenido en la primera de ellas es esencialmente de Alejandra, el Dr. Bolivar y mío; el de la segunda de ellas considero que corresponde 40% a Alejandra, 40% al Dr. Fernando Bastarrachea, 20% a Mario Rocha y el otro 20% a mi (dicho sea de paso, esta segunda parte aparece como un tributo al Dr. Bastarrachea). Casi todos los cerca de 20 000 minigeles que se usaron para esta tesis los fabricó Noemí Flores y fueron de un valor enorme. Hilda María Lomelí realizó la proeza de purificar CUATRO MILIGRAMOS de pELG9 lo cual modificó la visión de esta experimentación y aceleró su avance varios ordenes de magnitud. Miriam Ortiz preparó buena parte de los medios de cultivo que se utilizaron durante esta tesis. Cada vez que se requirió confiabilidad o precisión en la parte bacteriológica se contó con la ayuda de Aurora Osorio. El señor Roberto Hernandez (Don Robert) me obsequió muchas chucherías que me facilitaron el trabajo. Luis Covarrubias aportó su experiencia para interpretar y mejorar varios resultados de la parte de ingeniería genética de este proyecto. Esta tesis jamás hubiera existido si no fuera por la entusiasta y desinteresada actividad mecanográfica de Martha Veronica Vasquez e Irene Castaño que participaron con el primero y segundo manuscrito respectivamente, ganandose no solo mi agradecimiento infinito sino mi no-poco envidiosa admiración. Así mismo, agradezco a Esperanza Ruiz García (Pelita) el haber brindado su comprensión y experiencia en la mecanografía de la presentación final. Muchas de las

figuras de esta tesis son el resultado de la simpática ayuda y hábil y laborioso esfuerzo gráfico de Claudia Lomelí e Hilda, su ayudante. Carmen Gomez y Guillermo Dávila leyeron y corrigieron esta tesis aportando sugerencias valiosas. La participación de Alejandra en la redacción de los textos no "fusilados" de esta tesis fué tan intensa que no se cuales frases son de ella y cuales mías (afortunadamente, pues sospecho que las menos brillantes fueron mías). Por último, esta tésis fué en buena parte subsidiada por un donativo de la Fundación Hilda Lomelí de R.L.

(Estas dos paginas fueron mecanografiadas por Patricia Leon a quien agradezco).

RESUMEN

En esta tesis se presenta un mapeo de restricción del plásmi
do pELG 9 el cual contiene completo al gen para la subunidad pesada de -
la enzima GOGAT de Escherichia coli. Se demuestra que los genes para las
dos subunidades de esta enzima se transcriben en el mismo sentido a par-
tir de promotores distintos precediendo el de la subunidad pesada al de
la ligera. Se restringe la localización del promotor de la subunidad --
pesada a una región menor a 500 pares de bases. En la discusión se plan-
tean enfoques experimentales para el análisis de la regulación del siste-
ma de GOGAT.

INTRODUCCION :

En la atmósfera se encuentran grandes cantidades de nitrógeno molecular (aprox. 78%); es un compuesto inerte que solamente puede ser usado por algunos microorganismos como son las bacterias fijadoras de nitrógeno y algunas algas verde-azul. Por esta razón la gran mayoría de los organismos vivientes obtienen el nitrógeno en forma combinada como amonio, nitritos, nitratos y aún compuestos más complejos como son los aminoácidos (1). En este contexto se pueden reconocer dos procesos importantes en el metabolismo del nitrógeno:

1) La asimilación de este elemento a partir de los compuestos disponibles en el medio en donde la forma de asimilación dependerá del organismo en cuestión y

2) Su utilización en la biosíntesis de los compuestos nitrogenados necesarios para la supervivencia de ese organismo.

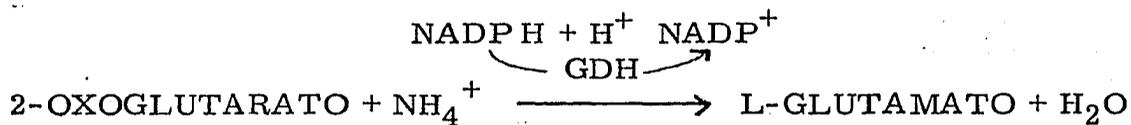
Desde hace ya algunos años se reconocieron a los aminoácidos glutamato y glutamina como fundamentales en la asimilación y biosíntesis de compuestos nitrogenados, ya que actúan como donadores de nitrógeno en las reacciones biosintéticas. Al glutamato se le reconoce como donador primario del grupo amino para la síntesis de aminoácidos principalmente por la vía de la transaminación, en cuanto a la glutamina se sabe que puede donar su grupo amido para la biosíntesis de aminoácidos, purinas, pirimidinas, aminoazúcares y otros compuestos.

En los procariotes es donde más se ha profundizado en el estudio de la formación de estos dos aminoácidos y en la distribución del nitrógeno en la célula a partir de ellos. Por lo tanto, en el caso que ahora nos ocupa, trataremos esencialmente de la formación de glutamato y glutamina en las bacterias entéricas en general. Se sabe que las enterobacterias utilizan glucosa como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno, para crecer en un medio mínimo. En estas condiciones, el metabolismo intermediario funciona principalmente con los grupos nitrogenados que provienen de glutamato y de glutamina. La formación de glutamato procede esencialmente por 3 vías, dependiendo de la forma en las que se encuentren los átomos de carbono y nitrógeno en el medio; estas vías son:

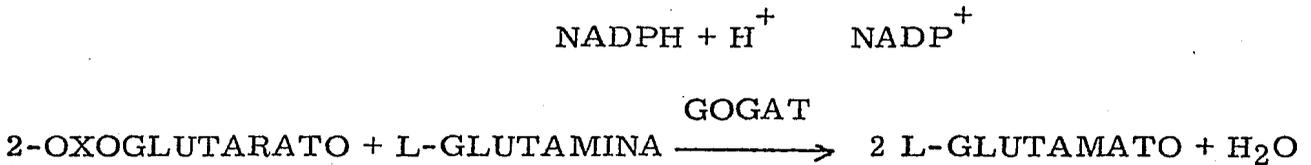
1) La que utiliza 2-oxoglutarato en reacciones enzimáticas diferentes de la transaminación como son:

a) A partir de amonio y 2-oxoglutarato, reacción catalizada por la enzima deshidrogenasa glutámica (L-glutamato: NADP⁺ óxido reductasa; EC1.4.1.4.) (GDH).

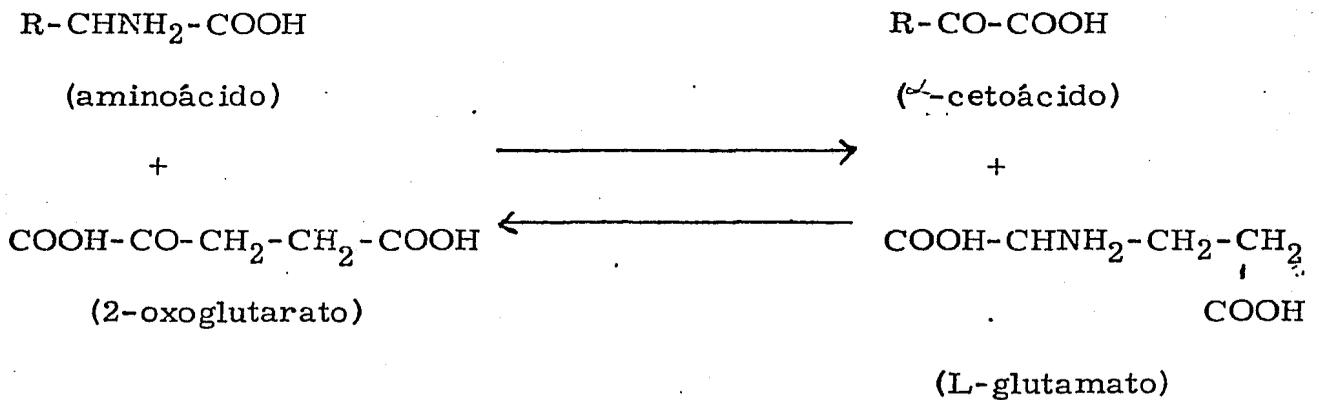
La reacción catalizada es:



b) A partir de 2-oxoglutarato y L-glutamina, reacción catalizada por la enzima glutamato sintasa (L-glutamato: NADP⁺ óxido reductasa, EC 1.4.13.) (GOGAT) en forma acoplada con la reacción dependiente de ATP que es catalizada por la enzima glutamino sintetasa. La reacción catalizada por la GOGAT es la siguiente:



2) A partir de 2-oxoglutarato y los grupos amino de otros aminoácidos por transaminación; la reacción general es:

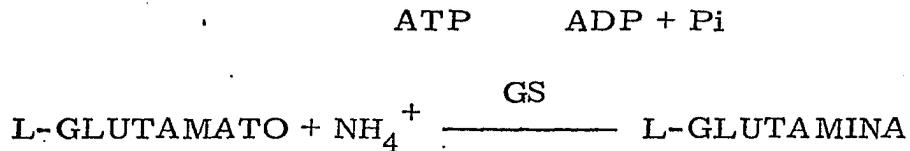


3) A partir de átomos de carbono y de nitrógeno derivados de la degradación de otros aminoácidos.

En otros microorganismos se han observado también reacciones catalizadas por deshidrogenasas glutámicas pero que utilizan NADH y éstas parecen estar involucradas en procesos catabólicos (desaminación oxidativa) mientras que las enzimas dependientes de NADPH realizan principalmente la fun-

ción biosintética (aminación reductiva) del glutamato. En las enterobacterias se ha descrito solamente la GDH biosintética.

La formación de glutamina se realiza por una sola vía mediante la reacción catalizada por la enzima glutamino sintetasa (L-glutamato: amonio-ligasa, EC6.3.1.2.) (GS). La información que se tiene sobre esta enzima es muy amplia y se sabe que está sujeta a varias formas de regulación lo que implica un riguroso control celular sobre la concentración y actividad de la GS. La reacción que cataliza es la siguiente (2):



En la figura 1 se esquematizan las formas de incorporación del amonio a moléculas orgánicas y las tres principales vías de formación del glutamato para llegar a la biosíntesis de glutamina.

Puede observarse que la asimilación de amonio y su utilización para la formación de glutamato en las enterobacterias está controlada por las tres enzimas antes mencionadas: GDH, GOGAT y GS y la relación entre ellas se esquematiza en la figura 2.

De las enzimas mencionadas anteriormente, trataremos en particular de la glutamato sintasa (GOGAT) ya que este trabajo versa sobre la caracterización de los genes que codifican para las dos subunidades que componen la GOGAT de Escherichia coli K-12.

Ha sido descrito por varios autores que el mecanismo primario para la síntesis de aminoácidos a partir de amonio y metabolitos intermedios, es realizado por la GDH; o bien, en aquellos organismos que carecen de esta enzima, por algunas deshidrogenasas de aminoácidos análogas como la alanina deshidrogenasa. Sin embargo, Tempest y colaboradores (3), realizaron observaciones que apuntaban hacia una vía alternativa de la asimilación del amonio en las bacterias. Estas observaciones son las siguientes: a) mutantes de Bacillus subtilis que habían perdido tanto alanina deshidrogenasa como la deshidrogenasa glutámica eran aún capaces de asimilar amonio y crecer en medio mínimo. b) la síntesis de deshidrogenasa glutámica en Klebsiella aerogenes podía ser reprimida casi totalmente sin afectar la capacidad de estos microorganismos de asimilar amonio y crecer en medio mínimo.

Una investigación detallada de este hecho reveló la existencia de una enzima que utilizaba glutamina para sintetizar glutamato y que era desconocida hasta entonces.

Se estableció claramente que la síntesis de glutamato, en cultivos de Klebsiella aerogenes limitados de amonio, podía efectuarse por un proceso que involucraba dos etapas; primero la síntesis de glutamina donde se utiliza una molécula de ATP y luego la transferencia reductiva del grupo amido a la posición 2 de 2-oxoglutarato, formándose así dos moléculas de glutamato, en esta reacción se consume NADPH.

De esta manera las reacciones de formación de glutamato vía glutamina y la reacción catalizada por la GDH, son casi idénticas con la excepción del

gasto de una molécula de ATP; las reacciones correspondientes se pueden observar en la figura 3.

Actualmente se reconoce que la reacción 1 de la formación de glutamato por la vía GS-GOGAT está catalizada por la glutamino sintetasa y que la reacción 2 es catalizada por la glutamato sintasa.

Tempest y col. (3) realizaron un estudio del contenido y distribución de GOGAT y GDH en varias especies de bacterias y levaduras encontrando que, mientras la GDH estaba ampliamente distribuída, la formación de glutamato por la GOGAT solo se manifestó en los procariotes. Esto incluye a los organismos fijadores de nitrógeno, varias especies de algas azul-verdes, algunos anaerobios, bacterias termofílicas y criofílicas.

En el caso de los microorganismos fijadores de nitrógeno se conoce que el amonio es el producto primario del proceso de fijación y que este metabolito es un potente inhibidor y posible represor de la nitrogenasa, entonces para que los organismos continúen fijando el nitrógeno debe existir algún mecanismo para eliminar eficientemente el amonio tan pronto como es formado. Algunos autores han planteado la posibilidad de que la GOGAT, presente en estos organismos funcione inicialmente para eliminar el amonio que se está formando (4).

Por otro lado, recientemente se ha reportado la presencia de GOGAT en ciertos organismos eucariotes tales como Schizosaccharomyces y Neurospora crassa (17). En las plantas se sabe que las dos enzimas importantes para la síntesis de glutamina y para la transferencia de su nitrógeno amido a otros

aminoácidos son la glutamino sintetasa y la glutamato sintasa respectivamente. Estas dos enzimas se han aislado, encontrándose a la glutamino sintetasa tanto en el citosol como en los plástidos, a diferencia de la glutamato sintasa que sólo está presente en los plástidos (17).

Los estudios bioquímicos acerca de la GOGAT de Escherichia coli, son amplos y han sido realizados por varios autores (5-7), a partir de la purificación a homogeneidad de la enzima. La Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica estuvo de acuerdo con el nombre de glutamato sintasa ya que la enzima cataliza la síntesis de glutamato pero no utiliza ATP, las siglas de GOGAT provienen de "glutamino (amido): 2-oxoglutarato amino transferasa (oxido reductasa NADP)", nombre sugerido inicialmente por Tempest (3).

Se sabe que la GOGAT es una flavoproteína que contiene 7.8 moles de flavina, 38.4 moles de hierro y 30.4 moles de azufre por cada 800,000 gr. de proteína; tiene un coeficiente de sedimentación de 20 S. Se le determinó un peso molecular de 800,000 d. por equilibrio de sedimentación y filtración en gel. El espectro de absorción es máximo a 278 nm. y 440 nm. Por espectros de absorción y de resonancia electrónica paramagnética del NADPH reducido se sugiere la formación de un intermediario flavina semiquinona estable. La proteína pura migra como banda única en electroforesis en geles de poliacrilamida a pH 7.2 y pH 8.5 y al tratarla con SDS, urea o guanidina aparecen dos polipéptidos de 135,000 d. y 53,000 d. de peso molecular en electroforesis de poliacrilamida-SDS, lo que sugiere que esta enzima está formada de dos subunidades diferentes.

Las K_m 's aparentes para NADPH, 2-oxoglutarato y L-glutamina son $7.7\mu M$, $7.3\mu M$ y $250\mu M$ respectivamente. Según Miller (5), se puede mantener la enzima pura a $-80^\circ C$ en presencia de 2-oxoglutarato y EDTA por más de un año conservando su actividad total. El pH óptimo es de 7.6 y entre los más potentes inhibidores de la actividad de la enzima están L-aspartato, L-metionina, D-glutamato y $NADP^+$.

Se han aislado la subunidad pesada y la subunidad ligera de la GOGAT de Escherichia coli, y las características que presentan difieren de otras amidotransferasas conocidas. Se estableció que es en la subunidad pesada donde se une la glutamina para la formación de glutamato: esta actividad es dependiente de las flavinas y del Fe-S contenidos también en esta subunidad, aparentemente es necesaria una cisteína para la unión de la glutamina, en esta subunidad se determinó una actividad de glutaminasa (6, 7). Para la subunidad ligera, se observó que también podía formar glutamato pero a partir de amonio, en reacción similar a la de GDH. Pudiera pensarse que la deshidrogenasa glutámica y la subunidad ligera de GOGAT son la misma proteína pero esta posibilidad queda descartada ante la falta de reacción cruzada entre los anticuerpos anti-GDH y la subunidad ligera de GOGAT (6).

El mecanismo por el cual forman glutamato ambas subunidades es diferente según el resultado de la utilización del NADPH (7). La actividad dependiente de glutamina es inhibida por una clorocetona y por metionina sulfoximina, ambos compuestos análogos de la glutamina. Sin embargo, estas sustancias no inhiben la formación de glutamato dependiente de amonio y esta última activi--

dad se ve inhibida por ditionitosódico.

Poco se conoce sobre la regulación de la formación de la GOGAT (2). En trabajos realizados con Klebsiella aerogenes, se observan algunas contradicciones ya que se han reportado altos niveles de la enzima en cultivos limitados de amonio (8) respecto de cultivos crecidos en exceso de amonio. Sin embargo, otros trabajos realizados con otra cepa de K. aerogenes reportan que el nivel de GOGAT era más bajo en células crecidas en condiciones limitantes de amonio que en exceso de éste (9). Brenchley y col. (10), reportaron en un extenso estudio realizado con S. typhimurium, la existencia de altos niveles de GOGAT en células silvestres crecidas en medio mínimo con glucosa y exceso de amonio a pesar de la presencia de glutamato y glutamina. Sin embargo, se encontró una actividad baja en cultivos crecidos con caldo nutritivo o en medio con glucosa y amonio suplementados con aspartato o con una combinación de aminoácidos que inhiben la actividad de la glutamino sintetasa.

Se ha reportado también que la adición de cAMP a mutantes cya⁻ de E. coli bajan el nivel de GOGAT haciendo disminuir también la velocidad de crecimiento. En otro estudio, La Pointe (11), reporta un incremento de cinco veces en el nivel de GOGAT, en cepas de E. coli con una mutación termosensible en el gene para la glutamil-tRNA sintetasa, cuando se crecen a una temperatura parcialmente restrictiva y donde la velocidad de crecimiento se veía reducida. En este caso, los niveles de glutamino sintetasa se incrementaron 50 veces lo cual podía alterar el nivel intracelular de glutamina. De estos datos se ha concluido que la formación de GOGAT está regulada aunque no ha

sido posible establecer el mecanismo de esta regulación (2).

Sobre la genética de la formación de la GOGAT, se han descrito cepas mutantes en K. pneumoniae, K. aerogenes, E. coli y S. typhimurium. Estas mutantes son incapaces de crecer en medio mínimo con glucosa conteniendo una baja concentración de amonio o una variedad de compuestos nitrogenados como única fuente de nitrógeno. Estas cepas fueron descritas originalmente como Asm^- o negativas para la asimilación de amonio (4).

El locus genético involucrado en la biosíntesis de GOGAT, denominado gltB, se reportó originalmente unido al locus malPQ. Sin embargo, Pahel y col. (12) han relocalizado este locus (gltB) en la cercanía del gene argG (min-68), en el cromosoma de E. coli. Tyler ha propuesto (2) que el fenotipo Asm^- podía resultar de mutaciones en cualquiera de dos genes estructurales ya que la GOGAT está formada por dos subunidades diferentes, o bien que este fenotipo resultara también de alteraciones en una o más proteínas regulatorias. Sin embargo, no se han reportado cepas Asm^- que pierdan la actividad de GOGAT por una mutación no ligada a argG lo que sugiere que, los genes para ambas subunidades están cercanos a argG (2).

Una alternativa interesante para estudiar los genes que codifican para las enzimas antes mencionadas, se ha presentado con el aislamiento de plásmidos que complementan mutaciones presentes en estos genes (13). Estos plásmidos se han aislado a partir de un banco de genes de E. coli (14). Esto ha abierto la posibilidad de estudiar la organización física, transcripción in vitro, expresión en multicopia y regulación de estos genes.

Los plásmidos aislados son pACR1, que complementa la mutación glnA20 de la cepa MX705 que es auxótrofa para glutamina, pRSP1 y pRSP20 que complementan las mutaciones gdh1 y gltB31 respectivamente de la cepa PA340. Células de esta cepa conteniendo estos dos plásmidos por separado, pierden ahora la auxotrofia por glutamato. En el caso de la MX729 (PA340/pRSP1) se detecta actividad de GDH pero no de GOGAT y en el caso de la cepa MX730 (PA340/ pRSP20) se tiene ahora actividad de GOGAT pero no de GDH (13). También se ha demostrado que estos plásmidos contienen los genes que codifican para estas enzimas.

ANTECEDENTES:

En nuestro grupo se ha continuado el estudio de éstos plásmidos. Como parte de la caracterización del plásmido pRSP20 se hicieron las siguientes observaciones que en seguida se mencionan porque constituyen los antecedentes relevantes de la presente tesis:

1) Lo primero que se hizo fué demostrar que el plásmido pRSP20, derivado de Col E1, efectivamente contiene los genes para las 2 subunidades de GOGAT. Las evidencias para ésto son, primero, el hecho de que este plásmido complementa efectivamente a la mutación gltB31 de la cepa PA340 para adquisición de la actividad de GOGAT, a pesar de que esta cepa per se probablemente no produce ninguna de las dos subunidades de la enzima (15). Mejor evidencia aún es el hecho de que el sistema de minicélulas, que permite ver las proteínas codificadas por un plásmido, muestra, para minicélulas conteniendo el pRSP20, la aparición de dos nuevos polipéptidos cuando se compara con el patrón de polipéptidos obtenido con minicélulas conteniendo Col E1, cuyas migraciones en electroforesis en dos dimensiones (O' Farrel) son idénticas a las de las dos subunidades de GOGAT (16).

