

03062
1981

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

**UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONALES Y DE POSGRADO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**



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

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A:**

SUSANA BROM KLANNER

MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1982



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

CARACTERIZACION DE MUTACIONES EN LA REGION *glnA* DEL
CROMOSOMA DE *Escherichia coli*.

Introducción.

El estudio de la regulación de vías metabólicas presenta el interés de poder llegar a entender la fisiología celular. Una vía que presenta grandes atractivos en este aspecto es la de la biosíntesis de glutamina, ya que este aminoácido además de incorporarse a proteínas es el donador de nitrógeno para una serie de compuestos vitales para el crecimiento celular, tales como: aminoácidos, purinas, pirimidinas, etc., (1) (Fig. 1).

La biosíntesis de glutamina es catalizada por la glutamino sintetasa (GS), la cual utiliza ácido glutámico y amonio como sustratos. A su vez, la síntesis de ácido glutámico puede llevarse a cabo a través de la deshidrogenasa glutámica (GDH) a partir de una molécula de α -cetoglutarato y una molécula de amonio o en una reacción catalizada por la glutamato sintetasa (GOGAT), en la cual se obtienen dos moléculas de ácido glutámico a partir de glutamina y α -cetoglutarico.

Estas tres reacciones enzimáticas son las que permiten la incorporación del nitrógeno a los compuestos del metabolismo intermediario que contienen este elemento.

En procaríotes tales como *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes* y *Salmonella typhimurium* se ha utilizado a las GS como modelo para el estudio de la regulación de una enzima que participa en

una vía fundamental para el crecimiento celular. Actualmente se conocen dos niveles de regulación de GS en estas bacterias:

1.- Nivel de actividad.

2.- Nivel de síntesis.

1.- El sistema de regulación de la actividad enzimática de GS fué descrito por Stadtman et al, en 1976 (2); y consiste en un sistema de inactivación por adenilación. La adenilación y desadenilación de GS son catalizadas por la adenilil transferasa (Atasa). Esta enzima cataliza la reacción de adenilación estimulada por la proteína PII, pero cuando esta última se encuentra uridilada, estimula la reacción inversa. La uridilación de la proteína PII se lleva a cabo por la uridilil transferasa (U-Tasa), esta enzima es activada por α -cetoglutárico e inhibida por glutamina; por lo que la reacción de adenilación sucede en uno u otro sentido en función de la relación glutamina/ α -cetoglutárico presente en la célula (3). Esto se encuentra esquematizado en la Fig. 2.

2.- La regulación de la síntesis de GS involucra un sistema bastante complejo. En condiciones de limitación de nitrógeno (bajo amonio, glutámico o glutamina como fuentes de nitrógeno) la GS se encuentra inducida, mientras que en presencia de un exceso de nitrógeno (alto amonio) se encuentra reprimida.

El gene estructural de la GS en *E. coli* (*glnA*) se encuentra localizado aprox. en el minuto 86 del mapa cromosómico, flanqueado por los marcadores *polA* y *rha* (4,5,6). Recientemente se han descrito una serie de genes cuyos productos se requieren para la síntesis de GS; estos son:

a) *glnF*. Este gene se describió inicialmente en *S. typhimurium* (7)

y posteriormente en *K. Aerogenes* (8). El producto de este gene no se ha identificado, pero mutaciones que se localizan en él tienen como resultado una disminución muy considerable en la síntesis de GS; por lo que mutantes *glnF* son auxótrofos de glutamina.

b) *glnG*. A partir de cepas *glnF* se han aislado revertantes capaces de crecer en amonio como fuente de nitrógeno. Estas revertantes presentan una mutación supresora, la cual se ha localizado en el gene denominado *glnG* (9, 10), el cual mapea muy cercanamente a *glnA*. La característica principal de cepas *glnG* es que ésta mutación impide a las células derreprimir su GS en condiciones de limitación de amonio, esto es, las cepas tienen una actividad baja constitutiva de GS, la cual es suficiente para permitirles crecer en amonio. Recientemente, McFarland et al (1981) han obtenido evidencia de que lo que hasta ahora se había considerado como el gene *glnG* corresponde en realidad a 2 genes (*glnG* y *glnL*), que codifican para proteínas de peso molecular de 54 000 y 36 000 daltones respectivamente. Las mutaciones que confieren el fenotipo *glnG* mapean en ambos genes; también se han obtenido mutaciones que tienen como resultado la síntesis constitutiva de GS y que se han localizado en el gene *glnL* (41, 42, 43).

Otra característica interesante tanto de las cepas *glnG* como de las *glnF* y *glnA* es que los tres tipos de mutaciones confieren a las células una incapacidad de utilizar una serie de amino ácidos como fuente de nitrógeno; tales como arginina, prolina, etc. A este fenotipo se le ha denominado Reg^- (9, 10, 11).

Para explicar que cepas *glnA* o *glnF* tengan el fenotipo Reg^- , se puede pensar que esto se debe a que en presencia de por ejemplo

arginina como fuente de nitrógeno, no crecen porque la ausencia total o parcial de actividad de GS le impide sintetizar la glutamina que requieren tanto para incorporación a proteínas como para la distribución del nitrógeno a otros compuestos celulares.

Alternativamente, se ha sugerido que la GS está directamente involucrada en la utilización de los aminoácidos como fuente de nitrógeno (11,12).

El hecho de que cepas *glnG* también presentan el fenotipo Reg^- , a pesar de que estas cepas sí pueden sintetizar la glutamina necesaria para su crecimiento, sugiere que posiblemente los productos de los genes *glnG* y *glnI* son los responsables del fenotipo Reg^- .

Con los datos anteriormente mencionados, Kustu et al (1979) (10) y Macneil et al, (1981) (43) han propuesto un modelo de regulación de GS en el cual se postula que se requieren los productos de los genes *glnG*, *glnI* y *glnF* para la activación de *glnA* cuando la célula se encuentra limitada de amonio, y que, en condiciones de exceso de nitrógeno, los productos de *glnI* y *glnG* son capaces de reprimir la transcripción de *glnA*.

Por otra parte, Foor et al. (13) tienen datos que sugieren que la proteína PII, además de funcionar como catalizador en las reacciones de adenilación y desadenilación, participa también en la regulación del nivel de GS (13); ya que mutantes que carecen de la proteína PII son incapaces de reprimir su GS aún en presencia de un exceso de nitrógeno y mutantes que tienen una alteración en la proteína PII que la hace incapaz de utilizarse presentan siempre un nivel muy bajo de GS.

La hipótesis de que la GS es capaz de regular su propia

síntesis se defendió durante mucho tiempo (14,15,16,17); recientemente esta hipótesis se ha descartado; por medio del estudio de cepas con fusiones entre el promotor de *glnA* y el gene *lacZ* que codifica para la enzima β -galactosidasa (18). A pesar de que los resultados muestran que no se requiere GS para activar o reprimir la transcripción de *glnA*, sugieren que la GS es capaz de modular la expresión de *glnA*, en función del nitrógeno asequible en el medio de cultivo. Esta modulación puede deberse directamente a la molécula de GS, es decir a la capacidad de sintetizar glutamina.

Con el interés de entender un poco mejor cómo se regula el metabolismo nitrógenoando, específicamente a través del estudio de la regulación de la síntesis de GS; nos propusimos aislar una serie de mutantes que tuvieran alteraciones en el gene *glnA* y en las regiones que regulan su transcripción y caracterizarlas tanto genéticamente como bioquímicamente.

Con la idea de aislar posteriormente una serie de deleciones en la región *glnA* del cromosoma de *E. coli*; se obtuvo una cepa, denominada MX752, que tiene el bacteriofago lambda *Kan2 b515, b519, c1857, s7 Tn5* integrado entre los genes *glnA* y *rha* (19). Esta cepa se sometió a una curación de lambda por termoinducción y posteriormente se llevaron a cabo enriquecimientos con penicilina en presencia de amonio como fuente de nitrógeno; finalmente se seleccionaron aquellas cepas que crecían bien en presencia de glutamina y no lo hacían o crecían mal en amonio. De esta manera se obtuvieron cinco mutantes, cuyas características fenotípicas se encuentran en la Tabla 1. Se puede observar que entre las mutantes obtenidas hay dos (MX762 y MX763) que son sensibles a Kanamicina; mientras que las tres restantes

(MX768 y MX769) son Kan^R. Pensamos que las cepas Kan^S pudieron generarse por escisión imprecisa a partir de Tn5 y las Kan^R se deben a escisiones precisas a partir de Tn5.

También me gustaría señalar que las mutaciones obtenidas difieren entre ellas en su fenotipo.

Las cepas MX762 y MX764 son mutantes totales de GS, o sea, solamente crecen en presencia de glutamina como fuente de nitrógeno no presentan actividad detectable de GS ni tienen un antígeno capaz de cruzar con anticuerpos anti-GS y presentan el fenotipo Reg⁻.