Por último se demostró que estos dos polipéptidos codificados por el plásmido eran reconocidos antigénicamente por suero anti-GOGAT purificado, demostrándose con ello que éstos corresponden a las dos subunidades de la enzima (16).

2) Se localizaron los sitios de reconocimiento que existían en el plásmido pRSP20 para las enzimas de restricción más usuales. (figura 4). El mapeo

de estos sitios sirvió para posteriormente construir plásmidos derivados conteniendo porciones menores de la región del DNA cromosomal, contenida en este plásmido. Sin embargo durante estos experimentos de subclonación surgieron datos que demostraban inconsistencias en el mapa de restricción del pRSP20. Este mapa preliminar fué establecido usando DNA del fago λ digerido con EcoR1 como marcador del peso molecular. Desgraciadamente los pesos de estos marcadores están un poco fuera del rango conveniente para este mapeo y por tanto el mapa resultó poco preciso.

Cabe mencionar que en ese mapa existe una región de 6 md. sobre la cual no hay ningún sitio de restricción localizado, además, considerando el tamaño del Col E1, el mapa indicaba que el sitio de restricción más próximo a una de las uniones Col E1-DNA cromosomal era uno para la enzima -- Hind III, localizado aproximadamente a 2.5 md. del probable sitio de esta unión, donde se encontrarían las colas de A/T. Asimismo, como se puede ver en el mapa, no se precisaba el orden de 3 de los fragmentos de Hind III aunque se sabía a qué región del plásmido pertenecían.

Por último, de este mapa original se desprende el hecho de que el DNA cromosomal clonado pesa 8 md, es decir 5 md. más que lo necesario para codificar las dos subunidades de GOGAT (3.5 md.).

3) A partir del pRSP20 se construyeron distintos plásmidos derivados que contienen partes del DNA cromosomal clonado en el pRSP20 los cuales se ven en la figura 5. (18).

Conviene mencionar que el plásmido pELG4 en el cual el pequeño fragmen-

to de Eco R1 de 0.5 md del pRSP20 fué sustituido por el plásmido pBR328 (19), digerido con Eco R1, produce en el sistema de minicélulas una subunidad ligera de un tamaño distinto y la cual es obviamente no funcional. Este plásmido no complementa a la mutación gltB31 de la cepa PA340.

El plásmido pELG2 que contiene la región de DNA cromosomal comprendida entre los sitios de Bgl II a Sal I, codifica una subunidad ligera normal y ningún polipéptido detectable en minicélulas que pudiera derivarse de la subunidad pesada.

El plásmido pELG9 que es la subclonación del fragmento mayor de Pst I en el sitio de Pst I del pBR327 (19), contiene el origen de replicación del pBR327 en sentido contrario al del Col E1, el cual aún está presente. Además de conferir resistencia a colicina, confiere resistencia a tetraciclina y ha perdido la capacidad de conferir resistencia a ampicilina, propia del pBR327. Este plásmido produce en minicélulas una subunidad pesada íntegra pero ningún polipéptido que pudiera provenir de una subunidad ligera modificada. Extrañamente este plásmido tampoco complementa la mutación gltB31 de la cepa PA340.

Los experimentos de complementación y de minicélulas en los plásmidos antes mencionados y el hecho de que la cepa PA340 no produce antígeno que cruce con suero anti-GOGAT purificado, se oponen a considerar a los genes de las dos subunidades como constituyentes de un operón clásico y sugieren tres posibilidades:

a) que constituyan un operón divergente y

b) que tengan promotores independientes pero respondiendo a una regulación común o coordinada.

c) que exista in vivo un sólo promotor principal funcional para ambas subunidades pero haya uno secundario para la subunidad ligera.

OBJETIVOS:

En virtud de los antecedentes anteriores, se plantearon los siguientes objetivos experimentales, los cuales constituyen el motivo de esta tesis.

- a) Hacer un mapeo de restricción más exacto del pELG9.
- b) Determinar la dirección de la transcripción del gene que codifica para la subunidad pesada de GOGAT.
- c) Determinar la localización del promotor para este gene en este plásmido.

El pELG9 resulta más adecuado para hacer un mapeo de los sitios de restricción en esta región que el pRSP20, ya que su tamaño es menor, y la presencia del pBR327 proporciona una gran cantidad de sitios de restricción conocidos y localizados que sirven como referencia para el mapeo de los sitios desconocidos de la región de DNA cromosomal.

El determinar la dirección de transcripción del gene que codifica para la subunidad pesada ayudará para distinguir entre los posibles modelos de regulación.

Por último, la localización del promotor es esencial para poder analizar qué clase de promotor es y si existen algunas otras regiones de control importantes. También posibilita el hacer una fusión de este promotor con algún otro gene cuyo producto sea fácilmente cuantificable y no relacionado con GOGAT para poder llevar a cabo experimentos tendientes a entender la regulación de ésta enzima.

MATERIALES Y METODOS

A. Cepas Bacterianas

Los genotipos de las cepas bacterianas usada en este trabajo se enlistan en la tabla 1. La cepa PA340 de E. coli es la misma cepa CB100 del laboratorio de B. D. Sanwall con la cual Berberich (1972) (20) demostró que ambas mutaciones, gdh y gltB, son necesarias para construir una cepa auxótrofa de glutamato. La PA340 revierte a independencia de glutamato con una frecuencia de 10^{-8} por célula (12). La cepa CS520, obtenida de J. Carbon, fue la cepa de E. coli usada para la construcción del banco de genes (14).

B. Medios y Condiciones de Crecimiento.

1) Caldo Luria.

El caldo luria (21), modificado por la omisión de glucosa, se usó como medio rico: Bacto-triptona (Difco) al 1.0%, extracto de levadura (Difco) al 0.5%, Na Cl al 1.0%, NaOH 2.5mM.

2) Medio Mínimo NN.

Para los experimentos de complementación se usó medio mínimo NN: KH_2PO_4 13.6g/l, K_2SO_4 2.61 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/l, CaCl_2 0.01 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0005 g/l, ajustar el pH a 7.4 con KOH 10N (aproximadamente 10ml/l), 10 ml/l de glucosa al 20%, NH_4Cl 15mM, añadir los requerimientos de la cepa particular.

La glucosa y el NH_4Cl se esterilizan en solución por separado y se añaden a la mezcla de sales ya estériles. Añadir finalmente los requerimientos de la cepa ya estériles.

La glucosa y el NH_4Cl se esterilizan en solución por separado y se añaden a la mezcla de sales ya estériles. Añadir finalmente los requerimientos de la cepa ya estériles.

- a) Para el medio mínimo NN y luria sólidos, se añadió agar (Difco) a una concentración final de 1.5%.

Cuando fue necesario, se añadieron antibióticos al medio sólido en las siguientes concentraciones: estreptomicina (Sm) 200 $\mu\text{g/ml}$, ampicilina (Ap) 100 $\mu\text{g/ml}$, tetraciclina (Tc) 30 $\mu\text{g/ml}$.

3) Medio Mínimo M9

Para la purificación de plásmido y para crecer la cepa productora de minicélulas P678-54, se utilizó el medio mínimo M9: 10 ml/l de MgSO_4 0.1M, 10 ml/l de CaCl_2 0.01M, 4 g de casaminoácidos (digerido pancreático de caseína) (Difco), 100 ml/l de sales 10X, requerimientos de la cepa.

Esterilizar por separado en el autoclave los requerimientos de la cepa y las sales 10X (por litro: 132 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ó 70 g de Na_2HPO_4 , 30 g de KH_2PO_4 , 5 g de NaCl , 10 g de NH_4Cl).

4) Requerimientos de cada cepa (en ml/l)

- a) PA 340: L-arginina al 2%, 10 ml/l; L-treonina al 0.5%, 10; -- L-histidina al 1%, 2.5; L-leucina al 1%, 5; L-glutámico al 0.5%, 4; vitamina B_1 al 0.1%, 0.2.

- b) CS 520: DL-triptofano al 0.5%, 10; L-metionina al 0.5%, 3.5; - glicina al 2%, 5 vitamina B₁ al 0.1%, 0.2.
 - c) P678-54: L-treonina al 0.5%, 10; L-leucina al 1%, 5; vitamina B₁ al 0.1%, 0.2.
- 5) Todas las incubaciones se efectuaron a 37°C, con agitación para los medios líquidos (200 rpm).

C. Purificación de DNA de Plásmido

La extracción y purificación de plásmido se efectuó por el -- método descrito por Betlach y col. (1976) (22), después de amplificar el cultivo en fase logarítmica por la adición de cloranfenicol (23).

Para un litro de cultivo:

1. Crecer 10 ml del cultivo en caldo luria aproximadamente 12 horas
2. Añadir 5 ml de este cultivo a un litro de medio mínimo M9
3. El cultivo se incuba a 37°C con aereación hasta alcanzar una -- densidad de $4-5 \times 10^8$ células/ml (35-50 unidades klett, filtro rojo). Añadir entonces cloranfenicol (170 a 200 g/ml) para amplificar el plásmido (es necesario que se añada antes de que el cultivo llegue a la fase estacionaria). Continuar la agitación por 16 ± 2 horas.
4. En este paso, las células pueden almacenarse en frío por varias horas (preferentemente no más de tres).
5. Centrifugar: rotor CSA o GS-3 (Sorvall), 7000 rpm, 15 min. 4°C

6. Decantar y congelar el sedimento celular (puede usarse etanol-hielo seco para una congelación rápida). Lavar el sedimento con NaCl al 0.85% y centrifugar nuevamente en iguales condiciones.
7. Resuspender el sedimento celular en 10 ml de sacarosa al 25% - en Tris HCl 50 mM pH = 8, EDTA.Na₂ 1 mM pH = 8, (esterilizada 10 min. en el autoclave, guardarla a 4°C) y pasarlo a tubos de polipropileno de 50 ml; mantener en hielo. (Resuspender cuidadosamente para no lisar las células en este paso).
8. Añadir en el orden dado las soluciones siguientes, (cuidad de mantener todo en hielo): 3 ml de EDTA 0.025 M pH = 8, 1 ml de lisozima (5 mg/ml en Tris HCl 0,025 M pH = 8), 0.1 ml de RNAasa (10 mg/ml en acetato de sodio 0.1M, EDTA 3.3×10^{-5} M pH = 5, calentar a 85°C durante 10 min. para inactivar la DNAasa).

La lisozima y la RNAasa deben guardarse a -20°C en pequeñas -- alícuotas.
9. Mezclar suavemente y dejar reposar en hielo durante 15 min. -- (En este paso las células se convierten en esferoplastos).
10. Añadir 3 ml de mezcla lítica de tritón 3X (3 ml de tritón X-100 al 10%, 75 ml de EDTA 0,25 M pH = 8, 15 ml de Tris HCl 1 M pH = 8, 7 ml de H₂O; guardar a 4°C). Mezclar suavemente y mantener en hielo durante 15 min. (se lisan los esferoplastos), -- llenar los tubos con agua (aproximadamente 20 ml) y agitar suavemente (el agua hace a la solución de sacarosa menos densa que el fenol),

11. Centrifugar: rotor SS-34 (Sorvall), 16 000 rpm, 4°C, 30 min.
12. Decantar el sobrenadante en una probeta de plástico (el DNA se pega al vidrio) inmediatamente después de terminada la centrifugación (el sobrenadante no debe llevarse nada de los restos celulares, pues gran parte del DNA cromosomal se queda ahí). Anotar el volumen y pasarlo a una botella de plástico de 250 ml.
13. Añadir un volumen de fenol saturado frío (saturar el fenol bi--destilado en presencia de Zn^o en un volumen igual de Tris-HCl -- 50 mM pH = 7.5, 100 mM de NaCl; equilibrar unas 12 horas con -- agitación a 4°C). Mezclar. Añadir igual volumen de cloroformo. Mezclar.
14. Centrifugar: rotor HS-4 (Sorvall), 6 500 rpm, 4°C, 10 min. Remover la fase acuosa (superior) a otra botella de 250 ml (no -- llevarse nada de la película de proteínas desnaturalizadas que aparecen en la interfase).
15. Añadir un volumen de cloroformo. Mezclar y centrifugar nueva-- mente (rotor HS-4, 6 500 rpm, 4°C, 15 min.).
16. Añadir 1/30 - 1/25 del volumen de NaCl 5 M a la fase acuosa y - 2.5 volúmenes de etanol absoluto enfriado a -20°C. Mezclar y - dejar reposar a -20°C una hora o más (esto precipita el DNA).
17. Centrifugar: rotor HS-4 (Sorvall), 7 000 rpm, -5°C, 30 min. -- Descartar el sobrenadante y secar el exceso de líquido en la -- botella con una suave corriente de aire.
18. Resuspender el precipitado en 5 ml de buffer A -50 (Tris-HCl -- 50 mM, NaCl 500mM, Na₃N₁ 1 mM, EDTA 1 mM, pH = 8). Añadir 1 ml - de glicerol estéril al 80% y mezclar suavemente.

19. Colocar la suspensión en una columna de A -50 (partículas de gel de agarosa para cromatografía por filtración, Bio-Rad) de 2 x 35 cm. Buffer de corrida: A -50. Colectar en fracciones de 4 ml a temperatura ambiente.
20. Determinar la densidad óptica (D.O.) a 260 nanómetros (nm) de longitud de onda de cada fracción. El DNA del plásmido debe encontrarse en los primeros cuarenta tubos, usualmente entre los tubos 15 y 25. (1 D.O. = 50 g de DNA/ml).
21. Juntar las fracciones que contienen DNA de plásmido (primer pico el DNA cromosomal sale después en un pico más amplio). Añadir 2.5 volúmenes de etanol enfriado a -20°C y dejar precipitar por una hora o más a esa temperatura. Centrifugar: rotor HS-4 (Sorvall), 6 500 rpm, -5°C, 60 min.
22. Decantar el sobrenadante. Secar los tubos con aire. Calcular la cantidad aproximada de DNA por absorbancia.
23. Resuspender el precipitado de DNA en 2.1 ml de buffer TEN (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 10mM, pH = 8) por cada 500 g de DNA.
24. Centrifugar la solución en un gradiente isopícnico a equilibrio en cloruro de cesio-yoduro de propidio.

El yoduro de propidio (PdI) se intercala en el DNA de doble cadena, preferentemente en el DNA lineal y circular relajado (con rupturas en una sola cadena "micks") que en el superenrollado. El PdI es menos denso que el DNA, de tal manera que la forma lineal adquiere una densidad menor relativa al DNA de plásmido cerrado covalentemente (plásmido superenrollado).

Preparación del gradiente CsCl/PdI

Colocar en tubos de nitrocelulosa de 5 ml:

- a) 2.2 g de CsCl (sólido)
- b) 2.1 ml de DNA disuelto en TEN (cada tubo no debe contener más de 500 g de DNA. Disolver. A partir de este paso todo debe hacerse en la oscuridad, ya que el PdI en presencia de luz visible -- ocasiona rupturas al DNA.
- c) Agregar 150 μ l de PdI (2 mg/ml en H₂O). Mezclar.
- d) Agregar 2.3 ml de aceite mineral. Balancear los tubos, en sus respectivas camisas, con aceite mineral (cuidar de no escurrir -- aceite dentro de las camisas).

Centrifugar: rotor SW 50.1 (Beckman), 38 000 rpm, 20 horas, 20°C

25. Picar el tubo y recolectar la solución

El DNA en el gradiente es visible a la luz ultravioleta, UV, debido a que el PdI fluoresce. Aparecen dos bandas principales: la superior corresponde al DNA cromosomal (roto) y a plásmido -- roto (lineal o circular relajado), la inferior corresponde al -- DNA de plásmido superenrollado. A veces aparece una tenue banda intermedia que corresponde a los intermediarios de replica-- ción del plásmido.

En la oscuridad, a la LUz UV, perforar con una aguja el fondo -- del tubo y coleccionar, gota a gota, el DNA de plásmido en un tubo de plástico.

26. Usar una columna de intercambio iónico (catiónico) (Dowex AG -- 50W-X8 Bio-Rad; esta resina es preciclada por tratamiento con -- base, NaOH 1N, neutralizada con agua bidestilada y almacenada a 4°C en Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.5 M, EDTA 1 mM, NaN_3 1 mM, pH = 8) para eliminar el PdI. Se colocan 2-3 ml de resina en una pequeña columna y se equilibran con 10 ml de buffer de resina Dowex - (Tris-HCl 50 mM, NaCl 1M, EDTA 1 mM, pH = 8) por cada ml de resina.
27. Diluir la muestra 1:1 con buffer Dowex y pasarla lentamente a través de la columna (si la solución no se diluye, el complejo DNA-PdI se moverá rápidamente a través de la columna).
28. Lavar con 2-3 ml de buffer Dowex el DNA remanente en la columna. Checar con luz UV si todo el PdI ha sido eliminado de la solución de DNA. De no ser así, pasar el eluido nuevamente a través de -- otra columna con resina Dowex (o remover la parte superior de la resina usada, la cual estará roja, y pasar el DNA sobre la misma columna de nuevo).
29. Dializar el DNA contra 4 litros de buffer Te (Tris-HCl 10 mM, -- EDTA 1 mM, pH = 8) por 6-8 horas a 4°C. Repetir dos veces más.
30. Remover el DNA de las bolsas de diálisis y precipitar con 1/25 de volumen de NaCl 5 M y 2.5 volúmenes de etanol enfriado a -20°C. Dejarlo por lo menos una hora a esa temperatura.
31. Centrifugar: rotor HS-4 (Sorvall), 6 500 rpm, 60 min., -5°C.
32. Resuspender en 0.5 - 1 ml de buffer TE o TEN. Determinar la -- D.O. a 260 nm de longitud de onda para conocer la concentración de DNA (1-2 mg de DNA por litro, generalmente). Guardar a -20°C.

D. Enzimas

1) Enzimas de Restricción

Todas las enzimas de restricción usadas en este trabajo se prepararon conforme al método de Greene y col. (1978) (24). Las condiciones de reacción fueron las siguientes (Bolívar y col., 1977).

A la mezcla de reacción se le adicionó 1/10 del volumen de --buffer 10X adecuado para cada enzima. Dependiendo de la actividad enzimática se eligió la cantidad adecuada de enzima para cada mezcla de reacción (nunca se usó un volumen de enzima mayor al del buffer 10X). Las reacciones se incubaron a 30°C en el caso de Pst y a 37°C para las demás enzimas, el tiempo suficiente para que la reacción fuera completa (las digestiones se checkaron en geles de agarosa al 1%).

Las enzimas se inactivaron por calentamiento a 65°C durante -10 min. o por extracción con un volumen igual al de la mezcla de reacción de fenol saturado y otro de cloroformo (y posterior precipitación del DNA con 1/25 del volumen de NaCl 5 M y 2-2.5 volúmenes de etanol frío).

Cuando se hizo necesario checkar la digestión enzimática por --corrimiento electroforético en geles, la reacción se detuvo añadiendo --1/3 - 1/5 del volumen de mezcla inactivadora (urea 10 M, cianol de xileno al 0.05%, azul de bromofenol al 0.05%, en agua).

Buffers 10X:

Eco RI: Tris-HCl 1 M pH = 7.5, MgCl₂ 0.05 M, NP₄O 0.002%.

Sal I: Tris-HCl 80 mM pH = 7.6, MgCl₂ 60 mM, EDTA 2 mM, NaCl 1.5 M, BSA (albúmina sérica bovina) 0.5 mg/ml.

Pst I, Bam HI, Bgl II: Tris-HCl 1 M pH = 7.5, MgCl₂ 0.05 M.

2) Nucleasa SI

La nucleasa SI se utilizó como lo describe Ullrich y col. (1977) (25): se efectuó a 65°C variando el tiempo de reacción y la cantidad de enzima utilizada.

3) Fragmento Grande de la Polimerasa I de DNA.

El fragmento grande de la polimerasa I de DNA de E. coli se obtiene siguiendo el método de purificación de Klenow (ruptura proteolítica) (26).

La reacción de polimerización del DNA con esta fracción de la polimerasa I de DNA se efectuó a 37°C en presencia de los cuatro nucleótidos trifosfatados (NTP).

Buffer 10X:

Fosfatos de potasio 0.4 M pH = 7.5, MgCl₂ 60 mM. Los NTPs (ATP, GTP, CTP y TTP) se prepararon en Tris-HCl 0.1 M pH = 7.5 como 10X.

4) Ligasa de DNA

La unión covalente de fragmentos de DNA se llevó a cabo en una solución de Tris-HCl 66 mM pH = 7.6, MgCl₂ 6.6 mM, ditriitol 10 mM y ATP 0.5 mM a 12°C durante 12-24 horas. La concentración de la ligasa de

DNA del fago T4 y la de los fragmentos de DNA se variaron para promover polimerización o circularización.

Una unidad de ligasa de DNA de T4 por ml. es suficiente para unir fragmentos de DNA (0.1 μ M) con extremos cohesivos (Dugaiczky y col. 1975) (27). Cuando se ligaron fragmentos de DNA con extremos rasos, la concentración de las terminales fue al menos 0.2 M y aproximadamente se añadieron 5 unidades de ligasa de DNA de T4 por ml a la mezcla de reacción (Heyneker y col., 1976) (28). Los decanucleotidos sintéticos con el sitio de Eco RI (dCCGAATTCGG) se ligaron a fragmentos de DNA con extremos raros como lo describen Bolívar y Backman (1979) (29).