Las cepas MX763, MX768 y MX769 si son capaces de utilizar amonio como fuente de nitrógeno, aunque su crecimiento solamente es óptimo en presencia de glutamina. La cepa MX763 tiene actividad baja constitutiva de GS, no inducible por limitación de nitrógeno. La cepa MX768 presenta una actividad de GS más alta cuando se ha cultivado en presencia de amonio que cuando se crece en glutamina, exactamente el contrario de lo que sucede en la cepa silvestre; también es importante hacer notar que el crecimiento de la cepa MX768 en presencia de amonio como fuente de nitrógeno presenta una fase lag de aprox. 12 horas. Por último, la cepa MX769 presenta también una actividad baja constitutiva de GS; aunque a diferencia de la MX763 sí es capaz de inducir su GS en ciertas condiciones (amonio o glutamina limitados).

La cepa MX769 presenta el fenotipo Reg⁺, mientras que la MX763 y la MX768 son Reg⁻.

Estas cepas se analizaron genéticamente por cruzas por transducción, encontrándose que las dos auxótrofas totales (MX762 y MX764) son incapaces de generar recombinantes silvestres. (Gln⁺)

al cruzarlas entre si; lo mismo sucede en cruza entre la MX768 y MX769. La cepa MX763 sí es capaz de cruzar con las demás cepas para dar lugar a recombinantes Gln^+ tipo silvestre.

Además de las mutantes descritas; se han aislado otras a partir de la misma cepa (MX752) y utilizando el mismo procedimiento. Dos de ellas denominadas MX850 y MX852 son auxótrofos totales de glutamina, carecen de actividad detectable de GS y no son capaces de recombinar con las cepas MX762 y MX764. (L. Servín, datos no publicados). Menciono las características de estas cepas porque es interesante que en dos aislamientos totalmente independientes se hayan obtenido el mismo tipo de mutantes.

En resumen, podemos decir que contamos con una serie de mutantes que carecen totalmente o tienen alterada la actividad de GS; éstas se pueden dividir en 2 grupos:

1.- Auxótrofas totales de glutamina- ya que las mutaciones se generaron por escisión de un fago lambda integrado entre *glNA* y *rha*, pensamos que estas cepas tienen deleciones que cubren desde el sitio de inserción de lambda hasta *glNA*.

2.- Auxótrofos parciales de glutamina.- Estas cepas presentan alteraciones en la regulación de GS y son capaces de recombinar con las del tipo 1, por lo que, en caso de ser deleciones; deben cubrir desde el sitio de inserción de lambda hacia *rha*.

Con el objeto de hacer un estudio más a fondo de estas mutantes, en este trabajo nos hemos propuesto analizar los siguientes puntos:

1.- En las auxótrofas parciales de glutamina, ¿La alteración en la actividad de GS se debe a cambios regulatorios? o ¿existe la posibilidad de que la proteína de GS como tal haya sufrido un cambio?

2.- Consideramos necesario mapear con mayor exactitud que tanto material genético cubren las deleciones.

3.- Hacer estudios de relaciones dominancia/recesividad entre las diferentes mutantes.

Material y Métodos

1.- Cepas bacterianas.

Las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo se encuentran listadas en la Tabla 2.

2.- Medios de cultivo.

Para la realización de los experimentos, las cepas bacterianas se crecieron hasta fase exponencial en medio luria (20) (bactotripton 1%, extracto de levadura 0.5%, cloruro de sodio 1%) o en medio mínimo NN (21) (KH_2PO_4 1.00mM, K_2SO_4 14.9mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.83mM, CaCl_2 0.901mM, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.018mM) suplementado con 0.2% de glucosa como fuente de carbono y con fuentes de nitrógeno variables:

- cloruro de amonio 0.5 mM
- cloruro de amonio 15mM
- glutamina 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- glutamina 1 mg/ml
- arginina 0.2%

Los demás requerimientos de las cepas, como aminoácidos y vitaminas se agregaron a una concentración final de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

3.- Determinación de la actividad enzimática de GS.

La actividad de transferasa de GS se midió según el ensayo reportado por Shapiro y Stadtman (22) con las modificaciones introducidas por Bender y Magasanik (23). Las determinaciones de proteína se efectuaron según el método descrito por Lowry (24). La actividad específica está expresada en unidades de enzima/mg de proteína.

4.- Purificación de GS por afinidad a safarosa-antranílico (25,21).

Preparación de extracto:

Se creció un cultivo de cada cepa hasta fase exponencial (100 u. Klett; tras centrifugar el cultivo, el paquete celular se lavó dos veces con buffer de extracción (EDTA 0.5 mM, K_2HPO_4 5 mM pH7.2. Cada paquete celular se resuspendió en aprox. 25 ml de buffer de extracción + 2.25 mM $MnCl_2$ y se sonicó para lisar las células. La suspensión se centrifugó a 10 000 rpm (Sorvall, rotor SS34) y se recuperó el sobrenadante (extracto).

Purificación.-

El extracto se pasó por una columna de sefaroza-antranílico previamente equilibrada con buffer de extracción +2.25 mM $MnCl_2$. La columna se lavó con cinco volúmenes de buffer de extracción, se colectaron fracciones de 1 ml y se les determinó actividad de GS. Posteriormente se eluyó con 5 volúmenes de AMP 50 mM se colectaron fracciones de 0.5 ml y se les determinó actividad de GS; el pico de actividad se precipitó con sulfato de amonio al 70% de saturación. La suspensión se centrifugó a 10 000 rpm por 15 min., el precipitado se resuspendió en buffer de extracción y se dializó vs. el mismo buffer. La solución de enzima purificada se mantuvo a $-70^{\circ}C$.

5.- Purificación de GS por precipitación con sulfato de zinc (26).
preparación de extracto.

Se creció un cultivo de cada cepa hasta fase exponencial; se centrifugó lavó y resuspendió en buffer imidazol 10 mM, $MgCl_2$ 50 mM pH. 7.0. La suspensión celular se sonicó y centrifugó a 19 000 rpm por 30 min y se recuperó el sobrenadante (extracto).

Purificación:

El extracto se ajustó a pH de 5.85, se le agregó 0.1 gr de

de estreptomycinina por cada 10 ml de extracto. La mezcla se dejó en agitación por 15 min a 4°C, tras lo cual se centrifugó a 19 000 rpm por 30 min. Se recuperó el sobrenadante, al cual se le agregó ZnSO₄ hasta llegar una concentración de 1.5 mM y se incubó por 30 min a 25°C con agitación ocasional; la mezcla se centrifugó por 30 min a 29 000 rpm; tras descartar el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en buffer imidazol 10 mM MgCl₂ 50 mM y después de centrifugar 30 min a 19 000 rpm, el precipitado se resuspendió en buffer imidazol 10 mM MgCl₂ 2.5 mM.

La suspensión se incubó 30 min a 25°C, tras agregar MgCl₂ hasta llegar a 50 mM, posteriormente se centrifugó 30 min a 19 000 rpm y finalmente el precipitado se resuspendió en buffer imidazol 10 mM MgCl₂ 2.5 mM. La solución de enzima se mantuvo congelada a -20°C.

En cada paso se determinó la actividad de GS.

6.- Electroforesis.

La electroforesis de las enzimas puras se llevó a cabo según la técnica reportada por Laemmli (27), en geles de acrilamida al 11% + SDS 0.1%.

7.- Obtención de cepas con las mutaciones *glnA20* y *glnA21* en el F merogenote F'14.

La cepa AB1206 es portadora de un F' primario (F'14) que contiene aproximadamente 10 min. de cromosoma de *E. coli*; incluyendo la región *glnA*, *polA* y el operón de *rha*.

Para transferir las mutaciones *glnA20* *glnA21* portadas por las cepas MX705 y MX727 respectivamente, al F merogenote F'14, se aprovechó al hecho de que los marcadores *glnA* y *rha* son contras-

ducibles por P1 (6). En primer lugar se obtuvo una derivada Rha^- de la cepa portadora de F'14 (AB1206) por mutagenesis con etil metano sulfonato (A. Osorio, datos no publicados). Posteriormente esta cepa se utilizó como receptora en transducciones con P1; usándose como donadoras de P1 a las cepas MX705 y MX727, se seleccionaron transductantes Rha^+ y entre estas se aislaron las recombinantes Gln^- , que en el caso donde se utilizó la cepa MX705 como donadora se debían a la transferencia de la mutación glnA20 y en el caso de la cepa MX727 a la mutación glnA21 . De esta manera se obtuvieron las cepas MX821 y MX822, que llevan F'14 glnA21 y F14 glnA20 respectivamente.

El método de transducción se ha descrito anteriormente (28).

8.- Método de conjugación.

Para el aislamiento de exconjugantes se siguió la técnica reportada por Miller (20). Las cepas donadora y receptora se crecieron hasta fase exponencial en medio Luria. Se mezclaron ambas cepas con relación 10:1 de receptora:donadora. La mezcla de conjugación se incubó por 2 horas a 37°C, sin agitación. Posteriormente se lavó con medio NN y finalmente se plaqueó sobre cajas petri con medio selectivo, las cuales se incubaron por 48 hrs. a 37°C.

9.- Purificación de DNA cromosomal.

Se creció un cultivo de 1 lt. de cada cepa en medio Luria; tras centrifugar, los paquetes celulares se resuspendieron en 10ml/lt de cultivo de buffer sacarosa 25% Tris 50mM EDTA 1mM pH8.0, y se añadió lo siguiente en el orden dado:

- 3ml EDTA 0.25 pH8.0
- 1ml lisozima 5mg/ml (en Tris 0.025M pH8.0)
- 0.1ml RNasa 10mg/ml (en acetato de sodio 0.1M, EDTA 3.3×10^{-5} M-
pH5.0)

Tras dejar reposar la suspensión por 15 min a 4°C, se añadieron 3ml de la mezcla lítica de Tritón 3x; y se dejó reposar otros 15 min. En seguida se centrifugó por 30 min a 17 000 rpm (Sorvall SS34) se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en aprox. 10ml de buffer A (Tris 0.05M, 2.0mM EDTA, 0.5% SDS pH 7.5).

La suspensión se incubó por 60 min a 37°C, tras agregar 1/10 de volumen de proteasa K (5mg/ml en buffer A).

El lisado se extrajo dos veces con dos volúmenes de fenol; cloroformo: isoamílico (25:25:1) y una vez con 2 volúmenes de cloroformo. Finalmente la fase acuosa se precipitó con dos volúmenes de etanol frío + 1/25 de NaCl 5M. El precipitado se resuspendió en 5 ml buffer B (Tris 50mM, EDTA 2M pH 7.5).

Se le agregó RNasa (en buffer B) ajustando a una concentración final de 0.5mg/ml y se incubó por 60 min a 37°C. Al término de este tiempo se repitieron las extracciones y la precipitación con etanol. Por último el precipitado se resuspendió en buffer TE (Tris 10mM EDTA 1mM pH8) y se dializó contra el mismo buffer.

La preparación de DNA purificado se mantuvo congelado a -20°C.

10.- Hibridizaciones DNA-DNA según la técnica de Southern (29,30).

Electroforesis:

Las muestras de DNA cromosomal digeridas con enzimas de

restricción en las condiciones reportadas por Bolívar (31) se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, el buffer de corrida (Tris base 80mM, acetato de sodio 40mM, cloruro de sodio 36mM, EDTA 4 mM pH 8.15) se recirculó utilizando una bomba peristáltica. El gel se corrió a 50 volts por 5 hrs aproximadamente.

Para desnaturalizar el DNA, el gel se mantuvo por 30 min en NaCl 1.0M, NaOH 0.5M y para neutralizar se incubó dos veces por 20 min en tris 1M, NaCl 3M pH 7.5.

Transferencia:

Sobre una base, la cual estaba en una charola que contenía 2 lt de buffer SSC 6x (0.15M NaCl 0.015M citrato de sodio pH 7.0) se puso una tira de papel Whatman 3MM (que forma el puente para subir el buffer); encima de ésta se puso el gel, previamente enjuagado en buffer SSC 6x. Encima del gel se colocó el filtro Schleicher & Schuell BA85 y en seguida se colocó el filtro Whatman 3MM del tamaño del gel. Sobre del filtro se colocó medio paquete de toallas sanitas para absorber el buffer y un peso de aprox. 0.5 Kg. La transferencia se permitió proceder durante dos días, cambiando las toallas sanitas en caso necesario.

Al término de los dos días se desmontó el aparato de transferencia, el filtro Schleicher & Schuell se dejó secar entre dos hojas de papel Whatman 3MM a 37°C y posteriormente se colocó en un horno a 80°C al vacío durante 4 hrs. para fijar el DNA al filtro.

Hibridización:

La prehibridización se llevó a cabo colocando los filtros en bolsas con 5 ml de buffer de hibridización (2.5 ml formamida desionizada, 1.25 ml SSC20X, 0.05 ml SDS 10%, 0.05 ML EDTA 0.1M,

0.05 ml Tris 1M pH7.5, 0.5 ml Denhart's 10X:SSC 3X, 0.02% Ficoll, 0.02% polivinil pirrolidona, 0.02% albúmina serica bovina, 0.5ml agua + DNA desnaturalizado) conteniendo 50 µg de DNA (De timo de ternera) frío. Las bolsas se incubaron por 12 hrs. a 37°C.

Al término de este tiempo se decartó el buffer de prehibridización conteniendo 50 µg de DNA frío y 2×10^6 cpm de DNA marcado con ^{32}P , desnaturalizados a cada bolsa. Las hibridizaciones se incubaron por 48 hrs. a 37°C.

Lavado:

Se desechó el líquido de las bolsas de hibridización y cada filtro se suspendió en un volumen grande (1 lt) de SSC 2X SDS 0.1% a temperatura ambiente por 15 min con agitación ocasional y posteriormente en un segundo recipiente con SSC 0.1X SDS 0.1% incubándose a 50°C por 15 min. Finalmente el SDS se lavó con SSC-0.1X.

Los filtros se secaron a 37°C, colocándose entre 2 hojas de papel Whatman 3MM, se sometieron a autorradiografía a -70°C y se revelaron después de 12 a 36 horas.

Marcaje de DNA "in vitro" con ^{32}P :

El marcaje del DNA de plasmidos con ^{32}P se efectuó utilizando el sistema de nick-translation de la New England Nuclear.

11.- Aislamiento de derivadas Kan^S.

El aislamiento de derivadas Kan^S a partir de cepas con Tn5 integrado se llevó a cabo de la siguiente manera:

Las cepas se crecieron hasta fase exponencial en medio Luria; en este momento se agregaron 4 µg/ml de Kanamicina, la cual

es una concentración subletal de este antibiótico (ver Fig. 8) y 2500 μ /ml de penicilina; tras aprox. 2 horas de incubación, las células sobrevivientes se lavaron y se les dió 12 horas de tiempo de expresión en Luria. Después de plaquear las células sobre cajas de petri con medio Luria e incubarlas 24 horas a 37°C se probó el crecimiento de las colonias obtenidas en presencia y ausencia de Kanamicina, aislandose finalmente aquellas cepas que ya no eran capaces de crecer en presencia del antibiótico.

RESULTADO Y DISCUSION

1.- Purificación de GS.

Con el objeto de determinar si en las auxótrofas parciales de glutamina: MX763, MX768 y MX769 las alteraciones en la actividad de GS se debían a cambios regulatorios o a que la proteína de GS hubiera sufrido directamente una alteración; se hicieron experimentos de purificación de la GS de las tres cepas; para comparar la proteína de las mutantes con la de la cepa silvestre.

Esta pregunta surgió porque dos de las mutantes: MX768 y MX769 presentaron actividad de GS y antígeno capaz de cruzar con anticuerpos anti-GS, pero en la cepa MX763 nunca se pudo detectar el antígeno de GS a pesar de que la cepa presentaba actividad enzimática y fué capaz de utilizar amonio como fuente de nitrógeno (Tabla 1). Pensamos que existían dos posibles explicaciones para esta paradoja: La primera es que la cantidad de antígeno de GS presente en la MX763 fuera insuficiente para poder formar una malla de precipitación con el anticuerpo y la segunda es que el antígeno de GS de esta cepa difiriera del antígeno de la cepa silvestre de tal manera que ya no fuera reconocido por el anticuerpo. Para obtener una mutación de este tipo (con actividad pero antigenicamente diferente) habría que pensar que la escisión del λ Kan2 que originó la cepa MX763, dió lugar a una fusión de -

glnA a otro gene; dando como resultado un producto híbrido antigénicamente diferente de GS. En la literatura existen ejemplos donde se generan enzimas bifuncionales por fusión de genes adyacentes (32,33).

Se utilizaron 2 métodos para las purificaciones de GS;

- 1.- Por afinidad a sefarosa-antranílico. Este método se reportó originalmente para la purificación de GS en *N. crassa* (25); pero también se ha utilizado para purificar la GS de *E. coli* (21).
- 2.- Por cristalización de GS con sulfato de zinc (26).

Al correr un gel de acrilamida SDS de las enzimas purificadas por el primer método (afinidad a sefarosa-antranílico) a partir de las cepas MX768 y MX769, se puede observar (Fig. 3) que el monómero de GS de éstas comigra con el de la cepa silvestre (MX615); mientras que en el carril donde se encuentra la preparación de la cepa MX763 no se observa ninguna banda que comigre con el monómero de GS de la cepa silvestre.