E. Electroforesis del DNA en Geles de Agarosa

La electroforesis de DNA se llevó a cabo en placa conforme a las condiciones descritas por Bolívar y col. (1977).

Preparación de la placa: se preparó agarosa (Bio-Rad) al 1% disolviéndola por ebullición en buffer Tris-Borator-EDTA (Trizma Base - 90 mM, EDTA 2.5 mM H_3BO_3 90 mM, pH = 8.2). Se vacía en las placas y se deja gelificar.

Preparación de la muestra: las muestras, conteniendo 0.2 - 0.5 g de DNA en un volumen final de 15 a 30 μ l que comprende, además, 5 μ l de mezcla inactivante, se colocan en los carriles.

Condiciones de corrimiento: la electroforesis se llevó a cabo a 150 volts con el mismo buffer Tris-Boratos-EDTA durante una hora a temperatura ambiente.

Este tipo de gel se usa para separar fragmentos de DNA de peso molecular alto (0.8 - 4 md). Para separar fragmentos pequeños de DNA (0.015-1 md) se usan genes de poliacrilamida cuya concentración varía de 5 - 7.5% de acuerdo a las necesidades.

Después de terminada la electroforesis, los geles se sumergen en una solución de bromuro de etidio (40 µg/ml) (Calbiochem) y luego se iluminan con una lámpara UV de onda corta.

Para fotografiar los geles se usó un filtro de gelatina amarilla No. 9 Kodak Wratten y película Polaroid NP tipo 55 con una cámara MP-5 Polaroid.

F. Transformación

Las células de E. coli K-12 de las cepas PA340 rec A⁻ y P678-54 se prepararon y transformaron mediante el método descrito por Cohen y col. (1972) (30), el cual es el siguiente:

1. Crecer 30 ml de la cepa deseada en caldo luria hasta una densidad celular de $4-5 \times 10^8$ células/ml (25-30 unidades Klett, filtro rojo).
2. Centrifugar en un tubo estéril: rotor HB-4 ó SS-34 (Sorvall), 10,000 rpm 5 min., 4°C.
3. Decantar. Resuspender las células en 15 ml de NaCl 10 mM (estéril) frío.
4. Centrifugar: rotor HB-4 (Sorvall), 10 000 rpm, 5 min., 4°C. -- Decantar,

5. Resuspender las células en 15 ml de CaCl_2 30 mM (estéril) frío. Dejar en hielo durante 20 - 30 min. (el Ca^{++} permeabiliza la membrana).
6. Centrifugar: rotor HB-4 (Sorvall, 5 000 rpm, 5 min., 4°C. Decantar. (observar que el sedimento de las células está ahora más extendido).
7. Resuspender las células cuidadosamente (para no lisarlas) en 3 ml de CaCl_2 30 mM (estéril) frío.
8. Añadir 0.2 ml de esta suspensión a los tubos que contienen el DNA (0.2-2.0 g de DNA en un volumen final de 100 μ l de CaCl_2 30 mM).
9. Dejar las células en contacto con el DNA durante 60 min. a 4°C (en hielo).
10. Calentar los tubos a 42°C (usar un baño maría) durante 75 segundos. Agregar 3 ml de luria y dejar 5 min en hielo.
11. Incubar con agitación a 37°C durante 2-3 horas. (Esto permite a la membrana su recuperación y estabilizar los plásmidos dentro de la célula).
12. Platear de 0.1-0.2 ml de cada muestra en medio selectivo y dejar crecer 12-24 horas a 37°C.

G. Microensayo del DNA de Plásmido

Este método consiste en la semipurificación del DNA de plásmido con el fin de caracterizarlo parcialmente. Generalmente se efectúa en las colonias resultantes de la transformación que presentan los marcadores adecuados.

1. Crecer 3 ml de caldo luria durante 12 horas.
2. Transferir 1.5 ml de cultivo a un tubo eppendorf y centrifugar 3 min. en la microcentrífuga (Brinkman, 12 000 rpm). Decantar, agregar los 1.5 ml restantes y volver a centrifugar.
3. Lavar las células con 1.5 ml de NaCl 10 mM. Centrifugar, decantar y congelar el sedimento.
4. Resuspender las células en 100 μ l de sacarosa al 25% en Tris-HCl 50 mP pH = 8 (solución estéril, guardarla a 4°C.
5. Agregar 40 μ l de EDTA 0.25 M pH = 8. Mezclar.
6. Agregar 80 μ l de lisozima. Mezclar suavemente. Dejar 10 min. en hielo.
7. Agregar 2 μ l de RNAasa. Mezclar. Dejar 5 min. en hielo.
8. Agregar 150 μ l de mezcla lítica de tritón 3X. Mezclar. Dejar 10 min. en hielo.
9. Agregar 200 μ l de agua estéril. Centrifugar 5 min. en la microcentrífuga.
10. Sacar cuidadosamente el precipitado mucoso con una pipeta Pasteur y guardar el sobrenadante.
11. Agregar al sobrenadante 300 μ l de fenol saturado. Agitar. Añadir 300 μ l de cloroformo y agitar nuevamente.
12. Centrifugar 1-2 min. y sacar cuidadosamente la fase acuosa (superior) y pasarla a tubos Eppendorf nuevos (evitar llevarse restos del precipitado de proteínas que se forma en la interfase).
13. Agregar 300 μ l de cloroformo. Agitar. Centrifugar 30-60 segundos. Descartar la fase clorofórmica (inferior). Si es necesario, eliminar el cloroformo residual por evaporación a 65°C con agitación,

14. Precipitar el DNA agregando 1/25 del volúmen de NaCl 5 M y 2-2.5 volúmenes de etanol frío. Dejar en etanol-hielo seco durante 10 min.
15. Centrifugar 10 min. (en el cuarto frío). Decantar rápidamente. Resuspender en 400 μ l de agua estéril y volver a precipitar con NaCl y etanol, bajo las mismas condiciones.
16. Centrifugar y decantar nuevamente. Secar el precipitado de DNA con aire o calor. Resuspender en 15-40 μ l de agua o TE (estériles). Se obtienen de la 2 μ g de DNA de plásmido.

Las soluciones marcadas con asterisco son las mismas que las utilizadas en la purificación de DNA de plásmido.

Modificaciones: puede disminuirse u omitirse la cantidad de sal utilizada en la primera precipitación del DNA, pues existen restos de sal provenientes del medio de cultivo. Si el precipitado de DNA quedara con sal (blanquecino) puede reprecipitarse sin agregar más sal. Puede lavarse también el precipitado final de DNA con etanol frío al 70% para eliminar restos de sal (cuidar de no agitar mucho el tubo para no resuspender el DNA en la solución de lavado).

H. Determinación de Proteínas por el Método de Lowry (31).

Preparar las siguientes soluciones:

Solución A: Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N

Solución B: $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (tartrato de sodio y potasio) al 2% en agua.

Solución C: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% en agua.

Estándar BSA: solución de albúmina sérica bovina cristalina 1 mg/ml.

Folin 1:3, preparar al usar: 1 volumen de reactivo de Folin-Clocal-
teu + 2 volúmenes de H_2O

Mezcla ABC, preparar al usar: 0.5 ml de C + 0.5 ml de B _ 49 ml de A.

Hacer una curva estándar de albúmina, a la vez que se tratan los problemas, que vaya desde 0 (blanco) hasta 250 $\mu\text{g/ml}$. Preparar en tubos limpios (exentos de materia orgánica) las reacciones colorimétricas correspondientes a cada punto de la curva y a cada problema. Poner en un tubo x ml de la solución estándar de albúmina o del problema (aproximadamente 100 μl de extracto crudo de GDH), llevar a 1 ml con agua. -- Agregar 5 ml de mezcla ABC y agitar, dejar reposar 10 min. a temperatura ambiente. Añadir 0.5 ml del reactivo de Folin diluido y agitar, dejar -- reposar 30 min. a temperatura ambiente. Leer a 625 nm de longitud de onda contra el blanco (filtro rojo).

I. Minicélulas

La purificación de minicélulas se llevó a cabo por una modificación del procedimiento de Roozen y col. (1971) (32) reportada por Meagher y col. (1977) (33).

1. Crecer 500 ml de medio mínimo M9 inoculado con una colonia, o su equivalente de cada cepa durante 13.5 horas a 37°C con agitación, en un matraz de 2 litros.
2. Centrifugar: rotor GS-3 (Sorvall), 2 000 rpm, 4°C, 20 min. Decantar el sobrenadante muy cuidadosamente (contiene a las minicé

- lulas) sin llevarse nada del sedimento de células. Centrifugar el sobrenadante a 5 000 rpm durante 20 min.
3. Resuspender el sedimento de minicélulas (y células contaminantes) en 2 ml de buffer BSG (NaCl al 0.85%, KH_2PO_4 al 0.03%, Na_2HPO_4 al 0.06%, gelatina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; esterilizar y enfriar) cuidadosamente (para no lisarlas).
 4. Colocar la suspensión sobre un gradiente discontinuo de sacarosa en un tubo Corex de 30 ml, formado por volúmenes iguales de sacarosa al 20, 12.5 y 5% en Tris-HCl 50 mM pH = 7.5, NaCl 100 mM, - EDTA 0.1 mM (esterilizar y enfriar las soluciones de sacarosa antes de usarse).
 5. Centrifugar: rotor HB-4 (Sorvall), 5 000 rpm, 4°C, 15 min. Después de este tiempo, es posible ver una banda difusa en la parte superior del gradiente que corresponde a las minicélulas. Tomar la parte superior de la banda (la mitad de la banda, aproximadamente el volumen de 6 pipetas Pasteur) y transferirla a un tubo Sorvall de 50 ml, añadir 10 ml de BSG.
 6. Centrifugar a 10 000 rpm durante 15 min. a 4°C. Decantar y resuspender el sedimento en 1 ml de buffer BSG y colocar la suspensión en un segundo gradiente de sacarosa.
 7. Centrifugar: rotor HB-4 (Sorvall), 5 000 rpm, 4°C 15 min. Se colecta la mitad superior de la banda (aproximadamente 4 pipetas Pasteur), se diluye con 10 ml de buffer BSG, se centrifuga a 10 000 rpm durante 15 min y se resuspende en 1 ml de BSG.
 8. Se corre el tercer gradiente y la mitad superior de la banda se lava con 10 ml de BSG.

9. El sedimento de minicélulas se resuspende en 2 ml. de medio mínimo M9 (que contendrá, en lugar de casaminoácidos, 50 g/ml de -- cada uno de los aminoácidos, excepto metionina) (puede usarse -- también el "medio de ensayo de metionina", Difco, adiconado de -- glucosa y sales 10X) y la D. O. se ajusta a 0.2 a 620 nm --- (0.2 = 8×10^8 minicélulas ml).
10. Transferir 2 ml de esta suspensión a un tubo córex de 15 ml y -- añadir 50 Ci/ml de ^{35}S -metionina. Incubar 20-30 min. a 37°C con agitación, para incorporación de la marca. Centrifugar a 10 000 rpm durante 20 min y descartar el sobrenadante muy cuidadosamente con una pipeta Pasteur. Congelar el sedimento de minicélulas marcadas radioactivamente a -20°C,

J. Electroforesis de Proteínas

1) En Geles de Poliacrilamida -SDS (una dimensión)

Se efectuó por el método reportado por Laemmli (1970) (50).

Gel de poliacrilamida al 0.11% -SDS:

- a) Gel inferior: 8.25 ml. de acrilamida-bisacrilamida (29.2 y 0.8% p v respectivamente), 4.5 ml de Tri-HCl 2 M pH = 8.8, 0.113 ml. de SDS (dodecil sulfato de sodio) al 20% en agua, 8.93 ml de -- agua, 0.3 ml de persulfato de amonio fresco 10 mg/ml. Degasifi-- car 2 min. Añadir 15 µl de TEMED (N, N, N', N' tetrametiletilen-- diamina) puro.

Verter entre dos vidrios, nivelar la superficie del gel con agua y dejar polimerizar.

b) Gel superior: 1.75 ml. de acrilamida-bisacrilamida (29.2:0.8), 0.325 ml. de Tris-HCl 2 M pH = 6.8, 0.05 ml de SDS al 20%, -- 5.75 ml de agua, 0.1 ml de persulfato de amonio fresco 10 mg/ml. Degasificar 2 min. Agregar 5 l de TEMED puro.

Verter sobre el gel inferior (ya polimerizado y sin restos de agua), colocar el peine (preparativo o analítico) y dejar polimerizar. Quitar el peine y lavar muy bien con agua los restos de acrilamida.

Colocar las muestras y correr a 10 mA gel, corriente constante, hasta pasar el gel superior y luego aumentar a 20 mA por gel para el inferior.

Buffer de corrida

Tris-glicina 4X (TG4X): Tris (hidroximetil)-aminometano, 12 g; glicina, 57.6; agua a 1 litro.

Al usar, tomar 200 ml de TG4A, añadir 8 ml de SDS al 20% y llevar a 1 litro con agua.

Preparación de las muestras:

a) Tomar de 1 a 10 µg de la proteína (según pureza) y llevarla a 40 l con buffer de disolución de proteínas, agitar. Hervir a baño maría durante 2 min. Meter al gel.

Buffer de disolución de proteínas (BDP): 0.1 g de SDS, 100 µl de 2-mercaptoetanol, 0.0074 g de EDTA, 1 ml de glicerol. Disolver. -

Llevar a 10 ml con Tris-HCl 0.05 M pH = 6,8 y añadir azul de bromofenol hasta una concentración final de 0.05% (p/v).

- b) Para observar las proteínas marcadas sintetizadas por las minicélulas, resuspender el sedimento de minicélulas (marcado radioactivamente) en 50 μ l de mezcla de lisis (glicerol al 10%, SDS al 2.3%, Tris-HCl 0.0625 M pH = 6.8, 2-mercaptoetanol al 5%). -- Hervir 5 min. a baño maría. Tomar 10-15 ml y añadir 1 μ l de -- azul de bromofenol al 0.5% en agua. Meter las muestras al gel y correrlo.

Tinción del gel:

Una vez que termina de correr el gel, teñirlo con azul de Coomasie - (30 ml de metanol, 10 ml de ácido acético glacial, azul de Coomasie al 0.06%, llevar a 100 ml con agua) durante 15 min. a 62°C. Desteñir con ácido acético al 10%, dos cambios de 15 min. cada uno a 62°C y dejar en solución toda la noche.

Secado del gel:

Este tratamiento se hace necesario para la autorradiografía de los - geles de proteínas marcadas provenientes de extractos radioactivos - de minicélulas.

Sumergir el gel en DMSO (dimetilsulfóxido) (usado) durante 30 min. - Sumergir nuevamente en DMSO (nuevo) durante 30 min. (a temperatura - ambiente). Dejar el gel en PPO (2,5-difeniloxazol, útil en mediciones de escintilación) al 22% en DMSO (a temperatura ambiente) durante 30 min. Sumergir en agua durante 30 min.

Para secar el gel colocarlo sobre un papel filtro y cubrirlo con papel celofán. Ponerlo en un secador de geles y secarlo aproximadamente 1 hora con calor y vacío.

Autorradiografía del gel:

Para detectar las proteínas marcadas poner el gel en contacto con la película de rayos X (Kodak X-Omat) (si se desea, marcar previamente una orilla del gel con un pequeño punto de tinta radiactiva) y colocarlo entre dos vidrios dentro de una carpeta, protegiéndolo muy bien de la luz. Dejar exponiendo 12 horas o más (según marca) a temperatura ambiente. Revelar y fijar la película.

2) Electroforesis en Dos Dimensiones: Separación por Punto Isoeléctrico y por Peso Molecular.

Se llevó a cabo empleando el método descrito por O'Farrell (1975) (34).

1. Primera dimensión: separación por punto isoelectrico.

a) Buffers y soluciones

- i) Buffer de lisis: urea 9.5 M, NP.40 al 2.0% (p/v), anfilitos al 2.0% (1.6 pH de 5 a 7 y 0.4% pH de 3 a 10), 2-mercaptoetanol al 5.0%.
- ii) Acrilamida al 30%: acrilamida al 28.38% (p/b) y bisacrilamida al 1.62% (p/v).
- iii) Nonidet P.40: solución de NP.40 al 10% (p/v) en agua.
- iv) Buffer para el ánodo: H_3PO_4 0.01 M
- v) Buffer para el cátodo: NaOH 0.02M

- vi) Urea 6.0 M, anfolitos 0.8% pH de 5 a 7 y 0.2% pH de 3 a 10.
- vii) Buffer de muestra: Tris-HCl 0.06 M pH = 6.8, SDS al 2.0% (p/v), 2-mercaptoetanol al 5.0%, glicerol al 10%.

Guardar las soluciones i y vi como alícuotas congeladas. Las soluciones iv y v deberán hacerse frescas para cada corrida por dilución de una solución 1 M. Guardar las demás soluciones a 4°C. (Los porcentajes que no se indican se refieren volumen/volumen).

b) Preparación de los tubos.

Los tubos se lavan pasándolos en decon, potasa, ácido crómico y alcohol. Secarlos. (Usar pipetas serológicas de 1 ml como tubos). El fondo de los tubos se sella con tres capas de papel parafina (parafilm) para asegurar que no gotee. Se marcan los tubos a 12.5 cm del fondo (los tubos deben tener la misma longitud por ejemplo 13 cm, al igual que los geles, ya que estos factores afectan la reproducibilidad de las corridas).

c) Preparación de los geles.

Para preparar 10 ml de mezcla del gel, mezclar en un matraz de 125 ml: 5.5 g de urea, 1.33 ml de acilamida (solución B), 2 ml de NP.40 (solución v), 2 ml de agua, 0.4 ml de anfolitos pH de 5 a 7, 0.1 ml de anfolitos pH de 3 a 10. Agitar el matraz hasta disolver completamente la urea. Añadir 50 µl de persulfato de amonio al 10%. Degasificar cuidadosamente y añadir 7 µl de TEMED.

Distribuir la solución en los tubos usando una aguja larga de calibre delgado (sin atrapar burbujas de aire en los geles). Cubrir los geles con 10 μ l de agua y dejar polimerizar (aproximadamente 2 horas). Cortar y quitar el papel de parafina (sin dañar el gel). Colocar los geles en una cámara de electroforesis, llenar la parte inferior con ácido fosfórico 10 mM. Eliminar las burbujas del fondo del gel y sacar el agua del tope de los geles. Cubrir el tope de los geles con 10 μ l de buffer de lisis A, 10 l de solución vi y buffer v hasta llenar los tubos. Añadir el buffer de corrida (solución v) muy cuidadosamente a la parte superior de la cámara para no perturbar las capas de soluciones sobre el tope de los geles. Conectar el electrodo positivo al tanque inferior y el negativo al tanque superior.

Precorrer los geles: 200 volts durante 15 min, 30 min, 400 volts 60 min. o más.

Luego, remover cuidadosamente el buffer de corrida de la parte superior de la cámara (evitando que el NaOH haga contacto con la superficie de los geles). Remover la solución vi y el buffer de lisis i y lavar el tope de los geles con agua (20 μ l, tres veces).

d) Corrimiento de los geles

Aplicar las muestras (para minicélulas 5-1- μ l de muestra + 15 μ l de buffer i) y cubrir con: 10 l de solución vi y buffer v hasta llenar los tubos. Añadir cuidadosamente más buffer v a la parte superior de la cámara y correr los geles a 400 volts durante 18 horas aproximadamente (no incluir el pulso final de alto -

voltaje descrito por O'Farrel), Remover los geles de los tubos inyectando aire o agua, sin romperlos (recibirlos en papel para fina, marcar en un extremo el sentido del corrimiento). Colocar los geles en tubos de 30 ml y añadir 7 ml de buffer O. Dejar equilibrar durante 20 min, sin agitación. Guardar a -20°C.

2. Segunda dimensión: separación por peso molecular.

Es semejante a la separación electroforética de proteínas ya descrita, con algunas variantes.

Hacer geles preparativos de poliacrilamida al 11% -SDS. Colocar sobre ellos los geles tubulares de la primera dimensión (todos con la misma orientación) y sellarlos con agarosa al 1% + azul de bromofenol al 0.06% en buffer de corrida Tris-glicina-SDS. Correr a 9 mA/gel, corriente constante, durante 5-6 horas.

Cuando el corrimiento electroforético haya terminado, remover el gel de las placas de vidrio y fijarlo 1 hora en metanol al 45%, TCA (ácido tricloroacético) al 15% (si las proteínas están marcadas). Teñir con azul de Coomasie y desteñir el exceso. -- Tratar el gel con DMSO y PPO, secarlo y obtener una autorradiografía para observar las proteínas marcadas.

K. Unión a RNA Polimerasa

Los experimentos de unión a polimerasa se realizaron por el método de West y Rodríguez (51). Las reacciones se hicieron en 15 l de buffer de reacción de unión a polimerasa. (BRUP: 20 mM Tri-HCl pH 8.0, --

10 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 5% glicerol y 75 mM KCl), En todo caso se usaron 3 µg de DNA por reacción de RNA polimerasa. La RNA polimerasa se añadió en una relación molar 10:1 RNAP/DNA y se incubó durante 30 minutos. Entonces se añadió heparina a una concentración final de 0.5 mg/ml y se incubaron las reacciones durante 20 minutos más a 37°C. Las reacciones fueron diluídas con 100 µl de BRUP y después se hicieron pasar lentamente a través de un filtro de nitrocelulosa de 6 mm de diámetro los cuales fueron inmediatamente lavados pasándoles otros 250 µl de BRUP. El DNA unido a polimerasa y atrapado de esta forma en los filtros fué recuperado sumergiendo los filtros en 100 µl de un buffer que contiene SDS y calentado durante 1 hora a 65°C. El DNA que se desprende de los filtros fué precipitado con etanol en presencia de NaCl y después resuspendido en 15 µl de H₂O y sometido a electroforesis normalmente.