En la Fig. 4 se puede observar la GS purificada a partir de la cepa MX763 y de la cepa silvestre, por el método de cristalización con sulfato de zinc corridas en un gel de acrilamida-SDS. Es interesante que aquí se puede ver la comigración de los monómeros de ambas enzimas. Si las enzimas de ambas cepas se someten a electroforesis en un gel de acrilamida sin SDS, y éste se tiñe por actividad de GS, se puede observar también que la enzima de la mutante es idéntica a la de la cepa silvestre (datos no presentados).

A partir de estos resultados podremos concluir que la GS de mutantes no se encuentra alterada, sino que es idéntica a la

de la cepa silvestre. Estos resultados concuerdan con lo esperado para la cepa MX768 y MX769, ya que sabíamos que la GS de estas cepas es capaz de cruzar con anticuerpo anti-GS. En cuanto a la GS de la cepa MX763, donde teníamos dudas en cuanto a la estructura de la enzima, los resultados también indican que ésta no difiere de la GS de la cepa silvestre; debiéndose entonces la incapacidad de detectarla con anticuerpo o por el método de purificación por afinidad a sefarosa-antranílico a que la concentración de enzima de esta mutante es muchísimo menor que la de la cepa silvestre; por lo que solamente fuimos capaces de detectarla al hacer la purificación por el método de cristalización con sulfato de zinc; donde el procedimiento de purificación es muy rápido y la cantidad de enzima que se pierde es mínima.

2.- Análisis por hibridización tipo Southern.

En cuanto al mapeo de las mutaciones que confieren auxotrofia total por glutamina (MX762, MX764, MX850 y MX852); sabemos que estas cepas son incapaces de cruzar entre sí para dar lugar a recombinantes tipo silvestre como ya se mencionó en la Introducción. Ya que para poder hacer un mapeo fino por transducción necesitaríamos conocer un mayor número de marcadores que estando cercanos a *glnA*, pudieran ofrecer ventajas de selección positiva y no siendo este el caso, decidimos utilizar un enfoque diferente para mapear con mayor exactitud las mutaciones; el cual consistió en someter las cepas a un análisis por la técnica de Southern. Este análisis consistió básicamente en la hibridización de DNA cromosomal purificado a partir de

las mutantes digerido con alguna enzima de restricción, con plásmidos marcados radioactivamente que llevan clonada la región cromosómica de nuestro interés. El patrón de hibridización del DNA de las mutantes comparado con el patrón de hibridización de la cepa silvestre proporciona información sobre el tamaño de las deleciones, y el tipo y la localización de las mutaciones. Los plásmidos que se utilizaron para llevar a cabo las hibridizaciones con el DNA cromosomal fueron pACR1 (21, 34) y pACR2, (aislados por M. Rocha y A. Covarrubias). El plásmido pACR1 es un plásmido recombinante derivado de ColE1, aislado a partir del banco de Clarke y Carbon; se ha demostrado conclusivamente que este plásmido lleva clonado el gene *glnA* (34); lleva también una región que codifica para una proteína de 68 000d, y es muy posible que también contenga los genes *glnI* y *glnG*. El plásmido pACR2 se obtuvo clonando un fragmento de restricción Hind III de *pglnA* (donado por S. Kustu) en el plásmido pBR322.

Los mapas de restricción de los plásmidos pACR1 y pACR2 se encuentran esquematizados en la Fig. 5. Se puede observar que ambos plásmidos son idénticos, salvo que pACR2 lleva un fragmento de 1 kb que no se encuentra en pACR1.

Para la realización de los experimentos de hibridización se purificó DNA cromosomal de las cepas MX615 (silvestre), MX762, MX764, MX850 y MX852, como se indica en Material y Métodos.

En la fig. 5 se encuentran los resultados obtenidos en la hibridización del DNA cromosomal de la cepa MX850 con los plásmidos mencionados.

Como se puede observar, ésta cepa no contiene ninguna secuencia capaz de hibridizar con el plásmido pACR1; solamente se pudo detectar una banda de hibridización con el plásmido pACR2 al digerir el DNA cromosomal con la enzima de restricción PstI.

Estos resultados nos indican que la cepa MX850 lleva una deleción que cubre desde el sitio de inserción de lambda (en la cepa MX752) hasta muy cerca del último sitio de PstI que se encuentra en pACR2, pero no en pACR1. Por lo tanto esta cepa carece de los genes *glnA* y *glnL*, así como del gene que codifica para la proteína de 68 000d, y posiblemente carece también aunque parcialmente de *glnG*. Al someter el DNA cromosomal de la cepa MX852 a este tipo de experimentos; se encontró que esta cepa también presenta una deleción que cubre el gene *glnA* pero que aún contiene los genes *glnL* y *glnG* (L. Servin).

El caso de la cepa MX762 es diferente del anterior ya que como se puede observar en la Fig. 6 el DNA cromosomal de esta cepa contiene secuencias capaces de hibridizar con pACR1; aunque el patrón de hibridización difiere del de la cepa silvestre. Cuando el DNA se digiere con la enzima PstI, la banda interna que se observa en la cepa silvestre (4.5 md) no se encuentra en la cepa MX762, y en su lugar aparecen dos nuevas bandas, de 3.0 y 1.0 md. aprox.; por otra parte, cuando se utiliza la enzima de restricción SalI para digerir el DNA; se observa que el fragmento de 2.4 md. de la cepa silvestre, donde se encuentra *glnA*; no se encuentra en la cepa MX762; donde aparece una nueva banda de mayor peso molecular; que migra formando un doblete con el fragmento inmediato superior.

En primer lugar los resultados nos indican que la cepa

MX762 no tiene una delección en la región *glnA* del cromosoma; entonces ¿Por qué el fenotipo de la cepa es el de una auxótrofa de glutamina?, y ¿Cuál es la razón del cambio del patrón de hibridación en comparación con la cepa silvestre?, una posible respuesta a estas preguntas es la siguiente:

Las secuencias invertidas repetidas que flanquean al transposón Tn5 tienen sitios de reconocimiento para la enzima PstI que generan fragmentos de aprox. 0.37 md (35, 36); suponiendo que la cepa MX762 tuviera insertado uno de estos fragmentos en *glnA*; como se indica en la Fig. 6, ésto daría origen a los dos nuevos fragmentos que aparecen al digerir el DNA cromosomal de la mutante con PstI, ya que habría un sitio de reconocimiento para esta enzima que no se encuentra en la cepa silvestre. Por otra parte la inserción de este fragmento de Tn5 en *glnA* causaría un aumento del peso molecular de la banda cromosomal que lleva este gene, generada por digestión con SalI. En vista de que la cepa MX762 se obtuvo a partir de una cepa que tenía $\lambda::Tn5$ integrado en el cromosoma; se puede pensar que además de las mutantes que se generaron directamente por la escisión del $\lambda::Tn5$; se recuperaron también mutaciones por integración total o parcial de Tn5. Es importante mencionar que recientemente se ha demostrado que las secuencias invertidas repetidas (IS) que flanquean al gene que confiere Kan^R en el Tn5; tienen la capacidad de funcionar como transposones y se les ha denominado IS50 (37).

En resumen, pensamos que la cepa MX762 tiene inactivado el gene *glnA* por tener insertado en este gene un IS50 (o un fragmento de); siendo esta la causa del fenotipo Gln⁻ de la mutante en

cuestión.

Para demostrar conclusivamente esta hipótesis se requieren hacer experimentos de hibridización del DNA cromosomal de la cepa MX762 con DNA del transposón TN5, esperándose una hibridización positiva. Haciendo el experimento con diversos fragmentos de restricción tanto de Tn5 como de IS50, se podría saber exactamente cual región del transposón se encuentra integrada en la cepa MX762.

Finalmente; la cepa MX764 parece tener el mismo tipo de mutación que la MX762; ya que la digestión del DNA cromosomal con PstI y posterior hibridización con PACR2 muestra que el fragmento que en la cepa silvestre lleva *glnA*, desaparece en la mutante, para dar lugar a dos nuevas bandas; la suma de los pesos moleculares de estos dos fragmentos es aprox. 0.7 md mayor que el peso del fragmento correspondiente en la cepa silvestre. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que la cepa MX764 lleva insertada una IS50 en *glnA*, causando el fenotipo Gln.

El hecho de que las cepas MX762 y MX764 no sean capaces de cruzar entre sí para dar recombinantes tipo silvestre a pesar de no llevar deleciones, se puede entender ya que las mutaciones que llevan estas cepas, afectan la misma región del gene.

Por otra parte, es necesario suponer que estas mutaciones son muy estables, y quizá que la IS50 insertadas no son capaces de escindirse de manera precisa; para explicar la ausencia de generación de revertantes prototrofos a partir de las cepas MX762 y MX764.

3.- Análisis por complementación.

Uno de los enfoques más utilizados en estudios de regulación es el análisis de relaciones de dominancia-recesividad entre diferentes alelos de un mismo gene, ya que esto de la oportunidad de detectar reguladores trans dominantes; que sugieren la presencia de proteínas difusibles con funciones regulatorias, o mutaciones *cis* dominantes que a su vez, sugieren la presencia de secuencias en el DNA, que tienen un papel regulatorio "per se" y no por ser transcritas y traducidas a proteínas.

El F merogenote F'14 contiene aprox. 10 min. que cubren el min. 85 del cromosoma de *E. coli* (38) (Fig. 7). Este F' se utilizó para hacer estudios de complementación con las mutantes descritas en este trabajo. Además del F14 silvestre (*glnA*⁺); se construyen dos F' con mutaciones en *glnA*:

-F'14 *glnA20*: lleva una mutación obtenida originalmente en la cepa MX705 (6,21); por tratamiento con etil metano sulfonato; la GS de esta mutante es totalmente inactiva, y por lo tanto presenta los fenotipos *Gln*⁻ y *Reg*⁻.

-F'14 *glnA21*; Confiere el fenotipo *Gln*⁻ por llevar integrado un transposón Tn5 en el extremo amino terminal de *glnA*: Esta mutación se transfirió al F14 a partir de la cepa MX727, donde fué caracterizada inicialmente (6).

El método utilizado para transferir las mutaciones al F'14 está descrito en Material y Métodos.

En primer lugar, se hicieron complementaciones entre las

auxótrofas totales de glutamina (MX762 y MX764) con F'14 silvestre. Los resultados se encuentran en la Tabla 3. Podemos observar que las exconjugantes adquieren un fenotipo silvestre tanto en su capacidad de sintetizar y regular su GS como en su utilización de amino ácidos como fuente de nitrógeno (Reg).

Por otra parte se efectuaron complementaciones de las tres auxótrofas parciales de glutamina; MX763, MX768 y MX769 tanto con F'14 *glnA*⁺ como con F'14 *glnA20* y F'14 *glnA21*. Estas complementaciones se llevaron a cabo en derivadas *recA*⁻ de las cepas receptoras para evitar la formación de recombinantes.

Se midió la actividad específica de GS de las exconjugantes crecidas en diferentes fuentes de nitrógeno.

Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla 4. En primer lugar se puede observar que las tres cepas, al ser complementadas con F'14 *glnA*⁺ adquieren un fenotipo silvestre. Esto implica que las mutaciones de estas cepas son recesivas frente al alelo silvestre, lo cual pudiera deberse a que únicamente se estuviera expresando tanto *glnA* como los elementos regulatorios ligados a *glnA* en el F merogenote.

La actividad de GS de las mutantes complementadas con F'14 *glnA20* o *glnA21* presenta un panorama muy diferente:

La cepa MX763/F14 *glnA20* o /F14 *glnA21* tiene el mismo fenotipo que la cepa sin complementar (actividad baja constitutiva de GS) esto es, la mutación de la cepa MX763 es o bien *cis* dominante ya que la GS de la cepa diploide no puede ser inducida por crecimiento en bajo amonio o el alelo silvestre que corresponde -

el gene mutado en la cepa MX763, no se encuentra en la región cromosomal ligada al F14'.

La primera alternativa parece ser la más plausible dado que el F'14 silvestre sí es capaz de complementar a la mutante.

Por otra parte, sabemos que la mutación de la cepa MX763 no se encuentra altamente ligada a *glnA*; ya que esta cepa es capaz de dar lugar a recombinantes tipo silvestre al cruzarla con la cepa MX850, la cual tiene deletada toda la región cercana a *glnA*, y en un experimento de hibridización tipo Southern entre DNA cromosomal de la cepa MX763 y el plásmido pACRI se observó el mismo patrón de hibridización que con DNA de la cepa silvestre. (Datos no presentados).

El análisis de la cepa MX768 complementada en los F mero-genotes mencionados presenta dos características muy interesantes: las dos exconjugantes pierden completamente su capacidad de crecer en amonio y pierden también su capacidad de inducir la actividad de GS, o sea, las exconjugantes no adquieren una regulación silvestre de GS ni conservan las características de la mutante; sino que adquieren un fenotipo nuevo.

Para explicar el fenotipo de la cepa MX768 (fase lag de crecimiento en amonio y actividad alternada de GS) habíamos postulado que esta cepa presenta una alteración en la capacidad de introducir amonio a la célula. Además de la MX768 se han obtenido en el laboratorio una serie de mutantes que tienen un fenotipo similar al de esta cepa y en esta mutantes se ha demostrado que son incapaces de introducir amonio; esto se realizó midiendo la

incorporación a las células de metilamina ^{14}C . (L. Servín, datos no publicados).

¿Cómo podemos explicar al nuevo fenotipo de los exconjugantes?

Sabemos que la cepa MX768 complementada con F'14 *glnA*⁺ adquiere un patrón silvestre de regulación de GS; por otro lado sabemos que el gene *glnI* se transcribe a partir del promotor de *glnA*, por lo que en mutantes *glnA* la transcripción de *glnI* se encuentra reducida.

Correlacionando estos datos, podemos pensar que en las exconjugantes MX768/F14 *glnA20* y MX768/F14 *glnA21* se encuentran reducida la transcripción del *glnI*, y que esta ausencia del producto de *glnI* sea la causa de la falta de inducción de GS. No se puede descartar tampoco la posibilidad que el producto de *glnI* esté involucrado, directa o indirectamente, en el proceso de transporte de amonio a la célula.

3.- Por último, en cuanto a la cepa MX769, se puede observar que al complementarla tanto con F14 *glnA20* como con F'14 *glnA21*, las exconjugantes adquieren un patrón de regulación tipo silvestre o sea recuperan su capacidad de inducir GS en presencia de alta glutamina (1mg/ml). La recesividad de la mutación de la cepa MX769 frente al alelo silvestre nos indica la presencia en esta región del cromosoma de por lo menos un gene, que codifica para una proteína difusible, involucrada directa o indirectamente en la activación de *glnA*.

4.- Caracterización de derivadas Kan^S.

En la tabla 1 se puede observar que las mutantes MX764, MX768 y MX769 son Kanacina resistentes. Con el objeto de descartar la posibilidad de que el fenotipo de estas mutantes se debiera directamente a la inserción de Tn5, nos propusimos obtener derivadas Kan^S de estas cepas y comprobar su fenotipo. En caso de que las mutaciones fueran causadas por el transposón, algunas derivadas Kan^S en las cuales la escisión del transposón fuera precisa, al carecer de él debían recuperar el fenotipo silvestre.

Ya que no se pudieron obtener derivadas Kan^S espontáneas de estas cepas, a una frecuencia que permitiera su fácil detección, la estrategia que se utilizó fue la de hacer un enriquecimiento con penicilina en presencia de una concentración subletal de Kanamicina, como se describe en Material y Métodos.

De esta manera se logró seleccionar derivadas Kan^S de la cepa MX764 y de la cepa MX769. Se aisló una de cada una de ellas para caracterizarla. En la Tabla 5 se muestra la actividad específica de GS de las derivadas Kan^S de MX764 y MX769: MX823, y MX825 respectivamente; se puede observar que el patrón de actividad de estas cepas es idéntico al de las cepas que les dieron origen. En la Fig. 9 se muestra el crecimiento de estas cepas en diferentes fuentes de nitrógeno, pudiéndose ver que la cepa MX823 en Reg⁻ y únicamente presenta un crecimiento óptimo en presencia de glutamina, al igual que la MX764. La cepa MX825 es capaz de crecer en amonio y es Reg⁺, siendo este el mismo fenotipo que el de la cepa MX769.

En conclusión, podemos decir que los Tn5 que confieren Kanamicina resistencia a las cepas MX764 y MX769, no están contribu-

yendo al fenotipo Gln^- de las mismas, ya que este no se altera en las derivadas Kan^S que han perdido el transposón.

La cepa MX768, que también presenta Kan^R , se sometió al mismo tipo de tratamiento de las anteriores, pero nunca se logró obtener una derivada Kan^S de esta cepa. Esto se puede deber a que el transposón haya sufrido una mutación de tal manera que perdiera la capacidad de escisión, o a que al escindirse lo haga incorrectamente, causando la delección de una región cromosomal vital para el crecimiento celular.

Tomando en consideración este hallazgo, quisimos comprobar de alguna manera que las derivadas Kan^S obtenidas a partir de MX764 y MX769 sí se debían a escisiones correctas de $Tn5$ ya que la otra posibilidad es el $Tn5$ al escindirse haya causado una delección en el cromosoma, la cual confiera a la células el mismo fenotipo que tenían originalmente; aunque por una causa diferente.

Para hacer esto decidimos buscar derivadas Kan^S a partir de una cepa: MX727, la cual tiene un $Tn5$ integrado en la región amino terminal de *glnA*; esperando que las derivadas Kan^S de esta cepa si recuperaran el fenotipo silvestre, en caso de que el transposón -- fuera capaz de escindirse correctamente.