RESULTADOS

De acuerdo con el mapeo original del pRSP20, en el pELG9 debía existir una región de 6 md sobre la cual no hubiera ningún sitio de restricción localizado (Fig. 6). Esto, además de dificultar el determinar con precisión la localización de los sitios de restricción ya mapeados, era especialmente inconveniente, ya que centrado en esta extensa región del plásmido se encuentra la unión entre Col El y el DNA cromosomal y por ende, algunas consideraciones sugerían que allí podía haber regiones importantes del gen de la subunidad pesada. Con el fin de solucionar estas dificultades se probó una bacteria de enzimas de restricción que comprendía a Ava I, Bal I, Bam HI, Bcl I, Bgl II, Bst EII, Cla I, Eco RI, Hinc II, Hind III, Hpa I, Kpn I, Pst I, Pvu II, Sal I, Sma I, Xba I y Xho I, esperando que alguna de ellas tuviera un sitio de reconocimiento fácilmente localizable en esa zona de 6 md, y en particular que alguno de estos sitios estuviera localizado diametralmente opuesto al de Eco RI del pBR327, ya que los sitios en la parte central del Col El no resultarían realmente útiles para el manejo posterior de estas secuencias (Fig. 7).

De todas las enzimas de restricción probadas, la única que produjo un patrón de restricción adecuado fué la enzima Bst EII, que genera cuatro fragmentos. El pBR327 no contiene ningún sitio para esta endonucleasa y por tanto los cuatro sitios del pELG9 debían estar ya sea, en la región cromosomal o en la región del Col El. A partir del tamaño aproximado de los fragmentos generados por Bst EII en el pELG9 se concluía -- que al menos un sitio para esta endonucleasa debía encontrarse en la re--

gión deseada y por tanto se decidió hacer el mapeo de estos sitios.

Cabe mencionar aquí, que el mapeo del pRSP20 representa esencialmente un mapeo de Hind III, ya que es con respecto a los sitios de esta enzima como están localizados los sitios de las otras enzimas de restricción. Es importante notar que de los sitios de Hind III del pELG9 todos menos uno, el del promotor de resistencia a tetraciclina en el pBR327, caen en la región de DNA cromosomal.

Para el nuevo mapeo del pELG9 se eligió la estrategia de hacer un mapeo doble con Hind III y Bst EII. Una vez localizados estos sitios servirían de referencia para la posición de los sitios de reconocimiento para otras enzimas.

Quizás la forma más sencilla de entender como se estableció el mapa de la Figura 8 es el siguiente: al digerir el Col El con Bst EII se generan dos fragmentos (Fig. 9). El menor de ellos, de aproximadamente 0.7 md, comigra exactamente con el menor de los cuatro fragmentos que genera esta enzima a partir del pELG9. Para localizar los dos sitios de Bst EII en el Col El se hicieron digestiones dobles de este Bst EII + Pst I y Bst EII + Eco RI. De estas digestiones se desprende el mapa de la Figura 9. Al extrapolar la posición de estos dos sitios de Bst EII al pELG9 se ve que se encuentran a aproximadamente 0.8 y 1.5 md de las colas de A/T.

En el pELG9, una doble digestión con Bst EII + Pst I genera, entre otras, una banda tan pequeña que generalmente migra con el frente de la electroforesis en geles de agarosa al 1% y debe pesar menos de 0.1

md. Esta banda indica que existe un sitio de Bst EII muy cerca de uno de los dos sitios de Pst I, pero el cual no se encuentra ni en el pBR327 ni en el Col El y por tanto está la región de DNA cromosomal junto a la -- unión pBR327 = DNA cromosomal. La localización de este último sitio permitió, con una digestión doble Bst EII + Eco RI, demostrar que la orientación que antes se había conjeturado para el pBR327 es la correcta. Además, con la localización de estos tres de los cuatro sitios de Bst EII, - se pudo determinar la localización de los fragmentos 1 y 4 de Bst EII y - se concluyó que el sitio no localizado aún debía estar sobre el cromoso-- mal en una de dos posiciones posibles de forma tal que se generen los dos fragmentos medianos detectados, cuyos pesos se estimaron en 2.0 y 1.2 md respectivamente. De aquí surgió la primera evidencia sería de que el - pELG9 contenía probablemente 2.5 md menos DNA cromosomal del que se pensaba, es decir, sólo contiene 2.7 md y no más de 5 md como se creía. Es te dato condujo a la necesidad de modificar el diseño de experimentos y a reconsiderar las posibilidades de colocación de los genes para GOGAT.

Para discernir entre las dos posibles posiciones del sitio - faltante de Bst EII, fué necesario localizarlo con respecto a los sitios de Hind III. Sin embargo, los sitios de Hind III estaban ambiguamente - localizados y sobre todo, ya que en el pELG9 no existían estos 2.5 md de DNA que antes se creía que existían, resultaba dudoso que aún los sitios "seguros" de Hind III fueron del todo confiables. De cómo se definió -- entonces la organización de los sitios de Hind III, me ocuparé ahora.

El pELG9, al ser digerido con Hind III, genera 5 bandas de 4, 2.5, 1.0, 0.5 y 0.3 md, aproximadamente. De éstas, las tres pequeñas

pertenecen enteramente a la región de cromosomal. El orden de estas tres bandas, no puede ser obtenido respecto a ninguno de los sitios del pBR327, mediante la realización de digestiones dobles. El orden de las cinco bandas fué deducido a través de un complicado experimento, cuya verdadera -- finalidad era otra muy distinta. El experimento fué el siguiente: se -- construyó un banco de inserciones del gen que codifica para la transacetilasa de cloranfenicol, el cual confiere resistencia a éste antibiótico. -- El banco se hizo mediante una digestión parcial de Hha I del pELG9, de forma tal, que solo se hiciera un corte por molécula de plásmido. Este plás-- mido linearizado se ligó con un fragmento de Hha I purificado, que conte-- nía al gen de resistencia a cloranfenicol con su propio promotor y después de transformar, se seleccionó para resistencia a cloranfenicol, además de tetraciclina. Los plásmidos contenidos en las colonias obtenidas, cons-- tituían un banco de inserciones, probablemente en todos los sitios de -- Hha I del pELG9 y contenían ahora dos sitios para Eco RI cada uno. Esto se verificó haciendo digestiones de Eco RI de un grupo representativo de los plásmidos del banco. Entonces se hizo una mezcla de todos los plás-- midos; se digirió con Eco RI y, en condiciones que favorecen recirculari-- zación se ligaron. Esta mezcla de plásmidos recircularizados, se utilizó para transformar y se seleccionó para resistencia a tetraciclina. De es-- ta forma se obtuvo un banco de plásmidos que representan una serie de de-- lecciones del pELG9, las cuales inician en el sitio de Eco RI del pELG9 y tienen pérdida de DNA en el sentido de las manecillas del reloj, según -- el mapa de la figura. El tamaño de la deleción dependió del lugar donde anteriormente se hubiera insertado el fragmento de Hha I que confiere re-- sistencia a cloranfenicol. Al ordenar por tamaño los plásmidos resultan-- tes y hacerles un patrón de Hind III, se vió que los que tenían una menor

delección sólo habían perdido la banda 1. Al aumentar el tamaño de la deleción, los plásmidos perdieron la banda 3, al aumentar aún más, perdieron la banda 5, luego la 4 y hasta el final la 2. De aquí se concluyo - el orden de los fragmentos de Hind III segun las manecillas del reloj y éste fué: 1; 3; 5; 4; 2, a partir del sitio de Hind III del pBR327.

Una digestión Bst EII + Hind III del pELG9 demuestra que el tercer fragmento de Hind III contiene el cuarto sitio no localizado para el Bst EII. Por otro lado, el sitio de Bgl II de este plásmido queda a la vez, dentro del tercer fragmento de Hind III y dentro del segundo -- fragmento de Bst EII. Cuando una doble digestión del pELC9 con Bst EII + Hind III es digerida subsecuentemente con Bgl II, desaparece una banda - que mide exactamente la mitad del tercer fragmento de Hind III. De aquí se concluye que el sitio no mapeado de Bst EII, queda a la mitad del ter - cer fragmento de Hind III y por tanto, que el orden de los fragmentos de Bst EII, de acuerdo a las manecillas del reloj y a partir del sitio inme - diato anterior al pBR327 es: 1; 4; 3; 2. También se desprende la locali - zación correcta del sitio de Bgl II como se ve en el mapa de la Figura .

Uno de los objetivos de esta tesis, era el hacer un mapeo de precisión del pELG9 y para ello se determinaron los pesos exactos de los fragmentos ya mapeados, productos de digestiones sencillas o dobles, mediante el uso de electroforesis especialmente diseñada para mejorar la - correlación entre la migración de las bandas y su peso molecular. Este tipo de electroforesis usa un electrolito en base al ión acetato y son - corridos a bajo voltaje (1.5 V/cm) durante 12 horas; por otro lado, se - corren cantidades bajas de DNA (menores de 0.1 g por banda) y se busca

un tamaño de poro para la matriz del gel que favorezca la resolución dentro del rango deseado. En nuestro caso, se usaron como marcadores de peso molecular los siguientes: fago digerido con Eco RI (13.7, 4.8, 3.7, 3.56, 3.03 y 2.09 md), plásmido RW 33 (1.7 md), y SV40 digerido con Hind III (1.16, 0.77, 0.723, 0.347, 0.295 y 0.142 md).

Con este tipo de análisis se confirmó el ordenamiento que antes se había establecido y se concluyeron las proporciones del mapa actual del pELG9 (Figura 8), en donde el tamaño de los fragmentos se presenta con un error menor al 5%.

Las implicaciones que para el planteamiento e interpretación del trabajo experimental tiene este mapeo, se analiza en la discusión y conclusiones.

El resultado más importante de esta tesis es la determinación de la dirección de la transcripción de la subunidad pesada de GOGAT respecto a la posición de la subunidad ligera de esta enzima. Un rápido análisis del mapa antes determinado permite ver que parte del gen para la subunidad pesada y quizá el promotor de la misma deberá estar contenido en el tercer fragmento de Hind III y por ello se decidió clonar este fragmento en forma aislada en el sitio de Hind III del plásmido pBR322 (36) (Figura 10). Este experimento se realizó ligando el fragmento de Hind III, purificado por electroelución, al pBR322 digerido con Hind III. Después de transformar con esta mezcla, se seleccionó el fenotipo Tc^S Ap^r y a las colonias resultantes se les analizó el plásmido contenido mediante un patrón de restricción. El resultado de este experimento fue el plásmido pH3, el cual lleva el tercer fragmento de Hind III de tal for

ma que el sitio de Bgl II de este fragmento está distal al sitio de Eco RI del vehículo.

Al analizar en un sistema de minicélulas qué polipéptidos codifica el pH3, se observa un polipéptido de aproximadamente 57000 daltones de peso molecular que sólo puede ser codificado por el fragmento clonado y que además requiere al menos el 80% de la capacidad de codificación de este fragmento (Fig. 11). Existe en el pBR322 un fuerte promotor (antitet) (52) entre los sitios de Eco RI y Hind III en forma tal, que un gen clonado en el sitio de Hind III de este plásmido podría ser transcrito a partir de este promotor en dirección al sitio de Eco RI. Para ver si el polipéptido de 53 kd (kilodaltones) codificado por el pH3 se origina de una transcripción a partir de este promotor o de un promotor propio, se decidió invertir la orientación del fragmento clonado, produciendo así, un plásmido al cual se le llamó pI8 (Fig. 10),

En el pI8, el sitio de Bgl II se encuentra proximal al sitio de Eco RI del pBR322. Al analizar en minicélulas los productos proteicos de este plásmido, se observó que el polipéptido de 57 kd se sigue produciendo pero en mucha menor cantidad (Fig. 11). La interpretación a estos datos es que en el pH3, el RNAm se produce a partir del promotor antitet que es un promotor sumamente fuerte pero que probablemente en ambos plásmidos se usa el mismo sitio de unión a ribosoma. De esto se desprende que la transcripción del fragmento clonado en el pH3 se lleva a cabo en la dirección Eco RI-Bgl II. No es fácilmente concebible que se puedan leer en el tercer fragmento de Hind III más de 1000 nucleótidos en dos fases distintas o en direcciones antiparalelas, por lo cual se concluye que el polipéptido de 57 kd corresponde a parte de la secuencia de amino-

ácidos de la subunidad pesada. De aquí se desprende que en el pELG9 el gen para la subunidad pesada se transcribe en la dirección del Col EI hacia el pBR327 y en el pRSP20 del Col EI hacia el gen de la subunidad ligera; es decir, que en el cromosoma, el gen para la subunidad pesada precede al de la ligera en el sentido de transcripción de la subunidad pesada (Fig. 12).

Ya que tanto en el pH3 como en el pI8 se produce un polipéptido cuyos primeros aminoácidos deben ser codificados por secuencias nucleotídicas muy cerca del principio del fragmento clonado, entonces el promotor para la subunidad pesada debe estar, en el pELG9 dentro del tercer fragmento de Hind III extremadamente cerca del sitio de Hind III mas próximo al Col EI, o bien, estar contenido en los 250 a 300 pares de bases comprendidas entre este sitio y las colas de A/T. El plásmido pB² es una delección del pI8 que fusiona el sitio de Bgl II del inserto con el de Bam HI del vehículo (Fig. 10). Tal como se esperaba, este plásmido codifica en minicélulas un polipéptido de aproximadamente 48 kd, correspondiente a una delección del polipeptido de 51 kd, lo cual apoya la localización del promotor de la subunidad pesada (Fig. 11).

Para ver si el promotor se encuentra contenido en el fragmento de Hind III del pI8, se realizó un experimento de unión de fragmentos de restricción a la enzima RNA polimerasa de E. coli. Para ello se digirió el pI8 con Hind III + Hinc II generando cinco fragmentos, dos de los cuales contienen completo y exclusivamente el DNA cromosomal que proviene del pELG9. Al ver cuales de estos cinco fragmentos unían RNA polimerasa se vió que los esperados del pBR322 más los dos del cromosomal lo

hacían. Este resultado es consistente con la suposición de que el promotor de la subunidad pesada está contenido en el tercer fragmento de Hind III del pELG9 pero plantea la pregunta de por qué el fragmento Hind III-Hinc II que contiene al sitio de Bgl II en el pI8 une RNA polimerasa siendo que no tenemos ninguna evidencia que hiciera suponer la existencia de un promotor en el mismo (Fig. 13). La mas probable explicación a esto es que en el fragmento que es cortado por Bgl II exista un pseudo promotor, es decir una secuencia parecida a un promotor, la cual tenga una buena región de -35 pero una región de -10 que no sea funcional para originar iniciación de transcripción.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La primera conclusión que se deriva del nuevo mapa del pELG9 es el hecho de que la ambigüedad en la localización de la subunidad pesada de GOGAT ha sido fuertemente reducida. Anteriormente esta localización se limitaba a afirmar que debía de estar allí, en una región de 5 md de DNA cromosomal presente en el pELG9, ésto es, una región dos veces tan grande como se necesita para codificar a esta subunidad. De acuerdo al nuevo mapeo, esta región mide tan solo 2.9 md y las siguientes consideraciones se hacen pertinentes. En primer lugar el peso de la subunidad pesada de GOGAT estimado en 135 000 daltones implica la existencia de un gen de 2.5 md, si a ello agregamos la necesidad de regiones regulatorias y el hecho de que quizás el pELG9 contenga una parte del gen para la subunidad ligera, entonces ésto implica que ambos genes no solo están próximos sino contiguos; y ésto último se ve reforzado, ya que el peso asignado a la subunidad pesada pudiera estar errado hasta por 5 kg.

La segunda conclusión es que entre el inicio del gen para la subunidad pesada y el CoI EI no debe haber una gran distancia y quizás tan sólo unos 200 p. b. Además, existen evidencias de temperatura de fusión que sugieren que las colas de A/T en esta unión son especialmente largas, lo cual indica que la región de cromosomal puede ser más corta aún.

Por otro lado, en el nuevo mapa se ve que el sitio de Hind III más lejano al pBR327 está a mayor distancia de la que se había pensado. Este dato permitió plantearse el experimento de construir el pH3, ya que

según el mapa anterior, el tercer fragmento de Hind III no podía contener el promotor de el gen para la subunidad pesada y en cambio sí era posible según el segundo mapeo.

El hecho de existir diferencias tan notables entre los dos -- mapeos, aconseja la necesidad de revisar el mapeo de la región de cromos-- somal del pRSP20 que no fué remapeada en el pELG9 ya que la localización del promotor de la subunidad ligera fué basado en cálculos para los cua-- les la correcta estimación de los pesos moleculares de fragmentos de res-- tricción es indispensable.

El resultado más importante de esta tesis es el demostrar que ambas subunidades se transcriben en la misma dirección siendo que la sub-- unidad pesada precede a la ligera. La evidencia para ésto es el hecho -- de que el tercer fragmento de Hind III del pELG9 es transcrito en casi su totalidad en el sentido de las manecillas del reloj (del CoI EI hacia el -- inicio del gen para la subunidad ligera) y que dicho transcrito contiene una fase de lectura sin codones de terminación.

La posibilidad de que el polipéptido producido por el pH3 sea en una parte significativa, codificado por el gen de resistencia a tetra-- ciclina, se descarta ya que el plásmido pI8 produce una proteína del mis-- mo peso esencialmente.

El análisis realizado para el gen de la subunidad ligera ha -- indicado que el pELG9 debe contener su promotor y que su sentido de transcripción en el cromosoma es alejandose del gene para la subunidad pesada. Esto, aunado a los resultados de esta tesis, plantea cuestiones interesan

tes. Se ha visto que la mutación gltB31 contenida en la cepa PA340 impide la síntesis de cualquier producto detectable antigénicamente con suero antiCOGAT purificado. Además esta cepa no es complementada por ninguno de los plásmidos que llevan independientemente los genes para la subunidad pesada a la subunidad ligera de la enzima. Existen distintas posibilidades para explicar por qué una mutante como ésta no produce al parecer ninguna de las dos subunidades. La primera y más obvia es que la mutación consista en una delección de ambos genes. Sin embargo, esto es poco probable, ya que la frecuencia de reversión de esta mutante, si bien no ha sido estudiada específicamente, es observable con facilidad y probablemente sea del orden de 10^{-8} a 10^{-9} por célula. Esta misma frecuencia de reversión sugiere que dos mutaciones independientes en cada uno de los genes tampoco es la explicación.

Otras explicaciones posibles son el que ambos genes compartan una zona regulatoria común, la cual esté alterada en la mutación gltB31, o bien, que esta mutación afecte a un regulador difusible común a ambos genes. Existen dos formas posibles para que ambos genes compartan una región regulatoria, ya sea que constituyan una unidad de transcripción, o que sean dos unidades que divergen con un operador común. Los resultados de esta tesis excluyen la segunda posibilidad, ya que ambos genes se transcriben en el mismo sentido. Sin embargo, la primera posibilidad tampoco es clara ya que existen evidencias de que la subunidad ligera puede ser transcrita a partir de un promotor distinto al de la subunidad pesada. Esta evidencia proviene del hecho de que el plásmido pELG2, el cual contiene una región de DNA cromosomal que inicia en el sitio para Bgl II y que incluye toda la región que codifica a la subunidad ligera, produce en

minicélulas una subunidad ligera normal (37), a pesar de que el promotor de la subunidad pesada está claramente excluido de este fragmento,

Queda la posibilidad de que el promotor que se usa en el caso del pELG2 sólo sea utilizado en este plásmido y no sea fisiológico. Sin embargo, hay que mencionar que dicho promotor da origen a una alta expresión del gen en el sistema de minicélulas. Aunque promotores fuertes que sin embargo no son usados en condiciones fisiológicas ya han sido reportados (53), el hecho de que su expresión sea tan alta indica que no es un pseudopromotor, sino un promotor bien constituido.

Hay otras formas de explicar la mutación gltB31, como el que el promotor presente en el pELG2 sólo sea usado en ciertas condiciones fisiológicas, en particular, en fuentes ricas de nitrógeno donde no es posible observar complementación. También es concebible que alguna de las subunidades fuera además un inductor necesario para la síntesis de la otra subunidad y que esta estuviese mutada para ambas funciones en la cepa PA340.

La baja síntesis de polipéptido en las minicélulas conteniendo el plásmido pI8 indica que quizás no se esté usando el promotor normal de la subunidad pesada. De ser esto cierto, entonces el promotor sería tal que contenga al sitio de Hind III o posiblemente que estuviera en la región de cromosomal comprendida entre este sitio de Hind III y las colas de A/T. En todo caso nuestra creencia es que tanto el pH3 como el pI8 -- sí usan el sitio de unión a ribosomas normal de la subunidad pesada para dirigir la síntesis de polipéptido de 57 kd. Las evidencias y el mapeo indican que no existen más de 0.2 md de material genético donde este promotor podría estar localizado.

La posibilidad de que en los plásmidos pRSP20 y pELG9 la transcripción del gen para la subunidad pesada se iniciase en un promotor del Col El parece poco probable, ya que regiones ricas en A/T provocan absorción de la transcripción, y entre el Col El y el gen de la subunidad pesada las colas de A/T parecen ser especialmente largas.