La cepa MX727 se obtuvo al seleccionar colonias $Gln^- Kan^R$, tras tratar la cepa MX615 con el bacteriofago λKan^2 (6, 19) y someterla a un enriquecimiento con penicilina en presencia de amonio. Esta cepa es auxótrofa de glutamina, no presenta actividad detectable de GS, es Reg^- y Kan^R . El sitio de inserción del $Tn5$ en MX727 se localizó por experimentos de hibridización tipo Southern, entre DNA cromosomal de la cepa y el plásmido pACRI, que ya se han mencionado anteriormente.

Los resultados se encuentran en la Fig. 10 y para interpretarlos es necesario recordar que el Tn5 tiene un sitio de reconocimiento para *Sal I*, que da origen a dos bandas de 1.77 y 1.98 md y cuatro sitios de reconocimiento para *PstI*, donde los fragmentos de los extremos son de 0.32 md cada uno (35,36). En la Fig. 11 se puede observar que al digerir el DNA cromosomal con *Sal I*, la banda de menor peso molecular que se observa en la cepa silvestre no se encuentra en la MX727, y en su lugar aparecen dos nuevas bandas, la suma de los pesos moleculares de estas dos bandas es igual al peso de la que se observa en la cepa silvestre, al restarles el peso de los fragmentos de Tn5. Lo mismo sucede cuando el DNA es digerido con *PstI*; desaparece la banda que contiene *glnA* y se observan dos nuevos fragmentos cuyos pesos moleculares sumados corresponden al peso de la banda que lleva *glnA*, al restarles el peso de los fragmentos de Tn5. El tamaño de los fragmentos obtenidos con las diferentes digestiones nos indican que el Tn5 está integrado cerca del sitio Eco RI, en el extremo amino terminal de *glnA*.

La cepa MX727 se sometió al tratamiento ya descrito para la obtención de derivados Kan^S y se analizaron cinco de ellas: MX904, MX905, MX906, MX907, MX908.

Como se puede observar en la Tabla 6, el fenotipo de las cinco cepas es idéntico: a pesar de haber adquirido Kan^S, todas ellas siguen siendo auxótrofas de glutamina y no tienen actividad detectable de GS.

Estos resultados nos indican que la escisión de Tn5, por lo menos en la cepa MX727 no es correcta. La posibilidad de que

el fenotipo Gln^- de las derivadas Kan^S de la cepa en cuestión se debiera a una delección de *glnA* generada por la escisión del transposón se descartó debido a que estas cepas son capaces de revertir a prototrofia por glutamina; aunque las frecuencias de reversión son muy bajas (Tabla 7).

El análisis de cuatro revertantes Gln^+ (MX909, MX910, MX911, y MX912) obtenidas a partir de MX904 mostró (Tabla 8) que a diferencia de la silvestre, la GS de estas cepas se encuentra reprimida cuando se crecen en alta glutamina (1mg/ml) como fuente de nitrógeno. En los otros medios probados, el patrón de actividad de GS de las revertantes es similar al de la cepa silvestre: inducida en condiciones de limitación de nitrógeno (NH_4^+ 0.5 mM, arginina al 0.2%) y reprimida en presencia de alta concentración de amonio (15mM). Es de notarse que la GS de la cepa MX912 alcanza niveles de tres a cuatro veces más altos que la GS de la cepa silvestre, en algunas condiciones (NH_4^+ 0.5 mM ó arginina 0.2%).

Los resultados obtenidos nos indican que el gene *glnA* de estas revertantes es más sensible a represión por glutamina que el gene de la cepa silvestre, a pesar de haberse conservado la regulación normal por amonio.

Para descartar la posibilidad de que las revertantes se hubieran generado por fusión de *glnA* a otro gene cercano, dando como resultado un producto híbrido, se purificó la GS de cada una de las revertantes por el método de precipitación con sulfato de zinc descrito en Material y Métodos.

En la Fig. 11 se muestra la electroforesis en acrilamida SDS de la enzima purificada a partir de las revertantes y de la cepa silvestre; observándose que los monómeros de las revertantes comigran con el monómero de la cepa silvestre.

Estos resultados nos indican que *gluA* como tal no se encuentra fusionado a otro gene en estas revertantes; aunque sí es posible que se encuentre bajo el control de un promotor diferente; ya que los niveles de GS que alcanzan estas cepas; difieren notablemente de los niveles de GS en la cepa silvestre.

En resumen podemos decir que el Tn5 integrado en la cepa MX727 debe tener una mutación que le impide escindirse correctamente, ya que aunque la frecuencia normal de escisión incorrecta de Tn5 es de 10^{-5} y la frecuencia de escisión precisa es de 10^{-6} (39, 40), a partir de la cepa MX727 nunca se ha podido aislar una derivada Kan^S que haya recuperado el fenotipo silvestre.

Finalmente, para resumir las conclusiones obtenidas en este trabajo me gustaría señalar los siguientes puntos:

Los resultados obtenidos al someter las mutantes analizadas en este trabajo a experimentos de hibridización tipo Southern nos muestran que se pueden generar múltiples tipos de mutaciones por la escisión de lambda Tn5 y no solamente deleciones, como habíamos pensado originalmente. En la literatura se ha reportado la generación de mutaciones por rearrreglos genómicos lisogenizados con el fago Mu d1 (42).

Un antecedente interesante, es que la integración de lambda Tn5 en la cepa MX752, a partir de la cual posteriormente se obtuvieron

las mutantes, se llevó a cabo por recombinación entre un Tn5 previamente integrado en el cromosoma y el transposón presente en el fago y no por recombinación integrativa al sitio att λ ; dando como resultado que el arreglo lineal del DNA del fago insertado fuera diferente al arreglo normal. Este hecho puede dar lugar a que la escisión del DNA del fago no dependa del mecanismo normal de lambda, sino de los transposones.

Una consecuencia de esto es que la producción de fagos líticos en la cepa MX752 es mucho menor que en una cepa lisogenizada en att λ (19); pudiendo ser otra consecuencia la generación de mutantes por reinserción de Tn5 o IS50, así como la producción de inversiones en el DNA.

La realización de experimentos de complementación de las mutantes con el F merogenote, F14, y sus derivados; nos permite sugerir la presencia, entre el sitio de inserción de lambda (en MX752) y el operón de rha, de por lo menos un gene, que codifica para un producto difusible, involucrado en la activación de glnA.

La regulación de la expresión de glnA por metabolitos tales como glutamina y amonio; y el papel que juegan en ella diversos efectores como los productos de glnG, glnI y glnF es un punto de capital importancia no resuelto a la fecha.

La posibilidad de que el producto del gene glnI esté involucrado de alguna manera en el mecanismo de incorporación de amonio a las células se sugiere por algunos resultados de este trabajo. Independientemente de la posible participación de glnI; el aislamiento de mutantes del tipo de la MX768; nos lleva al estudio del transporte de amonio y su regulación, siendo este un problema cuya solución

puede aportar datos interesantes en el campo de la regulación del metabolismo nitrogenado.

La caracterización de las mutantes descritas en este trabajo ha sido de gran utilidad para el mapeo de la región *glnA*. El uso de estas mutantes en el estudio de la regulación de *glnA* por los productos de *glnL* y *glnG* es un punto muy interesante. Específicamente, las cepas que presentan deleciones totales de *glnA* se utilizarán como receptoras en transformaciones con plásmidos que llevan clonada esta región. La mutagenésis de estas transformantes permitirá aislar mutaciones que afecten las regiones regulatorias de *glnA* (promotor, operador (es), y el tener estas mutaciones en plásmidos permitirá hacer experimentos de secuenciación de DNA, lo cual, a su vez, permitirá tanto la localización de estas regiones regulatorias como la identificación de los productos que reconocen cada una de estas secuencias. Este enfoque es válido tanto para *glnA*, como para *glnG* *glnL*. (D.Romero, en preparación).

Otro enfoque diferente para efectuar estudios de la regulación de la expresión de *glnA*, consistiría en la obtención de fagos transductantes λ *glnA*, a partir de la cepa MX752; la cual lleva el bacteriofago lambda integrado en un locus cercano a *glnA*. Este enfoque permitiría la identificación de otro(s) gene(s), diferentes a *glnL* y *glnG*; cuyos productos estén relacionados con la activación de *glnA*.

El aislamiento de mutantes con alteraciones en los diversos puntos de regulación y su utilización en experimentos de análisis

genéticos y bioquímicos es el enfoque que se ha presentado en este trabajo. La identificación y purificación de los productos de los genes *glnF*, *glnI* y presentadas para hacer estudios de la regulación de la expresión de *glnA* utilizando las mutantes mencionadas son puntos que contribuirán a la elucidación de los mecanismos regulatorios del metabolismo nitrogenado en enterobacterias.