A pesar de que los datos son congruentes con la localización de promotor cerca del sitio de Hind III más próximo al Col El, es importante saber si el promotor se encuentra en el tercer fragmento de Hind III del pELG9 clonado en el pH3. En este sentido se realizó el experimento de unión a polimerasa descrito en la sección de Resultados. La interpretación a este experimento se ve complicada por el hecho de que ambas bandas de la región de cromosomal parecen unir RNA polimerasa. Sin embargo, el dato debe ser tomado como apoyo de que el promotor se encuentra en el fragmento clonado. Se puede pensar que quizás falta un sitio de unión de un activador prescindible en el experimento in vitro pero necesario in vivo. Esta idea es congruente con el dato de que una célula que lleva de 25 a 30 copias de los genes en plásmidos sólo produce 25 veces más enzima que la cepa silvestre con los genes en monocopia. Es claro que la tercera banda de Bst EII lleva el promotor y probablemente el trabajo debiera enfocarse a la subclonación y caracterización de la misma. También sería muy interesante clonar en un plásmido probador de promotores cualquier fragmento que vaya del sitio de Hind III hacia el Col El.

Para el estudio de la regulación de un gen, es útil el tenerlo clonado ya que esto permite su caracterización física y una manipulación muy directa del mismo. Sin embargo, el análisis del DNA clonado, -- sin contar con un marco de referencia genético y fisiológico adecuado, en mi opinión, no sólo no está justificado en ningún caso sino que resulta - difícil e improductivo. Por esto, el resto de esta discusión está dedicado a procurar una integración de algunos datos existentes respecto al --- sistema de GOGAT.

Aunque a lo largo de este breve análisis no se recurrirá explícitamente a ellos conviene tener en mente dos hechos importantes:

- a) Además de las dos vías principales de síntesis de glutámico --- (GOGAT y GDH), éste puede ser sintetizado, por transaminación, a partir de distintos aminoácidos (38), y
- b) que las reacciones llevadas a cabo por GS y GOGAT más que una -- vía metabólica constituyen un ciclo. Este hecho es la causa por la cual a lo largo de la discusión se dará tanto énfasis en la -- posibilidad de una regulación común o recíproca para estas dos -- enzimas.

Durante algún tiempo, a partir de GOGAT fue descubierta, se -- discutió respecto a su síntesis está regulada o es constitutiva. La res- puesta hubiera sido inmediata si no fuera porque la literatura respecto a GOGAT es algo contradictoria, y distintos grupos reportan regulaciones -- opuestas para esta enzima en condiciones de crecimiento supuestamente -- equivalentes (8,9).

Actualmente es ya aceptado que los niveles de GOGAT en la cé- lula cambian en respuesta al medio indicado la existencia de una regula- ción (2). En particular parece ser que el crecimiento en altas concentra- ciones de amonio o en medios ricos reprimen la síntesis de la enzima (10,

La posibilidad de que en los plásmidos pRSP20 y pELG9 la transcripción del gen para la subunidad pesada se iniciase en un promotor del Col El parece poco probable, ya que regiones ricas en A/T provocan absorción de la transcripción, y entre el Col El y el gen de la subunidad pesada las colas de A/T parecen ser especialmente largas.

A pesar de que los datos son congruentes con la localización de promotor cerca del sitio de Hind III más próximo al Col El, es importante saber si el promotor se encuentra en el tercer fragmento de Hind III del pELG9 clonado en el pH3. En este sentido se realizó el experimento de unión a plimerasa descrito en la sección de Resultados. La interpretación a este experimento se ve complicada por el hecho de que ambas bandas de la región de cromosomal parecen unir RNA polimerasa. Sin embargo, el dato debe ser tomado como apoyo de que el promotor se encuentra en el fragmento clonado. Se puede pensar que quizás falte un sitio de unión de un activador prescindible en el experimento in vitro pero necesario in vivo. Esta idea es congruente con el dato de que una célula que lleva de 25 a 30 copias de los genes en plásmidos sólo produce 25 veces más enzima que la cepa silvestre con los genes en monocopia. Es claro que la tercera banda de Bst EII lleva el promotor y probablemente el trabajo debiera enfocarse a la subclonación y caracterización de la misma. También sería muy interesante clonar en un plásmido probador de promotores cualquier fragmento que vaya del sitio de Hind III hacia el Col El.

Para el estudio de la regulación de un gen, es útil el tenerlo clonado ya que esto permite su caracterización física y una manipulación muy directa del mismo. Sin embargo, el análisis del DNA clonado, sin contar con un marco de referencia genético y fisiológico adecuado en mi opi-

nión, no sólo no está justificado en ningún caso sino que resulta difícil e improductivo. Por esto, el resto de esta discusión está dedicado a procurar una integración de algunos datos existentes respecto al sistema de GOGAT.

Aunque a lo largo de este breve análisis no se recurrirá explícitamente a ellos conviene tener en mente dos hechos importantes:

a) Además de las dos vías principales de síntesis de glutámico --- (GOGAT y GDH), éste puede ser sintetizado, por transaminación, a partir de distintos aminoácidos (38), y

b) que las reacciones llevadas a cabo por GS y GOGAT más que una -- vía metabólica constiuyen un ciclo. Este hecho es la causa por la cual - a lo largo de la discusión se dará tanto énfasis en la posibilidad de una regulación común o recíproca para estas dos enzimas.

Durante algún tiempo, a partir de GOGAT fue descubierta, se discutió respecto a su síntesis está regulada o es constitutiva. La respuesta hubiera sido inmediata si no fuera porque la literatura respecto a GOGAT es algo contradictoria, y distintos grupos reportan regulaciones - opuestas para esta enzima en condiciones de crecimiento supuestamente -- equivalentes (8,9).

Actualmente es ya aceptado que los niveles de GOGAT en la célula cambian en respuesta al medio indicado la existencia de una regula-- ción (2). En particular parece ser que el crecimiento en altas concentra-- ciones de amonio o en medios ricos reprimen la síntesis de la enzima (10,

39), mientras que crecimiento en bajas concentraciones de amonio van acompañados de altos niveles de ésta (8,10). Esto resulta bastante lógico, ya que GOGAT no debe ser requerida en condiciones donde los niveles intracelulares de glutámico sean suficientes y por otro lado debe ser indispensable en condiciones donde la célula no esté posibilitada para utilizar alguno de los otros mecanismos para producir glutámico o en situaciones donde el sistema GS-GOGAT sea la única alternativa para asimilar nitrógeno como lo es el caso de crecimiento en bajo amonio. Los reportes indican que en éstas tres condiciones mencionadas, los niveles de GS parecen variar en una forma similar a los de GOGAT y, en general no esperaría encontrar simultáneamente altos o bajos niveles de estas dos enzimas. A manera de especulaciones, cabe concebir dos excepciones a esto: cuando existiese una alta concentración de glutamina intracelular y, sin embargo, existiera una deficiencia de ácido glutámico, la proporción de GOGAT respecto a GS podría estar notablemente incrementada. Lo inverso podría suceder si hubiera abundante glutámico intracelular y deficiencia de glutamina. Hay que mencionar que debido a que estos dos aminoácidos se interconvierten y a que al parecer ambos se transportan lentamente al interior de la célula (2,35,41), estas condiciones podrían nunc presentarse en una bacteria silvestre y, por lo tanto, la respuesta a las mismas no estar programada genéticamente. Un hecho que habla a este respecto es el que no se ha encontrado represión de GS por glutamina y, sin embargo, sí se han reportado bajos niveles de GOGAT en crecimiento con glucosa más glutámico (2,40). Estos datos se vuelven congruentes si se considera que la glutamina se transporta mucho más mal que el glutámico al interior de la célula (2).

De ser válido el paralelismo entre los niveles de GS y GOGAT se esperaría que GOGAT estuviera elevada en un crecimiento con glucosa - más glutamina como lo está GS. Este parece ser el caso, pero la evidencia será más clara cuando se comparen los niveles de GOGAT en esa condición, respecto a sus niveles en otras fuentes de nitrógeno distintas a - glutámico o a alto amonio.

Si bien la síntesis de GS y GOGAT parecen estar coordinados, se sabe muy poco respecto a cuales son los factores que regulan esta coordinación, es decir, cuales son las moléculas indicadoras, sensoras y - efectoras del sistema de regulación. Un dato muy interesante a este res-pecto es el de Lapointe (11). El ha reportado que mutantes afectadas en el gen para la enzima glutamil-tRNA sintetasa en las cuales, consecuentemente los niveles de glutamil-tRNA son bajos, presentan actividades de - GS y de GOGAT 10 y 5 veces mayores con respecto a la cepa silvestre res-pectivamente. En esta misma cepa, los niveles de GDH son normales. A - partir de este resultado y de que los niveles de GDH responden a la pre-sencia de glutámico en el medio, Lapointe propone que debido a que la vía GS-GOGAT juega su papel más importante en condiciones donde la disponibilidad de glutámico es crítica, la bacteria ha desarrollado un sistema de - regulación para esta vía enzimática a nivel de tRNAs cargados, dandole - por tanto una fineza de regulación que no es posible alcanzar a nivel de las pozas del aminoácido libre, tal y como sucede en el caso de GDH. -- Lapointe propone que el efector podría ser ya sea la tRNA sintetasa o los glutamil tRNAs. La idea de que estos últimos sean los efectores es atractiva, ya que se podría pensar en un mecanismo de atenuación parecido al que sucede en el caso del operón de triptofano. Independientemente de -

cual sea el mediador real de la regulación de la síntesis de GOGAT, es posible que ésta no participe directamente en la regulación de GS y que su efecto sea a través de afectar algún otro elemento regulador.

Los plásmidos derivados de Col El se encuentran en general -- dentro de la célula en un número alto de copias, alrededor de 30 copias -- por célula. El pRSP1 (15) es de este tipo y por tanto una bacteria de la cepa PA340 conteniendo al pRSP1 tendrá aproximadamente 30 copias del gen estructural de GDH por célula. Se ha visto que en este caso los niveles de GS son bajos (42). Los niveles de GS son igualmente bajos si en vez -- de contener al plásmido pRSP1 contienen al pRSP20 y por lo tanto, cerca -- de 30 copias por célula de los genes para GOGAT (42). En este último caso, los niveles de GOGAT por célula son 2.5 veces los niveles desreprimidos de una cepa silvestre. A primera vista ésto parece estar en contra-- dicción con el paralelismo entre GS y GOGAT. Parece muy lógico que altos niveles de GDH o GOGAT produzcan saturación de los glutamil-tRNA disponibles, debido a una alta síntesis de glutámico, y por tanto una disminución en los niveles de GS; lo que no queda inmediatamente claro es por qué se presentan niveles altos de GOGAT. La explicación a ésto se encuentra en el alto número de copias por célula de los genes para esta enzima. Si la -- transcripción a partir de cada una de las copias de estos genes estuviera desreprimida se esperaría encontrar actividades de GOGAT 30 veces mayores a las de la cepa silvestre en condiciones de desrepresión. Sin embargo, -- solo se encuentran actividades 2.5 veces más altas. Esto indica una baja cantidad de RNAm para GOGAT sintetizado por cada copia de gen presente en la célula. La conclusión obvia es que estos genes se encuentran reprimi-

dos paralelamente con el de GS, como corresponde a una situación abundante de glutámico y probablemente de glutamil-tRNAs cargados. Una consideración importante que se desprende de estos experimentos es que GOGAT activa no puede ser como tal un regulador positivo de la síntesis de GS ya que aquí se presenta una condición donde los niveles de ambas enzimas son opuestos. No se excluye, sin embargo, la posibilidad de que alguna de las dos subunidades de GOGAT por separado pudiera tener este efecto regulador sobre la síntesis de GS.

Dendinger et al. (43) reportaron mutantes de Salmonella typhimurium seleccionadas para no crecimiento en alanina como fuente de nitrógeno. Estas mutantes presentan en condiciones de desrepresión niveles bajos de GOGAT (20%) y GS (50%) y niveles normales de GDH. Los autores demuestran que estos fenotipos son el resultado de mutaciones únicas. Este dato habla de la existencia de un gen regulador común para GS y GOGAT. Desgraciadamente el mapeo de estas mutaciones es muy deficiente y no permite decidir si estas mutaciones corresponden o no a alguno de los genes previamente identificados. Parece, sin embargo, ser cierto que no están cerca del gen estructural de GS y por lo tanto ni éste ni los genes reguladores contiguos a éste están afectados. El mapeo llevado a cabo por estos autores también parece excluir los genes estructurales para GOGAT.

Una de las propiedades más interesantes de las mutantes deficientes en GOGAT es su incapacidad para utilizar todo un repertorio de fuentes de nitrógeno tales como alanina, arginina, asparagina, prolina, L-serina, histidina y otras (2,4). A este fenotipo se le ha denominado

Asm. Existe, por otro lado, un fenotipo casi idéntico, que se ha denominado Reg^- , el cual se genera por mutaciones en genes identificados como reguladores del gen estructural de GS: gln A. Estos genes reguladores son llamados gln F (44,45) y gln G. (46). Mutaciones en cualquiera de ellos impiden a la célula utilizar un gran número de fuentes de nitrógeno. Además de su participación en el fenotipo Reg , el producto de gln F, juega un papel central en la activación del operón gln A - gln L - gln G (35). Por su parte, el producto de gln G parece ser un mediador tanto de la represión como de la activación de este operón. También se han descrito mutaciones en gln L (cuyo producto parece ser en esencia, un represor del operón gln ALG) que presentan el fenotipo Reg^- (47,48). Sin embargo, algunas otras mutaciones en gln L son Reg^+ y puede ser que el fenotipo Reg^- de las mutaciones en gln L se deba tan solo a su polaridad sobre gln G. En todo caso, los modelos vigentes postulan que al menos para la regulación de la síntesis de GS, los productos de gln L y gln G interactúan y ésto pudiera explicar el efecto de gln L sobre el fenotipo Reg .

La similitud entre los fenotipos Reg^- y Asm^- sugiere que las mutaciones que los originan pudieran en realidad estar afectando distintos constituyentes de un mismo sistema de regulación para la utilización de fuentes alternas de nitrógeno. Existen sin embargo algunas diferencias. Quizás la más clara de ellas es que las cepas Asm^- son Gln^+ mientras que las cepas Reg^- esencialmente. Esta diferencia probablemente no marca una distinción esencial entre ambos fenotipos, ya que existen muchas razones para pensar que gln A pertenece a un operón Reg , un poco o muy distinto a los demás operones Reg .

Las mutaciones reportadas por Dendinger et al., arriba mencionadas, que tenían tan solo un 20% de la actividad normal de GOGAT, -- son representantes del fenotipo Asm^- . Si bien en estas mutantes los niveles de GOGAT son bajos, estos resultan comparables a los niveles que -- presenta la cepa silvestre en condiciones de crecimiento con sustratos -- Asm como fuente de nitrógeno. Esto lleva a los autores a concluir que no son los niveles bajos de GOGAT los directamente responsables de la -- incapacidad de estas mutantes para usar sustratos Asm . De esta forma -- postulan la existencia de otro gen regulador. Es probable que ni GS ni GOGAT intervengan directamente en el fenotipo Asm ; sin embargo, ya que -- no es posible saber cuales serían los niveles de estas dos enzimas en -- las mutantes si se encontraran en un medio con un sustrato Asm como fuente de nitrógeno, es conveniente tomar la proposición de estos autores -- con cautela.

Las mutaciones en el gen glnL presentan una propiedad muy -- interesante para esta discusión, ya que revierten el fenotipo Asm^- causado por una mutación en gltB (12,48,49). También revierten la auxotrofia por glutamina causada por una mutación en glnF pero en este caso no suprimen el fenotipo Reg^- . Esto parece indicar que hay un requerimiento estricto por el producto de glnF para encender los operones correspondientes para la utilización de las distintas fuentes de nitrógeno y que en -- cambio, para cualquiera que sea el regulador que media el fenotipo Reg^- de las mutaciones en gltB no existe ese mismo grado de dependencia. Este regulador asociado a gltB no existe ese mismo grado de dependencia, -- Este regulador asociado a gltB, de existir, podría ejercer su efecto in-

teraccionando con los productos de glnF o glnG (para el cual también parece haber una dependencia estricta), o modificando a éstos de alguna forma.

Existen dos maneras de explicación porqué las mutaciones en glnL revierten el fenotipo Asm^- de una cepa gltB, si se supone que el regulador "gltB asociado" requiere de interactuar con el producto de glnG para ejercer su regulación. Se ha postulado que los productos de glnC y glnG interaccionan físicamente. Según una de las explicaciones, en las mutantes glnL⁻ no se formaría complejo L + G y habría por lo tanto, más producto de glnG libre y disponible para participar en el sistema Asm^- . Según la otra explicación, debido a la estructura del operón glnA - glnL - glnG, al no haber producto de glnL, el cual es un receptor del operón, habrá consecuentemente, mayor síntesis del producto de glnG. De acuerdo con estas explicaciones, el producto de glnG actuaría más eficientemente en la inducción de los operones Reg cuando es modulado por el regulador "gltB asociado" pero en ausencia de esta modulación, la activación de los operones Reg podría ser compensada con una mayor cantidad de producto de glnG. Alternativamente podría ser que el regulador "gltB asociado" tuviera dos estados con distinta afinidad por el producto de glnG y que en ausencia de GOGAT el estado prevalente genera el de menor afinidad. Si esto fuera así, un aumento en el producto de glnG desplazaría el equilibrio hacia la formación de complejo glnG + regulador "gltB asociado".

El modelo que aquí se ha sugerido es muy especulativo, sin embargo, genera algunas predicciones concretas, tales como que una cepa gltB⁻ que lleve a glnG en un plásmido multicopia deberá ser Asm^+ , o que deben ser aislables mutaciones en glnG que supriman el fenotipo Asm^- .

Igualmente el fenotipo Asm^- no debe ser suprimible por la presencia de glnA en multicopia.

De ser cierta la existencia del regulador "gltB asociado" pue de ser que sea éste quien ejerza el acoplamiento que se ha postulado para las síntesis de GOGAT y GS.

BIBLIOGRAFIA

0. Comunicación personal.
1. A.L. Lehninger
Biochemistry 2nd Ed. (1975) Worth Publ. Inc., New York, U.S.A.
2. B. Tyler
Ann Rev. Biochem. (1978) 47: 1127-1162.
3. D.W. Tempest, J.L. Meers y C.M. Brown
The Enzymes of Glutamine Metabolism. (1973)
S. Prusiner y E.R. Stadman, eds. pp 167-182. Academic Press.
4. H. Nagatani, M. Shimizu y R.C. Valentine
Arch. Microbiol. (1971) 79: 167-75.
5. R.E. Miller
The Enzymes of Glutamine Metabolism, S. Prusiner y E.R. Stadman
eds. pp 183-205. Academic Press.
6. P. Mantsälä y H. Zalin
J. Bacteriol. (1976). 126: 539-41.
7. L.E. Geary y A. Meister
J. Biol. Chem. (1977) 252: 3501-08.
8. J.L. Meers, D.W. Tempest y C.M. Brown
J. Gen. Microbiol. (1970) 64: 187-94.
9. J.E. Brenchley, M.J. Prival y B. Magasanik
J. Biol. Chem. (1973) 248: 6122-28.
10. J.E. Brenchley, C.A. Baker y L.P. Patil
J. Bacteriol. (1975) 124: 182-89.
11. J. La Pointe, G. Delcuve y L. Duplain
J. Bacteriol. (1975) 123: 843-50.
12. G. Pahel, A. Zelenetz y B. Tyler
J. Bacteriol. (1978) 133: 139-48.
13. A. Covarrubias, R. Sánchez Pescador, A. Osorio, F. Bolivar y F.
Bastarrachea
Plasmid (1980) 3: 150-64.

14. L. Clarke y J. Carbon
PNAS (1975) 72: 4361-65.
15. A. Covarrubias, R. Sánchez-Pescador, E. Lozoya, F. Bastarrachea y F. Bolívar
Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation (1980). J. Mora y R. Palacios eds. pp. 123-37. Academic Press.
16. E. Lozoya, R. Sánchez Pescador, A. Covarrubias, I. Vichido y F. Bolívar.
J. Bacteriol. (1980) 144: 616-21.
17. B.J. Mifflin, P.J. Lea y R.M. Wallsgrove
Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation
J. Mora y R. Palacios eds. (1980) pp 213-34. Academic Press.
18. E. Lozoya
"Aislamiento y caracterización de los genes que codifican para las sub-unidades de la enzima glutamatosintasa de Escherichia coli.K-12
"Tesis para obtener el grado de Maestro en Investigación Biomédica Básica (1982) UNAM, México.
19. X. Soberón, L. Covarrubias y F. Bolívar
Gene (1980) 9: 287-305.
20. M.A. Berberich
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1972) 47: 1498-1503.
21. J. Miller
Experiments in Molecular Genetics (1972). Cold Spring Harbor, Coldspring Harbor Laboratory. N. York.
22. M. Betlach, V. Hershfield, L. Chow, W. Brown, H. Goodman y H. Boyer.
Fed. Proc. (1976) 35: 2038-2043.
23. D. Clewell
J. Bacteriol. (1972) 110: 667-76.
24. P.J. Greene, H.L. Heyneker, M. Betlach, F. Bolívar, R. Rodríguez, A. Covarrubias, I. Fodor, K. Backman y H.W. Boyer
Nucl. Acids. Res. (1978) 5: 2773-2780.
25. A. Ullrich, J. Shine, J. Chirgwin, R. Pictet, E. Tischer, W.J. Rutter y H.M. Woodman
Science (1977) 196: 1313.

26. H. Jacobsen, H. Klenow y K. Overgaard-Hansen
Eur. J. Biochem. (1974) 45, 623.
27. A. Dugaicz y K., H.W. Boyer y H.M. Goodman
J. Mol. Biol. (1976) 105: 603-28.
28. H.L. Heyneker, J. Shine, H.M. Goodman, H.W. Boyer, J. Rosenberg,
R.E. Dickerson, S.A. Narang, K. Itakura, S. Liv y A.D. Riggs.
Nature (1976) 263: 748-753.
29. F. Bolívar y K. Bachman
Methods in Enzymology (1979). 68: 245-267.
30. S.N. Cohen, A.C.Y. Chang y C.L. Hsu.
PNAS (1972) 69: 2110-14.
31. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall
J. Biol. Chem. (1951) 193: 265-75.
32. K.J. Roozen, R.G. Fenwick y R. Curtiss
J. Bacteriol. (1971) 107: 21-33.
33. R.B. Meagher, R.C. Tait, M. Betlach y H.W. Boyer.
Cell (1977) 10: 521-36.
34. P.H. O'Farrel
J. Biol. Chem. (1975) 250: 4007-21.
35. A. Covarrubias y F. Bastarrachea.
Datos de sus grupos. Comunicación personal*
36. F. Bolívar, R. Rodríguez, P. Greene, M. Betlach, H. Heyneker, H.
Boyer, J. Crossa y S. Falkow.
Gene (1977) 2: 95-113.
37. E. Lozoya
Datos no publicados.
38. H.E. Umbarger
Ann. Rev. Biochem. (1979) 47: 533.
39. C.A. Woolkolk y E.R. Stadman
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1964) 17: 313-19.
- * Referencia general omnipresente.

40. P.J. Senior
J. Bacteriol. (1975) 123: 407-18.
41. M. Marcus y Y.S. Halpern
J. Bacteriol. (1969) 97: 118-28.
42. L. Servin
"Un nuevo fenotipo relacionado con la asimilación de amonio por Escherichia coli K-12". Tesis para obtener el grado de Biólogo. (1981). UNAM, México.
43. S.M. Dendinger, L.G. Patil y J.E. Brenchley
J. Bacteriol. (1980) 141: 190-198.
44. E. Garcia, S. Bancroft, S. GooRhe y S. Kustu
PNAS (1977) 74: 1662-66.
45. C.M. Gaillardin y B. Magasanik
J. Bacteriol. (1978) 133: 1329-38.
46. G. Pahel y B. Tyler
PNAS (1979) 70: 4544-48.
47. N. McFarland, L. McCarter, S. Autz y S. Kustu
PNAS (1981) 78: 2135-2139.
48. Y. Chen, K. Backman y B. Magasanik
J. Bacteriol. (1982) 150: 214-220.
49. T. MacNeil, D. MacNeil y B. Tyler
J. Bacteriol. (1982) 150: 1302-1313.
50. U.K. Laemmli
Nature (1970) 227: 680-685.
51. R.W. West y R.L. Rodriguez
Gene (198) 9: 175-193.
52. D. Stüberand y H. Bujard
PNAS (1981) 78: 167-171.
53. H.S. Strauss, R.S. Boston, M.T. Record y R.R. Burgess.
Gene (1981) 13: 75-87.

Nota Confirmatoria:

Durante el periodo de escritura de esta tesis se construyó un plásmido que incluye 2md de DNA cromosomal. Este DNA cromosomal va desde un sitio de Hpa I localizado 200 pb, mas próximo a las colas de A/T del - pELG9 que el sitio de Hind III mas próximo a estas, hasta otro sitio de - Hpa I a aproximadamente el 80% del gen para la subunidad pesada de GOGAT. Este nuevo plásmido llamado pHpa2 produce en minicélulas una proteína de aproximadamente 110 000 d. de peso molecular la cual solo puede ser transcrita a partir del promotor de la subunidad pesada. Ya que el pI8 no --- lleva este promotor completo mientras que el pHpa2 al parecer si, esto -- apoya la localización del promotor en los doscientos pares de bases com-- prendidos entre los sitios de Hind III y HpaI mas próximos a las colas de de A/T (Fig. 11).

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	12
OBJETIVOS	16
MATERIALES Y METODOS	17
RESULTADOS	42
DISCUSION Y CONCLUSIONES	51
— PARTE II (EL SISTEMA)	56
BIBLIOGRAFIA	68

A MANERA DE AGRADECIMIENTO.

Al empezar esta tesis pensaba que la seccion de agradecimientos sería la mas importante de todas. Ahora, al acabarla, veo que gracias a la intervencion de algunas gentes existen en ella otras partes muy importantes que junto con estos agradecimientos ayudan a salvar a esta tesis de ser, como tenía, un mero tramite burocratico. Sin embargo, lo que mas placer representa para mi es poder recordar a algunos amigos mi estimacion y gratitud por aquello que han dado para que sea como soy* y por haberme hecho la ciencia una actividad tan disfrutada.

Mi memoria es torpe y mi deambular por Biomedicas ha sido muy largo. Digo esto a manera de disculpa. A muchas personas que debería mencionar en esta sección, sé que no menciono y les pido me perdonen: seis años son mas que suficientes para deber un sin-numero de favores y acumular una gran cantidad de amistades, afectos y colaboraciones. Para casi todas las personas que he podido conocer en este tiempo guardo un gustoso sentimiento de aprecio. Por otro lado, hay algunas omisiones que me serian totalmente inperdonables; si cometo alguna de estas (¡Dios no lo quiera!), no me perdonen, solo venganme a reclamar.

Quiero agradecer:

antes que nada y por sobre todas las cosas a Alejandra por lo que a veces es su entusiasta estímulo y otras, su amorosa paciencia, por su inapelable critica, sus consejos, y su guia y por muchisimas razones mas; a mi adorada amiga Hilda, quien mas ha sufrido, aguantado y compartido, mis cambiantes estados de animo, por su ingenio insustituible y su cariño; a Luis por cientos de cosas pero entre otras por el deleite

*no estoy tratando de culpar a nadie.

de las —>

(2)

horas perdidas en gimnasias mentales, por las cosas afines y por la forma tan propia y tan sincera de entender la amistad, a Mariza que fue la sonrisa precisa en el instante oportuno, a mi laboratorio que solo es el mejor laboratorio del mundo y universos que lo circundan, a Martha, a Paty, a Mano, a Jose Maia, todos ellos excelentes amigos, a La Gloriosa 5^a division "Pantzer", a mis amibuitas, Lola e Irene, a Julio (mas loco que una cabra), a David sobrio y paternalista, al super Doctor Scaundown y a Arturo "buen hombre" mis compañeros del alma, a Melen quien me enseño que el trabajo esteril puede ser a da vez el mas productivo, a todos los honorables miembros del lab. de Fernando, a el, Miriam, Aurora, Denise, Marcé, Silvia, Laura, Alejandra, Julio y Luis, que son con quien uno mas querria compartir y compartir, a mis amigos del laboratorio del Dr. Bolivar, unos que fueron y otros que estan, a Mundo, Noemi, Elvira, a mi mecenas (mas veces comidos que cenas) Aileen, a Fernando, Leticia y Bely y muchos otros incluyendo a los quimicos; a Rafael Palacios y aquellos con quien compartí en esas epocas, que fueron una experiencia inolvidable, a Lulu, a Campodesmanes, de quien aprendi el caos pero no se porque no la habilidad*, a Chema, a Mundo, a ~~Fere~~ a paty, a sergio Sanchez, a Laura, Chuy, Fernando y Teré, a Linus excelente tutor y buen amigo, a Hortensia, con quien compartí muchos trabajos santos y non-santos, a la inigualable Lulu Arco, a Felipe, a Kaítho a quien entre mil favores

* la magia

#... saurio.

agradesco que cuida de mi cultura musical,
a las gentes de su laboratorio, a Patricia y
Jean Luis que son de lo más simpáticos y
a Lakshmi que es aún más simpática, a
Xavier cuya lógica y estilo me parecen
excepcionales, a Mario Zurita, a quien debo
tantos favores y que es todo lo noble que se
pretende no ser, a Cristi que es simplemente
maravillosa, a los otros miembros de ese
laboratorio, a Mario Castañeda con quien es
un placer discutir cuando se vence el miedo,
a sus gentes, que son muy buenas gentes,
a Julieta quien está humana y da
un curso excelentísimo, a Javier que
también es genial y a los otros miembros
de ese lab. con quienes tan bien me
llevo, a Jaime Mora, a quien debo dos
de las más terribles y bien intensiona-
das regañizas de mi vida académica
(lo cual aprecio) y a quien considero
un buen amigo, a Miguel Lara, al genial
moleñ, frigón, simpático Memo Davila, a
Alicia Gonzales (que me debe un pastel de
chocolate), a mis otros amigos de esa zona,
al Dr Negroto, tan original y a quien
muchas cosas he aprendido, a Jorge Sobron,
al "Panama", a los demás, a W. Hausberg, a
Maia Elena, a Carlos Larvalde quien en
muchas ocasiones ha demostrado interés
porque yo sea menos giluy de lo que soy,
a Ana Flessel que me cae muy bien y
que nos organizó un super curso de
inmunología, a Carmen Gomez que es
de lo más simpática, original y cooperativa,
a Jaime que me cae tan bien, a los otros
distinguidos miembros de ese laboratorio,

y aquí quiero hacer un elogio del Sr Miguel que es lo mas admirable por su dedicación y responsabilidad, porque si hubieran muchos como el este pais seria muy distinto al desmadre que ahora es, a Romilio que siempre me ha ayudado con su experiencia y a veces con cosas mas mundanas, a las gentes de su lab. pero sobre todo a mi tia Claudette, al Dr Librado, a Sullivan, a Celso (otro de mis tucos), y a todos ellos, a Torio Velozquez Fernando Montiel y los demas (le pido al Sr Carmelo que se aprenda mi nombre), a Rodolfo con quien siempre he contado y quien me ha permitido ver con una mejor perspectiva los problemas de mi mundo y quien amortigua mis crisis respecto a la ciencia pura o aplicada, a Daniel extraordinario y unico, a Lidia, Enrique y todos ellos, a mi adorable amiga adriana cuyo unico defecto es creer que "la bamba" es colombiana, a camilita que hace el cafe mas oportuno, los tacos mas sabrosos y a quien cuando no esta, en el laboratorio mas extrañamos, al Dr Francisco Alonso de Florida a quien debo tantas cosas, un curso excelente que requirio un gran esfuerzo, muchos ideas geniales y una vision muy especial del mundo, a todos los que participaron en dicho curso, al Dr Salos que nos aguantó a Arturo y a mi mas de un mes, al Dr Pacheco, al Dr Mena y a los demas incluyendo aquel dia maravilloso en cardiologia, al Dr Merchant

5
que entre otras cosas representa para mí a la biología del desarrollo, a Carmen y Federico que son buenos amigos (buenos amigos míos ya que uno del otro son maridos), a los maestros que participaron en nuestro curso de inmunología (tan bueno, como ya he dicho), a mis amigos de la carpintería que son ingeniosos y creativos y que no entiendo porque los tenemos tan olvidados y desaprovechados, a Felipe y Jose que siempre están dispuestos a ayudar a los poco previsores congresistas que dijamos todo para el final a don Robert que antes nos daba tantas cosas y ahora casi ni nos saluda, a Cristina Cortines y su gente que son, o siempre me han parecido, una multitud de gente simpática, a mi amigo Memo Alfaro a quien el fútbol tiene como tiene, a Alejandro Aragón, mi tocayo (o como se escriba) que es tan buena gente como práctico e ingenioso, a sus colaboradores pero sobre todo a Betty, a Lourival D. Possari, siempre un buen amigo, a sus gentes, en especial a Memo, a Alvaro, Mary, Alfonso, y a todos los miembros de la biblioteca que hacen que esta sea uno de los sitios que mejor funcionan en esta universidad, a mis amigos de compras que hacen todo lo que pueden para solucionar la burocracia de pedir lo que necesitamos en un país donde no existe con un dinero que no tenemos, a Felipe Cabello que ha puesto su firma en cada aparato circuito o cachibache de este instituto

con lo cual garantiza que ahora es indispensable y quien me ha hecho mil favores, el Licenciado Espinoza que con venir sabados y domingos y quedarse entre semana hasta tan tarde nos levanta la moral y hace sentir que lo que hacemos es importante, a Felipe Najera que es siempre cooperativo y confiable al "chiriox" Herrera Estrella simpatico y grotesco (que montagu lo perdone!), a Jorge Perez de la Mora que es tan buena gente como imprescindible, a mis amigos de la UACP y P caracterizados por una paciencia infinita a nuestros problemas y de quienes recuerdo que cuando un experimento no me salia, iba a visitarlos para que me miraran (esto, claro, cuando aun eramos pocos, hace tres años), a todos las generaciones que han entrado, a los que han cambiado la carrera y a los que la han reafirmado, y a los individuos de estas, a Ray, Luis, Susi, Hector, Roberto, todos los amazonos una por una, a Maria y Veronica, Alma, Marga, Edna, Jaime, Oscar, Marcela, Alberto, Nora, a la tina y dulce Claudia, Juan, el simpatico de Jorge, Cesar, Margarita, a mis alumunitas Dalia, Eugenia y Teta de quienes aprendi mas que ellos de mi, Mari Carmen, Denise, Ana, Enrique, Jordi, Hiram, mis alumnos teoricos, la septima, con el extraordinario Lorenzo cuyo ejemplo habria que seguir, Mario, Enrique, Marco y mi amiga Ruth, a los maestros de todos mis cursos, a Ricardo Tapia, a Tono Pena, y los otros, a Carmira, a

⑦

Azuena, a Paty, a Lloyd y Adolfo, a Aurora a quien tanta lata di cuando estaba en la Unidad de Enseñanza, a Luci, a quien tanta lata le dare, a mi amigo Fernando García, a Pablo Pérez Covilán, a Martus y su gente que fueron, a los belgas, a las gentes de Patricia y a las de Jean Luis, a Carlos Huétran que aparte de ser un excelente coordinador le debo un chorro de favores y me predijo el resultado deplorable de varias de mis decisiones, a los miembros de su lab, America, Memo y los demás, a las gentes del extinto lab de Limon Lasory, a mis nuevos amigos de CEFINI, a la calamidad mas calamidad de los que han sido, Luz, Joaquín, Veronica, algunos que ya no estan mas, a Mari y Angel, Aurora y gloria, al buenazo de Polo, a mis compañeros de viaje Irma Villalpando y Jacqueline Roche, a Braulio y a los demás miembros de ese divertido y agradable laboratorio, a Alfonso y su lab., a Alejandro Bayon que me cae tan bien, a Francisco Lora que siempre me tiende la tentación del trabajo teórico, y a muchos otras personas mas.

Sinceramente

Alejandro

Marzo 6, 1983

FIGURA 1

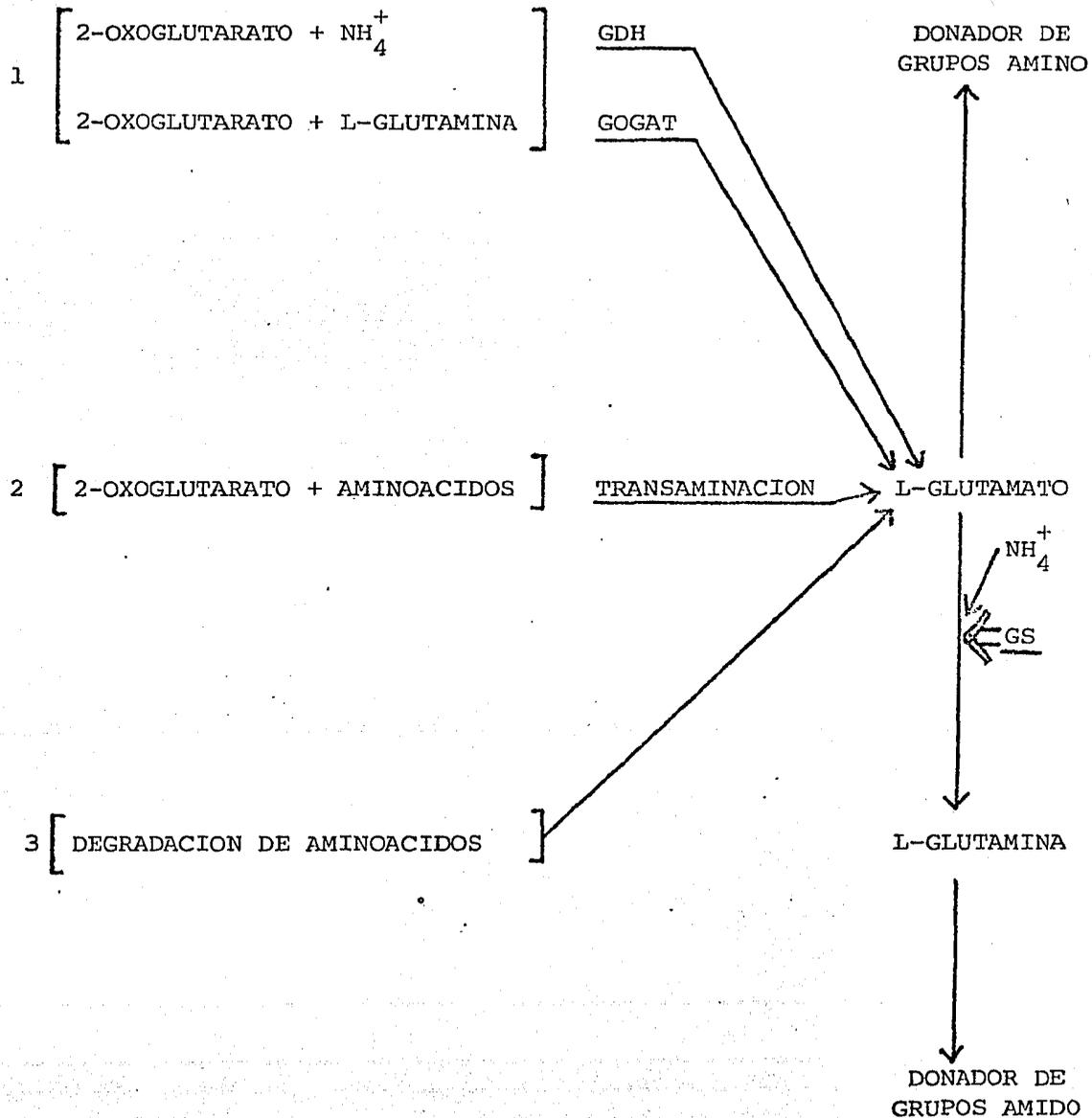


FIGURA 2

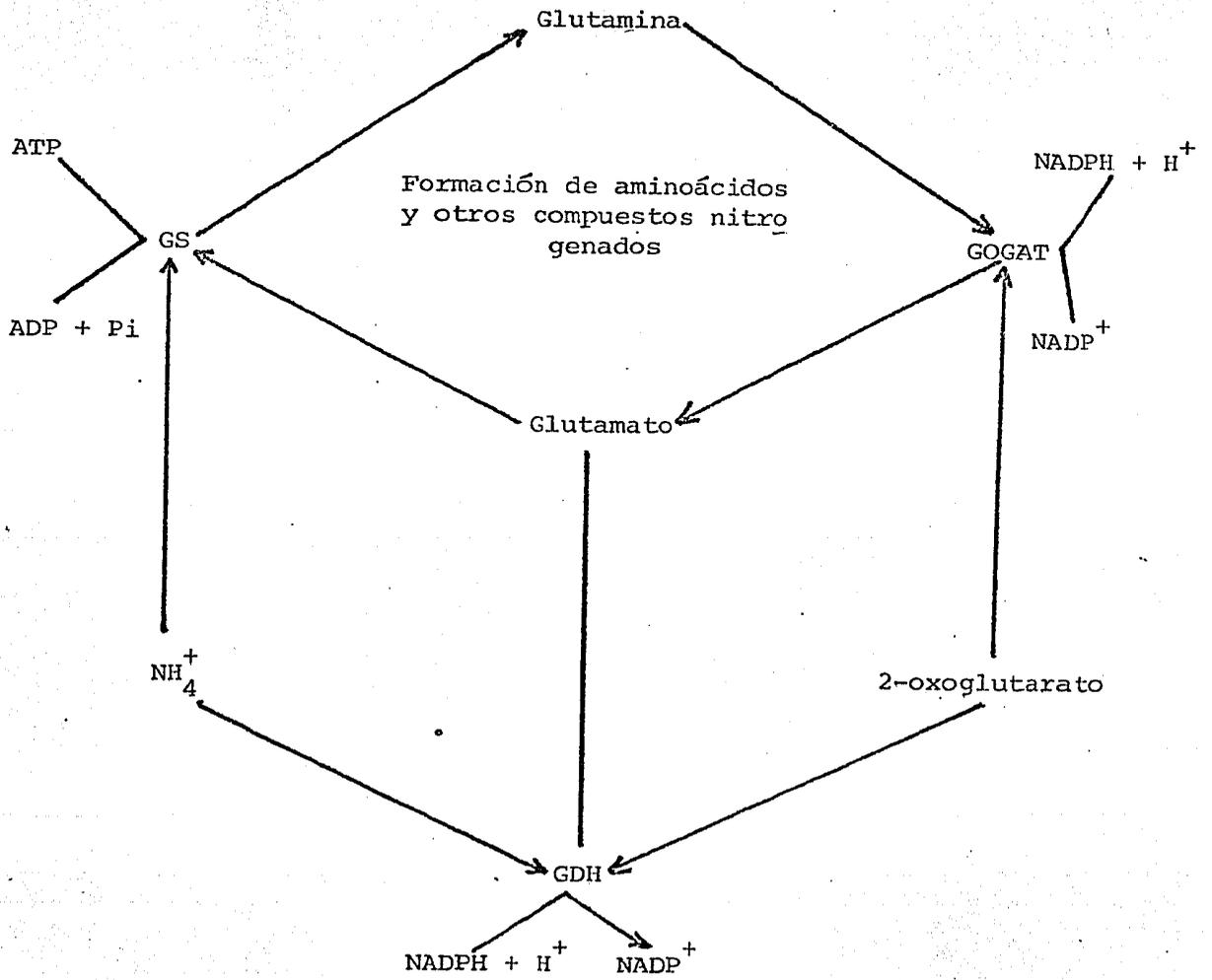
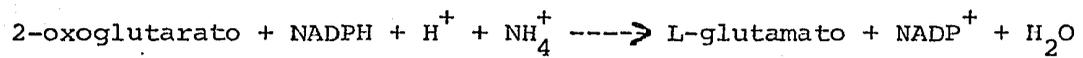
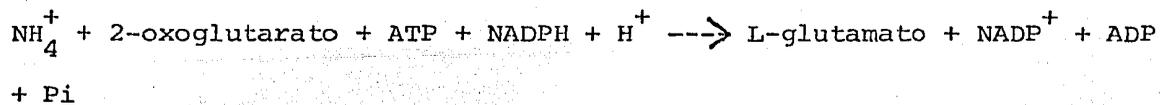
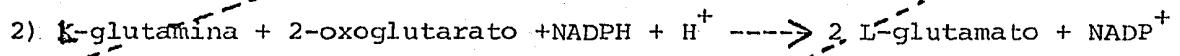
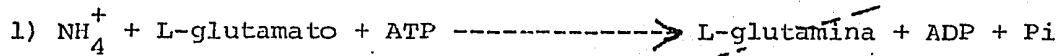