Bibliografía

- 1.- Tyler, B., "Regulation of the assimilation of nitrogen compounds", Ann. Rev. Biochem., 47:1127 (1978).
- 2.- Shapiro, B.M., Kingdon, H.S., y Stadtman, E.R., "Regulation of glutamine synthetase VIII. Adenylyl glutamine synthetase: a new form of the enzyme with altered regulatory and kinetic properties", Proc. Natl. Acad. Sci., 58:642 (1967).
- 3.- Ginsburg, A. y Stadtman, E.R., "Regulation of glutamine -- synthetase in E. coli", p.9. En: The enzymes of glutamine metabolism, S. Prusiner y E.R. Stadtman (ed.) Academic Press Inc. N.Y. (1973).
- 4.- Mayer, E.P., Smith, O.H., Fredricks, W.W. y McKinney, M.A., "The isolation and characterization of glutamine requiring --- strains of E. coli", Molec. Gen. Genet., 137:131, (1975).
- 5.- Pahel, G., Bloom, F.R. y Tyler, B., "Deletion mapping of the pol A-metB region of the E. coli chromosome", J. of Bacteriol. 138:653 (1979).
- 6.- Bastarrachea, F., Brom, S., Covarrubias, A., Osorio, A. y Bolívar, F., "Genetic characterization of mutations affecting glutamine biosynthesis and its regulation in Escherichia coli K12." p 107. En :Glutamine: metabolism, enzymology and regulation. J. Mora y R. Palacios (ed)., Academic Press. Inc. (1980).
- 7.- García, E., Bancroft, S., Rhee, S.G. y Kustu, S., "The --- product of a newly identified gene, glnF is required for synthesis of glutamine synthetase in Salmonella", Proc. Natl. Acad. Sci., 74:1662 (1977).

- 8.- Gaillardin, C.M., y Magasanik, B., "Involvement of the product of the glnF gene in the autogenous regulation of glutamine synthetase formation in K. aerogenus", J. of Bacteriol. 133:1229, (1978).
- 9.- Pahel, G., y Tyler, B., "A new glnA linked regulatory gene for glutamine synthetase in E. coli", Proc. Natl. Acad. Sci., 76:4544, (1979).
- 10.- Kustu, S., Burton, D., García, E., Melaster, L. y McFarland N., "Nitrogen control in Salmonella: regulation by the glnR and glnF gene products", Pro. Natl. Acad. Sci, 76:4576- (1979).
- 11.- Magasanik, B., Prival, M.J., Brenchley, J.E., Tyler, B., de Leo, A.B., Streicher, S.J. Bender, R.A. y Paris, C.G., "Glutamine synthetase as regulator of enzyme synthesis", Curr. Topics in Cell. Reg., 8:119, (1974).
- 12.- Tyler, B., De Leo, A.B. y Magasanik, B., "Activation of transcription of hut DNA by glutamine synthetase", Pro. Natl. Acad. Sci., 71:225, (1974).
- 13.- Foor, F., Reuveny, Z. y Magasanik, B., "Regulation of the synthesis of glutamine synthetase by the PII protein in Klebsiella aerogenes", Proc. Natl. Acad. Sci., 77:2636, (1980).
- 14.- Streicher, S.L., De Leo, A.B., y Magasanik, B. "Regulation of enzyme formation in Klebsiella aerogenes by episomal glutamine synthetase of Escherichia coli", J. Of Bacteriol., 125:184, (1976)
- 15.- Bender, R.A. y Magasanik, B., "Autogenous regulation of the synthesis of glutamine synthetase in Klebsiella aerogenes"

- J. of Bacteriol., 132:106 (1977).
- 16.- Streicher, S.L. Bender, R.A. y Magasanik, B., "Genetic -- control glutamine synthetase in K. Aerogenes", J. of Bacteriol. 121:320, (1975).
- 17.- Foor, F., Janseen, K.A. y Magasanik, B., "Regulation of synthesis of glutamine synthetase by adenylylated glutamine -- synthetase", Proc. Natl. Acad. Sci., 72:4844, (1975).
- 18.- Rothstein, D.M., Pahel, G., Tyler, B. y Magasanik, B., - "Regulation of expression from the glnA promoter of Escherichia coli in the absence of glutamine synthetase", Proc. Natl. Acad. Sci., 77:7372 (1980).
- 19.- Brom, S., "Obtención y caracterización de mutaciones en la región glnA del cromosoma de Escherichia coli K 12". Tesis de Licenciatura, UNAM.
- 20.- Miller, J.H., Experiments in molecular genetics, 2ª ed., Cold Spring Harbor, N.Y., (1972).
- 21.- Covarrubias, A.A., Sánchez-Pescador, R., Osorio, A., Bolívar, F. y Bastarrachea, F., "Col E1 hybrid plasmids containing E. coli genes involved in the biosynthesis of glutamate and -- glutamine", Plasmid, 3:150, (1980).
- 22.- Shapiro, B.M. y Stadtman, E.R., "Glutamine synthetase -- (E. coli)"., En: Methods in enzymology, H. Tabor y C.W. Tabor, eds., vol 17A:910, Academic Press, N.Y., (1970).
- 23.- Bender, R.A., Janseen, K.A., Resnick, A.D., Blumenberg, -- M., Foor, F. y Magasanik, B., "Biochemical parameters of glutamine synthetase from K.aerogenes", J. of Bacteriol., 129:1001, (1977).

- 24.- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., y Randall, R. J., "Protein measurements with the Folin phenol reagent", J. Biol. Chem., 193:265, (1951).
- 25.- Palacios, R., "Neurospora crassa glutamine synthetase: - purification by affinity chromatography and characterization of subunit structure", J. Biol. Chem. 251:4787, (1973).
- 26.- Miller, R.E., Shelton, E. y Stadtman, E.R., "Zinc induced paracrystalline aggregation of glutamine synthetase", Archives of Biochem. and Biophys., 163:155, (1974).
- 27.- Laemmli, U.K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", Nature, 227:-- 680, (1970).
- 28.- Yanofsky, C. y Lennox, E.S., "Transduction and recombination study of linkage relationships among the genes controlling tryptophan synthesis in Escherichia coli", Virology, 8:425 -- (1959).
- 29.- Southern, E.M., "Detection of specific sequences among DNA fragments by gel electrophoresis", Mol. Biol. 98:503, (1975).
- 30.- Craig, E.A., McCarthy, B.J. y Wadsworth, S.C., "Sequence-organization of two recombinant plasmids containing genes for the major heat shock-induced protein of D. melanogaster", Cell 16:575, (1979).
- 31.- Bolívar, F., Rodríguez, R.L., Betlach, M.C. y Boyer, H.W. "Construction and characterization of new cloning vehicles: I. Ampicillin resistant derivatives of the plasmid p_{MB9}", Gene 2:75, (1977).
- 32.- Yourno, J. y Kohno, T., "Enzyme evolution: Generation of a

bifunctional enzyme by fusion of adjacent genes", Nature, ----
228:820, (1970).

33.- Lsono, K. y Yourno, J., "Mutation leading to gene fusion in the histidine operon of *Salmonella typhumurium*", J. Mol. Biol, 76:455, (1973).

34.- Covarrubias, A.A., Rocha, M., Bolívar, F. y Bastarrachea, F., "Cloning and physical mapping of the glnA gene of Escherichia coli K12", Gene, 11:239, (1980).

35.- Yamamoto, T. y Yokota, T., "Construction of a physical map of a hanamycin (Km) transposon, Tn5, and a comparison to another km transposon, Tn903, Molec. gen. genet, 178:77, (1980)

36.- Jorgesen, R.A., Rothstein, S.J., y Rezenikoff, W.S., "A restriction enzyme cleavage map of Tn5 and location of a region encoding resistance", Molec. gen. genet., 177:65, (1979).

37.- Berg, D.E., Sasakama, C., Hischel, B.J., Johnsrud, L., McDivitt, L., Egner, C., y Rajani, R., "Transposition of the inverted repeats of Tn5", En: Molecular biology, pathogenicity and ecology of bacterial plasmids: Levy, S.B. (ed), Plenum press (1981), en prensa.

38.- Bachmann, B.J., Low, K.B. y Taylor, A.L., "Recalibrated linkage map of Escherichia coli K12", Bacteriol. Rev., 40:116,- (1976).

39.- Egner, C. y Berg, D.E., "Excision of transposon Tn5 is dependent on the inverted repeats but not on the transposase --- function of Tn5". Proc. Natl. Acad. Sci., 78:459, (1981)

- 40.- Berg, D.E., "Insertion and excision of the transposable kanamycin resistance determinant Tn5", En: Insertion elements, plasmids and episomes, P. 205, A.I. Bukhari, J.A. Shapiro y - S.L. Adhya, eds., Cold Spring Harbor, N.Y., (1977).
- 41.- Backman, K., Yu-Mei Chen y Magasanik, B., "Physical and genetic characterization of the glnA - glnG region of the Escherichia coli chromosome", Proc. Natl. Acad. Sci., 78: 3743 (1981).
- 42.- McCarter, L.L., McFarland N.C, Artz, S.W. y Rusto, S., "Nitrogen regulatory locus glnR of enteric bacteria is composed of two eistrans:identification of their protein products. ASM 81st annual meeting (1981).
- 43.- Macneil, T., Macneil, D. y Tyler, B. "Fine structure map of the glnA-glnG region in Escherichia coli. ASM 81st annual meeting (1981).
- 44.- Wanner, B.L., Wieder, S. y McSharry, R., "Use of bacteriophage transposon Mu d1 to determine the orientation-for three pioC-linked phosphate-starvation inducible (psi) genes in Escherichia coli K12." J.of Bact., 146:93, (1981).