FIGURA 3

GDH



GS-GOGAT



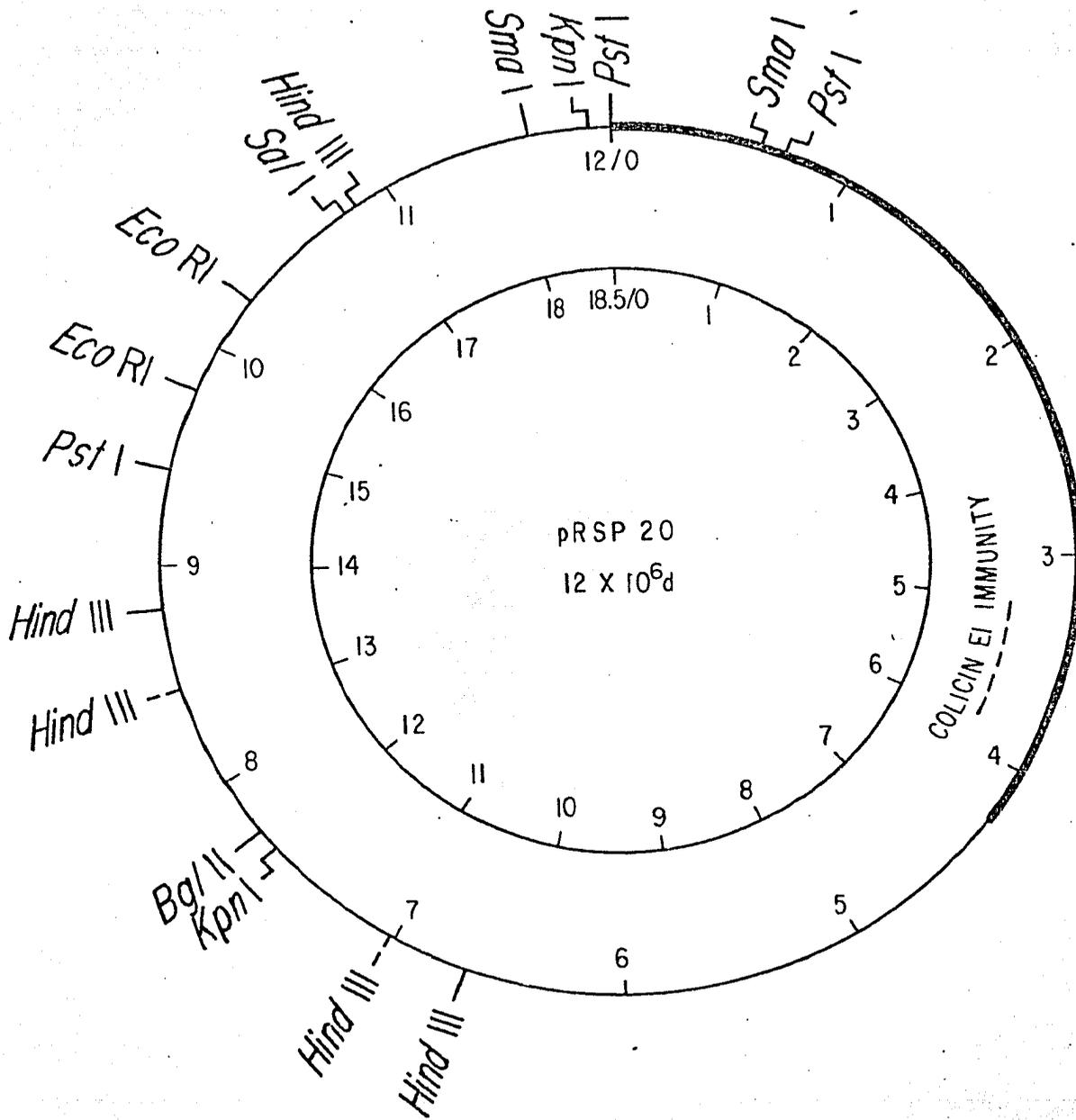


Fig. 4

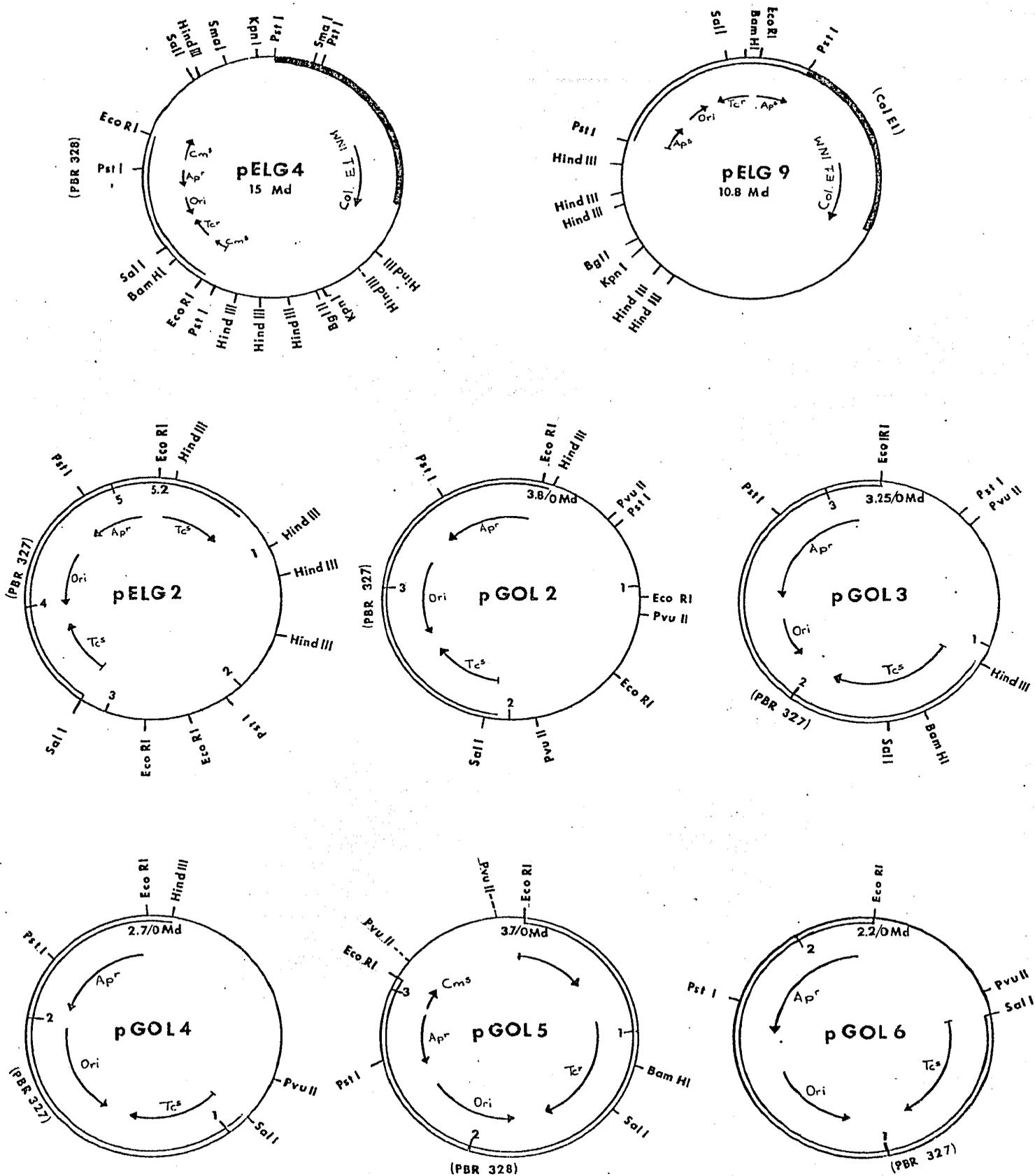


Fig. 5

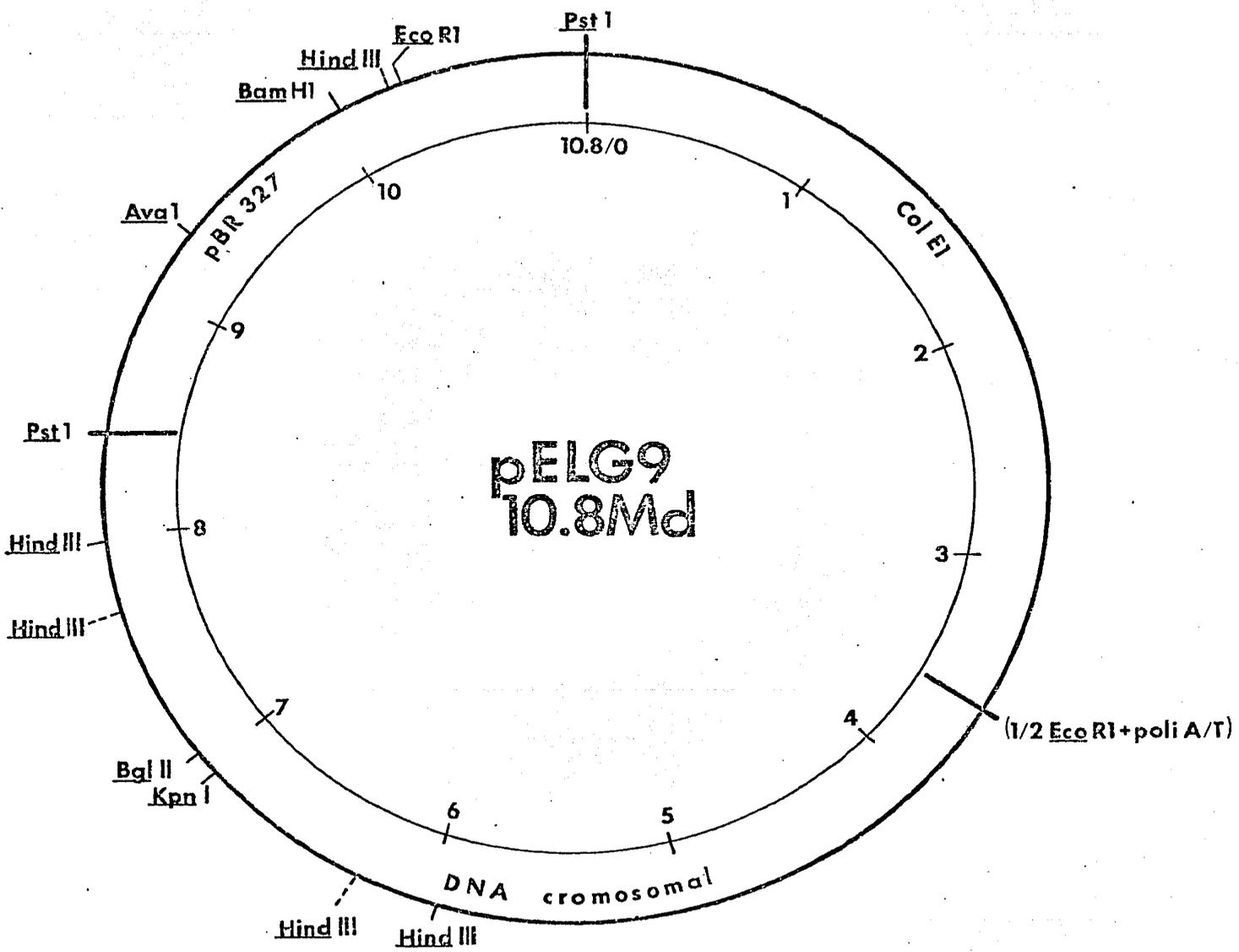


Fig. 6

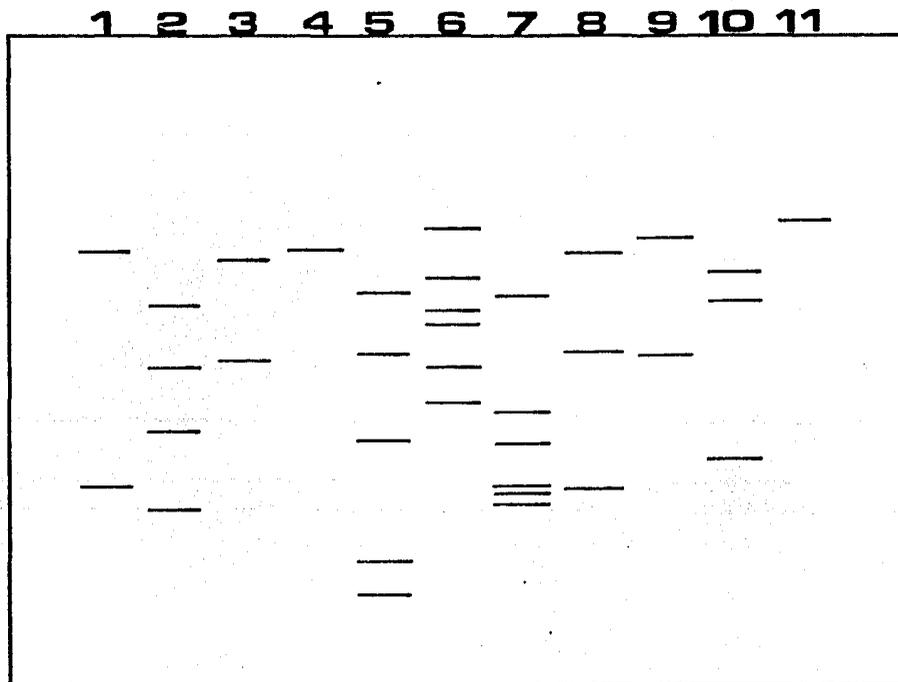
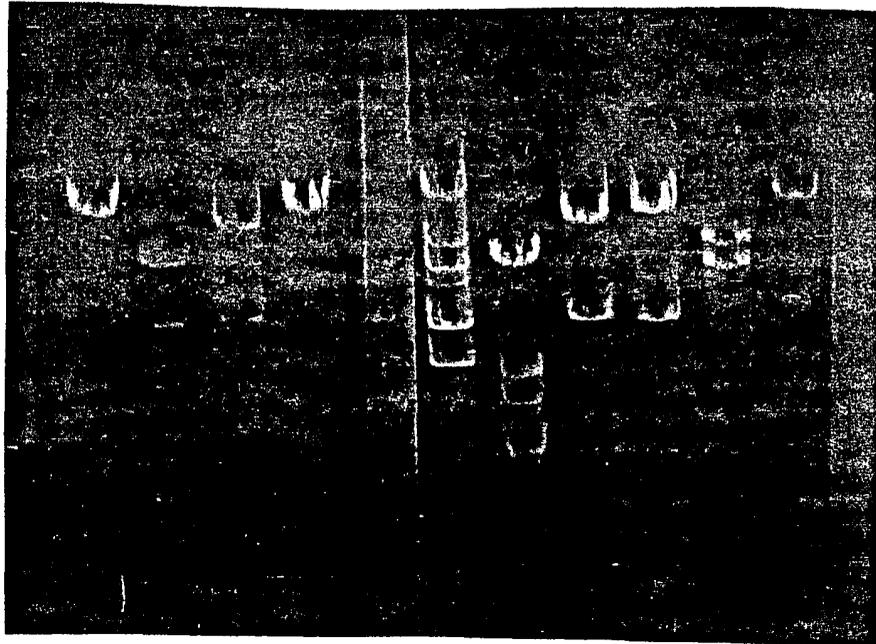


Fig. 7

Digestiones del pELG9: 1. Ava I; 2. Bst EII, 3. Cla I, 4. Eco RI, 5. Hind III, 7. Hinc II, 8. Hpa I, 9. Pst I, 10. Pun II, 11. pELG9 linealizado, 6. marcados de peso molecular: λ /Eco RI + pBR 14 (1.55 MD). pBR 14.

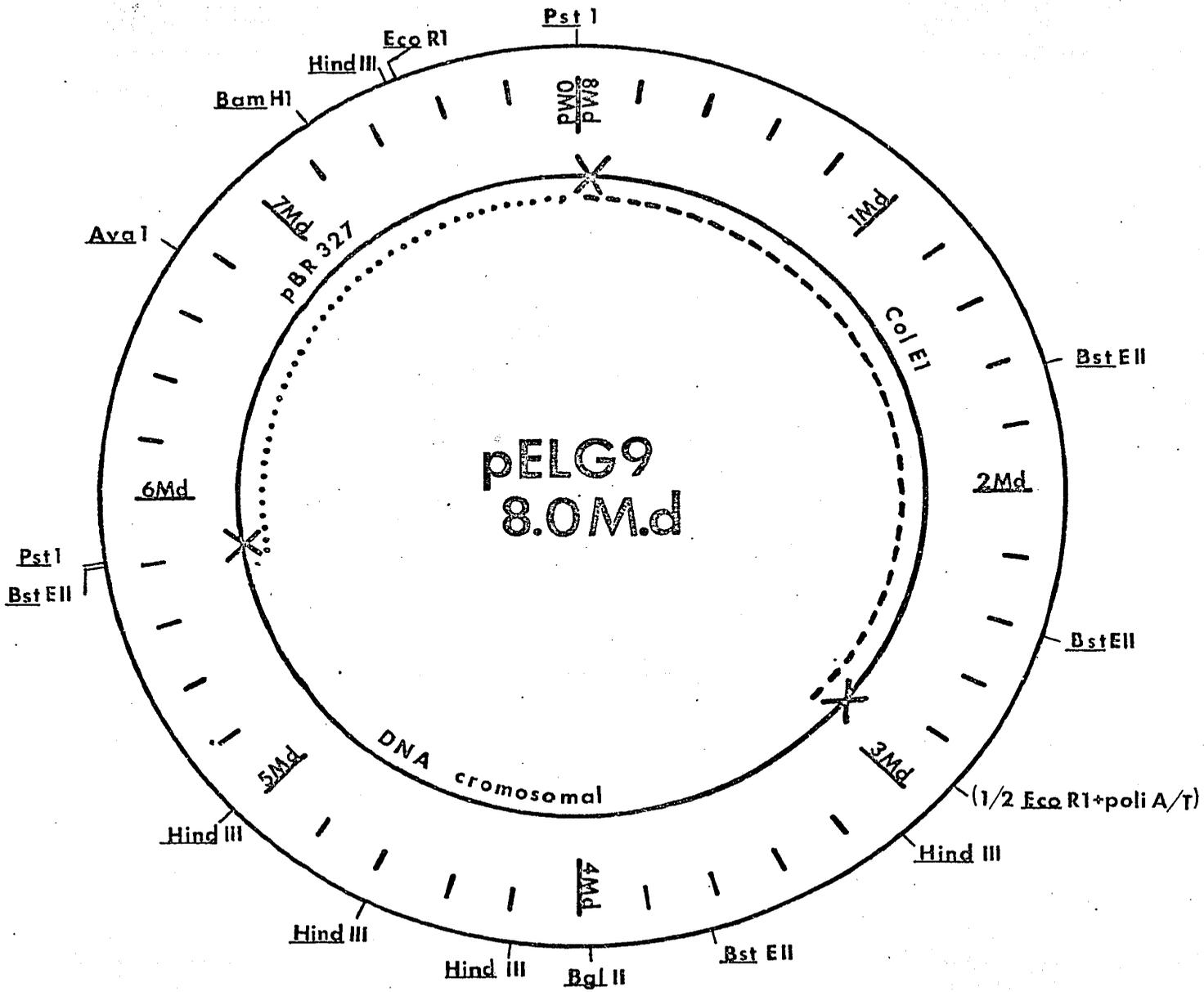
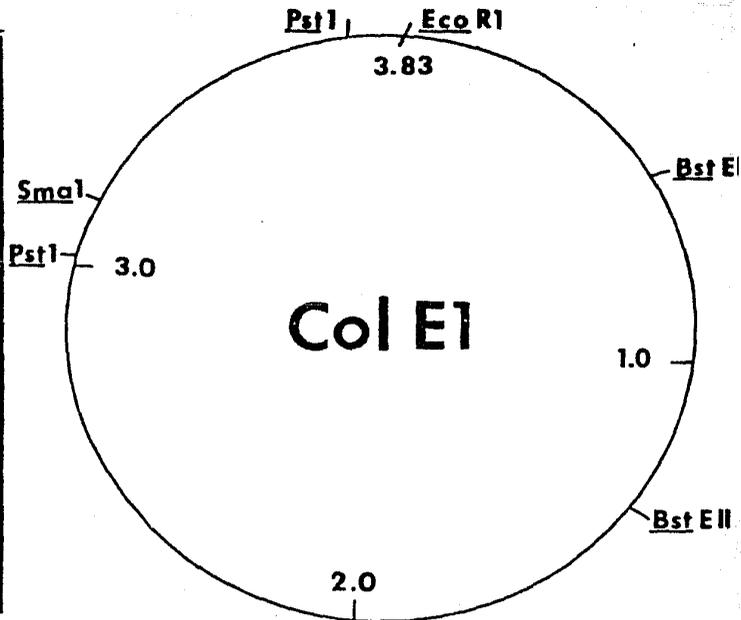
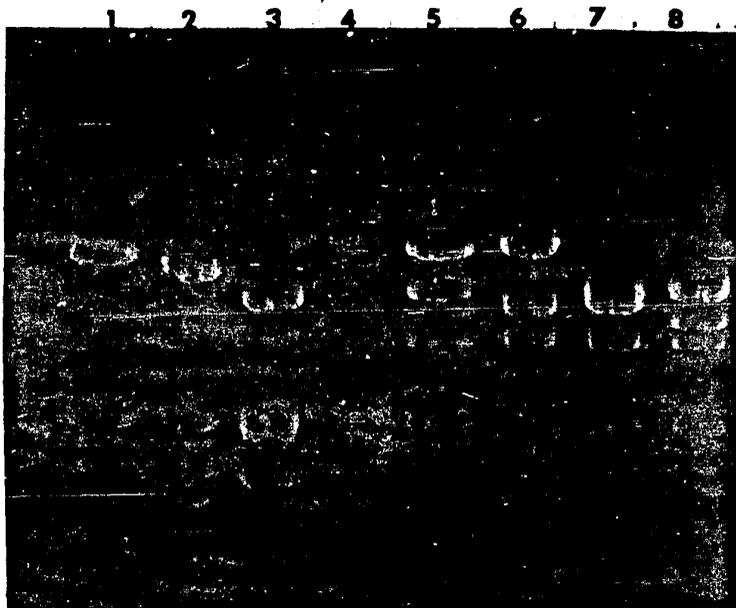
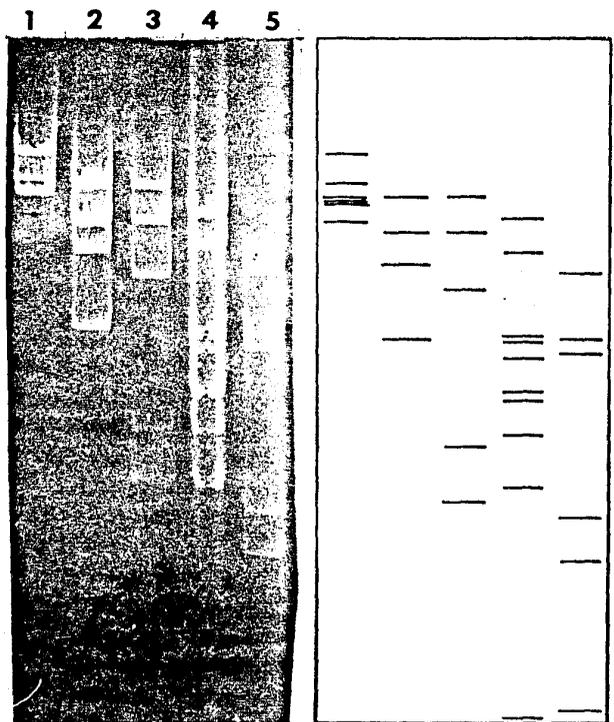
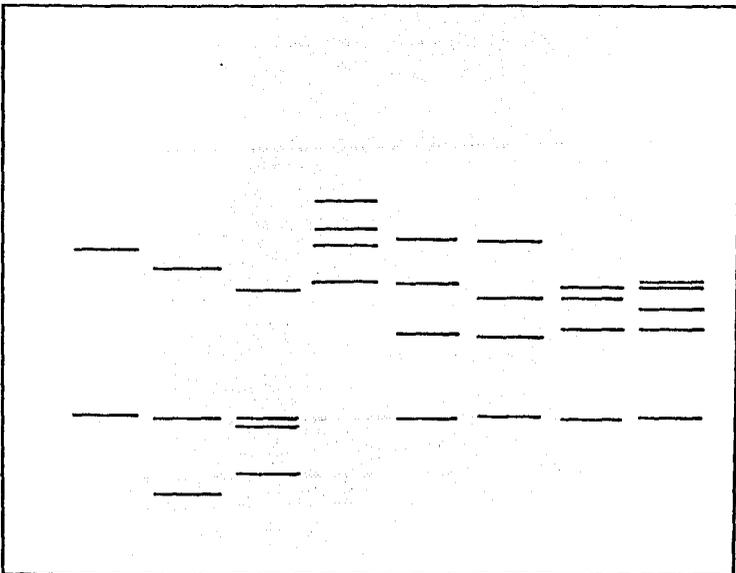


Fig. 8



1. Col EI/Bst EII, 2. Col EI/Bst EII + Eco RI
3. Col EI/Bst EII + Pst I; 4. λ /Eco RI,
5. pELG9/Bst EII, 6. pELG9/Bst EII + Bgl II,
7. pELG9/Bst EII + Pst I; 8. pELG9/Bst EII + Eco RI.



1. λ /Eco RI, 2. pELG9/Bst EII, 3. pELG9/Hind III,
4. pELG9/Hind III + Bst EII, 5. SV40/Hind III.

Fig. 9

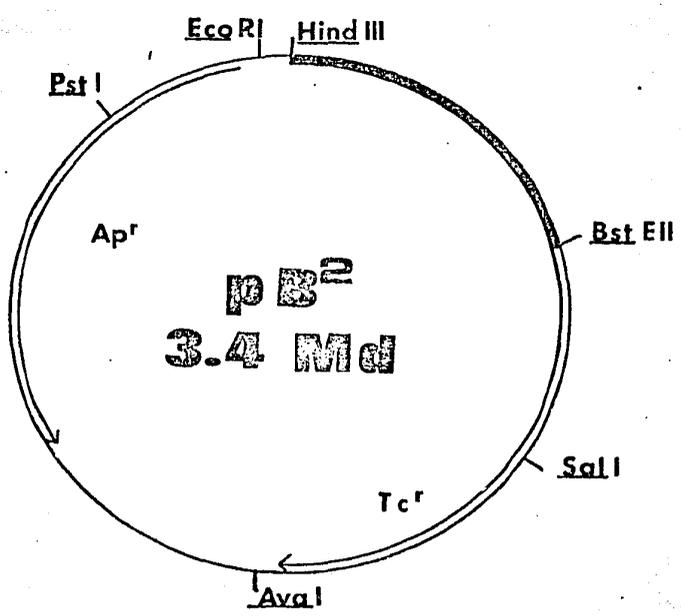
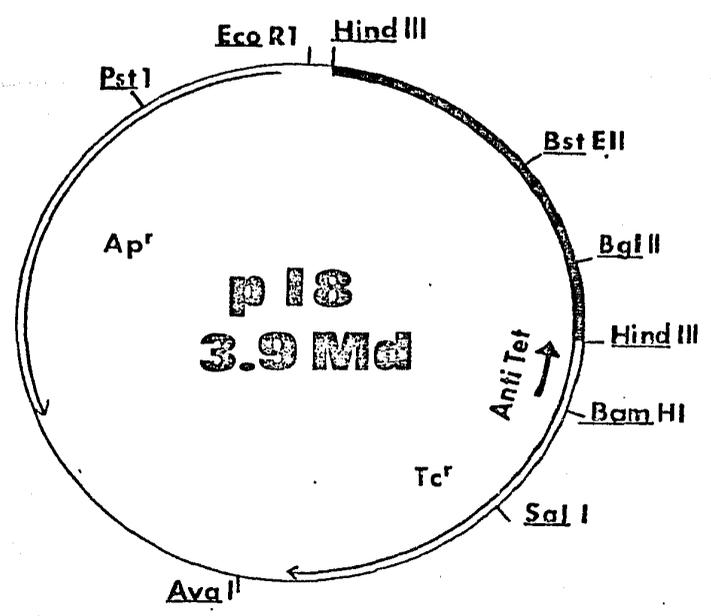
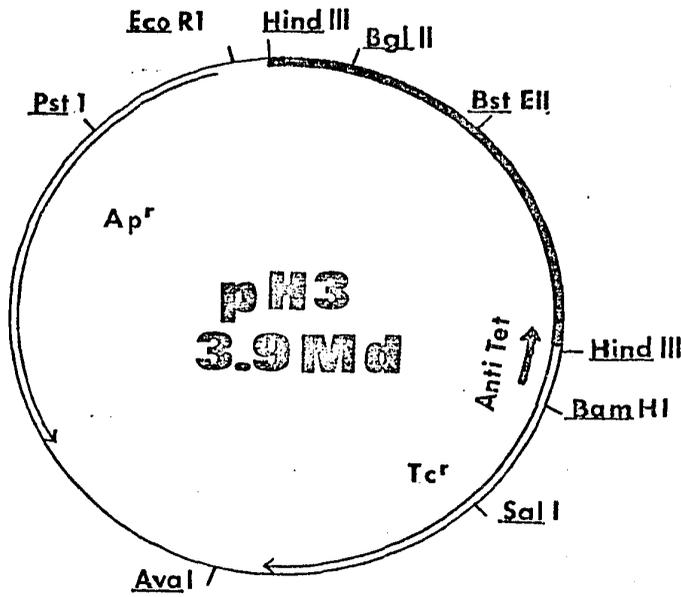
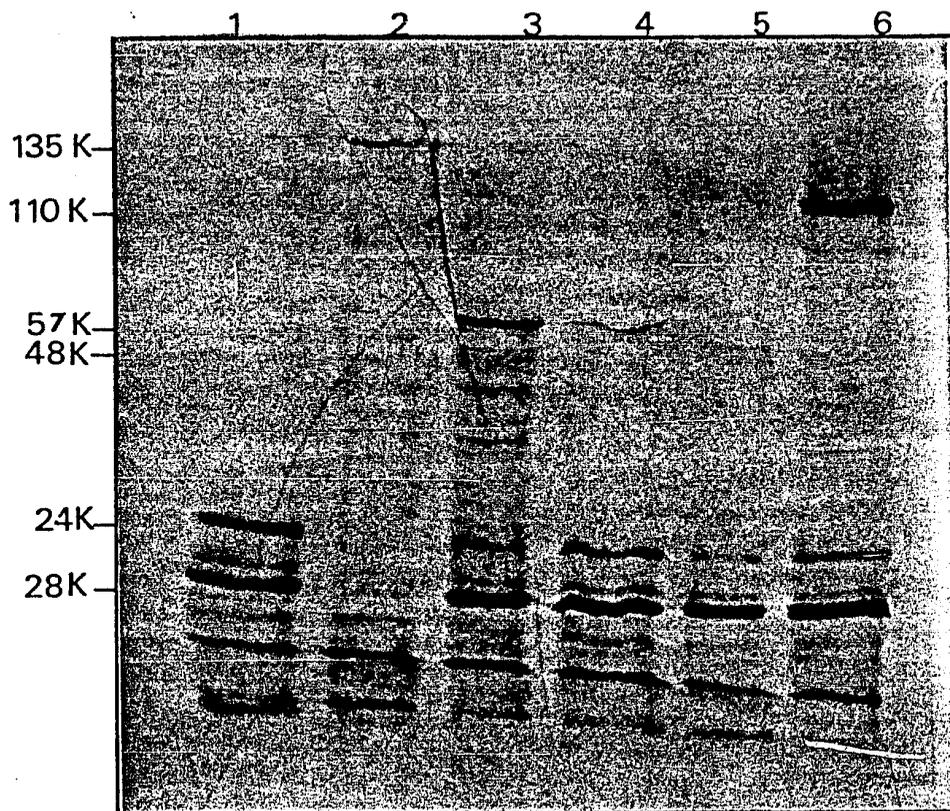


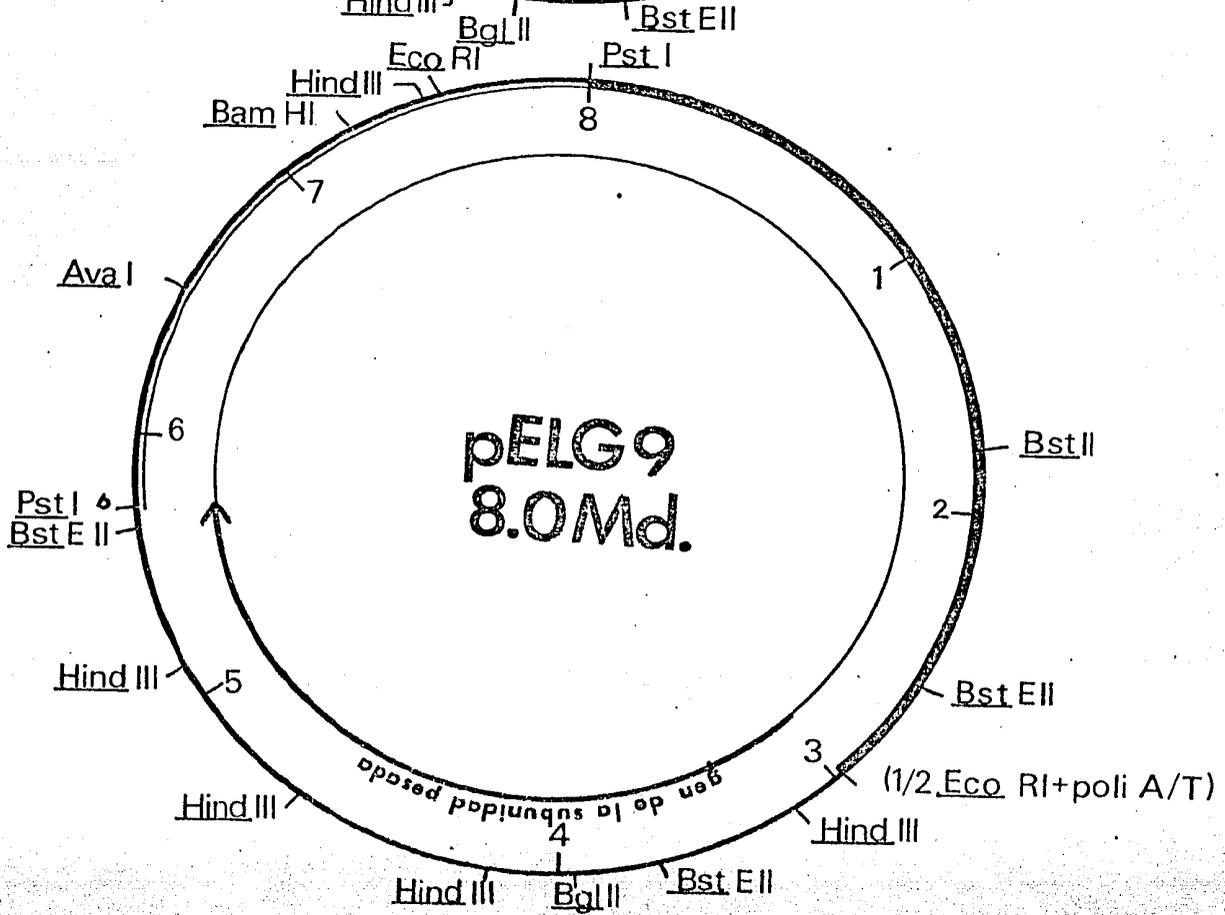
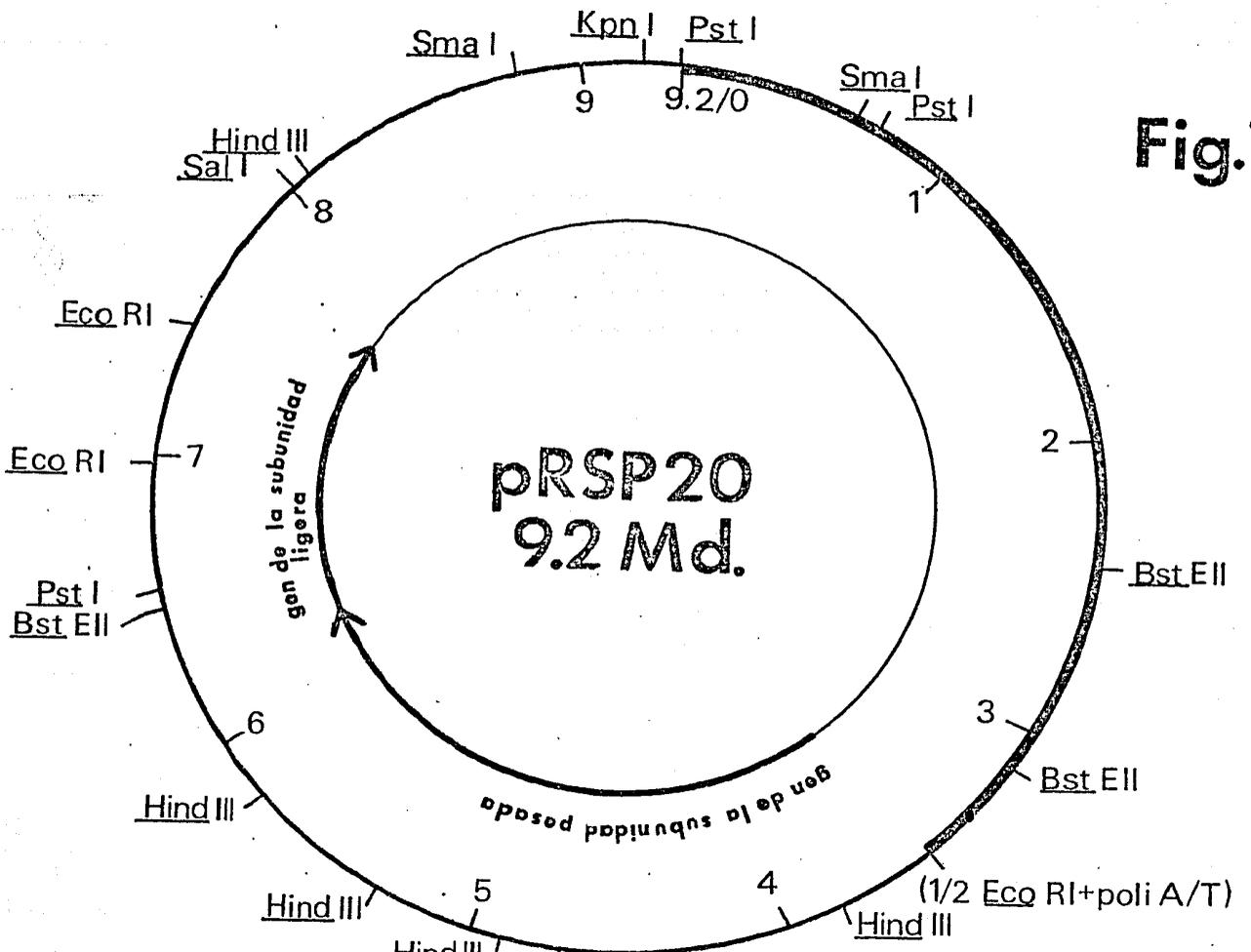
Fig. 10

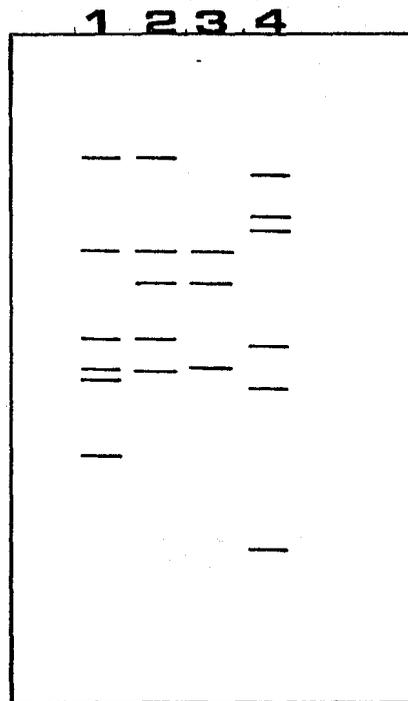
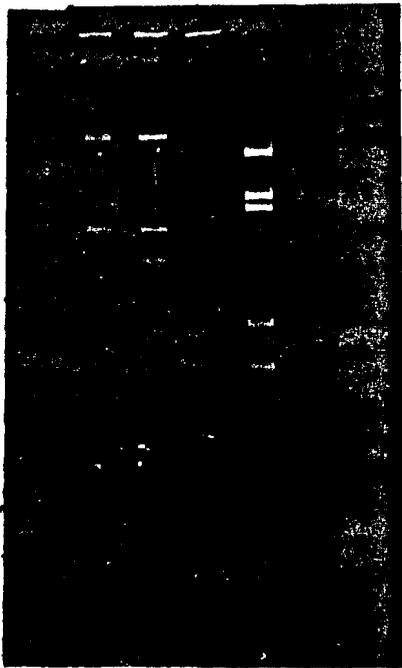


Productos en minicélulas codificados por los siguientes plásmidos: 1. pBR 322, 2. pELG9, 3. pH3, 4. pI8, 5. pB2, 6. pHpa 2.

Fig.11

Fig.12





Unión a RNA polimerasa y controles: 1. p18/Hinc II + Hind III + Bgl II, 2. p18 + Hinc II _ Hind III, 3. p18 + Hinc II + Hind III (fragmentos unidos por RNA pol.), 4. SV40/Hind III.

Fig. 13