T A B L A I

Características fenotípicas de mutantes obtenidas por curación de λ de MX752

	Gln	Reg	Kan	Act. Esp. de GS ⁽¹⁾		Presencia de antígeno capaz de reaccionar con anti-GS
				NH ₄ ⁺ 15mM	Gln 1 ^{mg} /ml	
MX615	+	+	s	0.09	0.82	+
MX762	-	-	s	NC ⁽²⁾	<0.01	-
MX764	-	-	R	NC	<0.01	-
MX763	<u>+</u>	-	s	0.04	0.02	-
MX768	<u>+</u>	-	R	0.38	0.17	+
MX769	<u>+</u>	+	R	0.04	0.06	+

(1) Act. esp. expresada en μ m δ glutamil hidroxamato/min/mg prot.

(2) NC- no hay crecimiento.

Tabla 2

Cepas bacterianas.

<u>Cepa</u>	<u>Genotipo</u>
MX615	F ⁻ <u>thi ilv680</u> (pro lac) Δ (<u>gal att bio</u>) Δ
MX705	F ⁻ <u>glnA20 proA2 leu6 thi lacy1 gal K2 rps L20 rsdS</u> r _B ⁻ m _B ⁻
MX727	F ⁻ <u>thi ilv680</u> (pro lac) Δ (<u>gal pgl att</u>) Δ (<u>bio</u>) Δ <u>glnA21::Tn5</u>
MX752	F ⁻ <u>thi ilv680</u> (pro lac) Δ (<u>gal pgl att</u>) Δ (<u>bio</u>) Δ <u>zif::\Kan2</u>
MX762	- derivada Gln ⁻ obtenida por curaci6n por pulso de calor de MX752
MX763	" " " " " "
MX764	" " " " " "
MX768	" " " " " "
MX769	" " " " " "
MX823	- derivada Kan ^S de MX764
MX825	" " " MX769
MX904	" " " MX727
MX905	" " " MX727
MX906	" " " "
MX907	" " " "
MX908	" " " "
MX909	- revertante Gln ⁺ de MX904
MX910	- " " " "
MX911	- " " " "
MX912	- " " " "

AB1206 -F'14/proA2 his4 thi1 rpsL8 lacY1 galK2 trf-3 supE44
(ilvE-arg^HΔE2)

MX821 -igual a AB1206 con F'14 glnA21::Tn5

MX822 -Iguale a AB1206 con F'14 glnA20

T A B L A 3

Características de auxótrofas totales de glutamina complementadas con
el F merogenote F14

	NH_4^+ 15mM	Gln 1 mg/ml	NH_4^+ 0.5mM	Gln 75 μg /ml	Reg (1)
MX615	0.09	0.82	0.76	0.80	+
MX762/F14	0.18	1.16	1.04	1.00	+
MX764/F14	0.17	1.18	0.95	1.15	+

(1) El fenotipo Reg se midió por la capacidad de utilización de arginina como fuente de nitrógeno.

T A B L A 4

Actividad específica de GS de las cepas MX763, MX768, y
MX769 complementadas con F14, F14glnA20 y F14 glnA21

	Act. Esp. GS			
	NH_4^+ 15mM	Gln 1 ^{mg} /ml	NH_4^+ 0.5mM	Gln 75 ^{µg} /ml
MX615	0.04	0.50	0.96	0.85
MX615/F14	0.17	0.47	0.91	1.16
MX615/F14glnA20	0.15	0.05	0.41	1.03
MX615/F14glnA21	0.09	0.84	0.68	0.62
MX763	0.01	0.02	0.08	0.05
MX763/F14	0.13	1.17	1.13	1.11
MX763/F14glnA20	0.09	0.01	0.07	0.06
MX763/F14glnA21	0.04	0.02	0.23	0.05
MX768	0.47	0.09	0.71	1.00
MX768/F14	0.16	0.93	0.74	0.89
MX768/F14glnA20	NC*	0.09	NC	0.01
MX768/F14glnA21	NC	<0.01	NC	0.02
MX769	0.08	0.07	1.27	0.58
MX769/F14	0.15	1.25	1.81	1.64
MX769/F14glnA20	0.06	0.34	0.82	0.46
MX769/F14glnA21	0.15	0.37	1.19	0.35

* NC- no hay crecimiento.

T A B L A 5

Actividad de GS de derivadas Kan^S
de MX764 y MX769

	A.E. de GS			
	NH ₄ ⁺ 15mM	Gln 1 ^{mg} /ml	NH ₄ ⁺ 0.5mM	Gln 75 ^{mg} /ml
MX615	0.05	0.52	0.79	0.77
MX764	NC*	<0.01	NC	NC
MX823(MX764 Kan ^S)	NC	<0.01	NC	NC
MX769	0.04	0.06	0.80	0.59
MX825(MX769 Kan ^S)	0.02	0.05	0.64	0.43

*NC- no hay crecimiento.

T A B L A 6

Características fenotípicas de derivadas Kan^s de MX727

	<u>Kan</u>	<u>Gln</u>	<u>Act. Esp. GS</u> <u>Gln 1^{mg}/ml</u>
MX615	s	+	0.47
MX727	R	-	<0.01
MX904	s	-	<0.01
MX905	s	-	<0.01
MX906	s	-	<0.01
MX907	s	-	<0.01
MX908	s	-	<0.01

T A B L A 7

Frecuencia de reversión de derivadas

Kan^S de MX727.

Cepa	Frecuencia de reversión a Gln ⁺
MX904	3.4×10^{-10}
MX905	1.1×10^{-9}
MX906	4.4×10^{-10}
MX907	1.7×10^{-9}
MX908	1.2×10^{-9}

T A B L A 8

Actividad especifica de GS de
revertantes Gln⁺ de MX904

A.E. GS

	NH ₄ ⁺ 0.5mM	NH ₄ ⁺ 15mM	Gln 75 ^µ g/ml	Gln 1 ^{mg} /ml	Arg 0.2%
MX615	0.85	0.08	0.89	0.61	0.80
MX909	1.15	0.01	0.97	0.10	0.46
MX910	1.07	0.05	1.01	0.04	0.40
MX911	1.18	0.09	1.07	0.09	0.73
MX912	2.36	0.05	1.50	0.11	3.13

FIGURA 1

BIOSINTESIS Y DISTRIBUCION DE GLUTAMINA

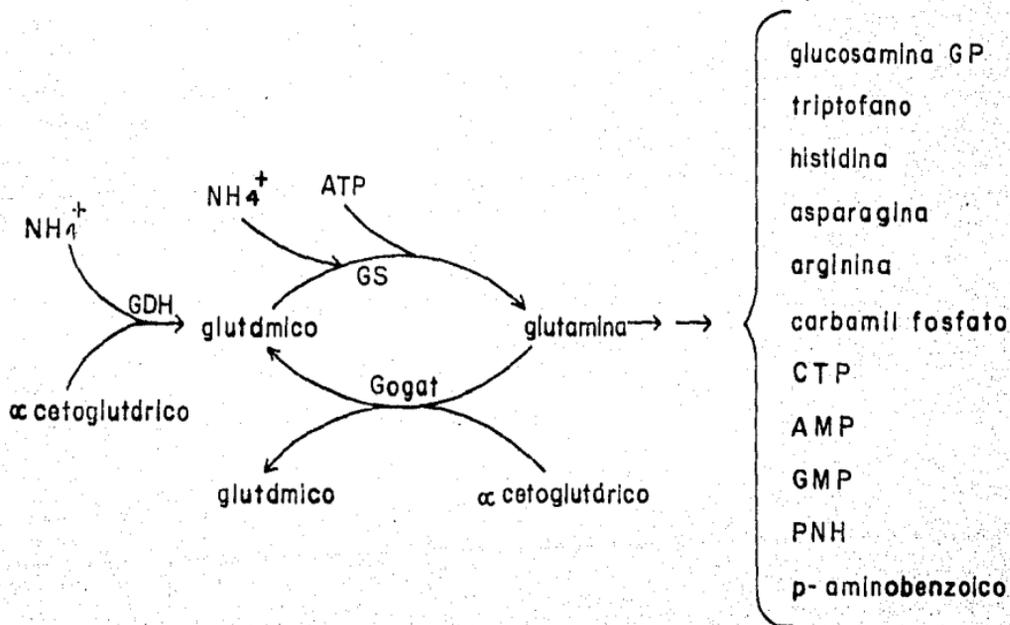
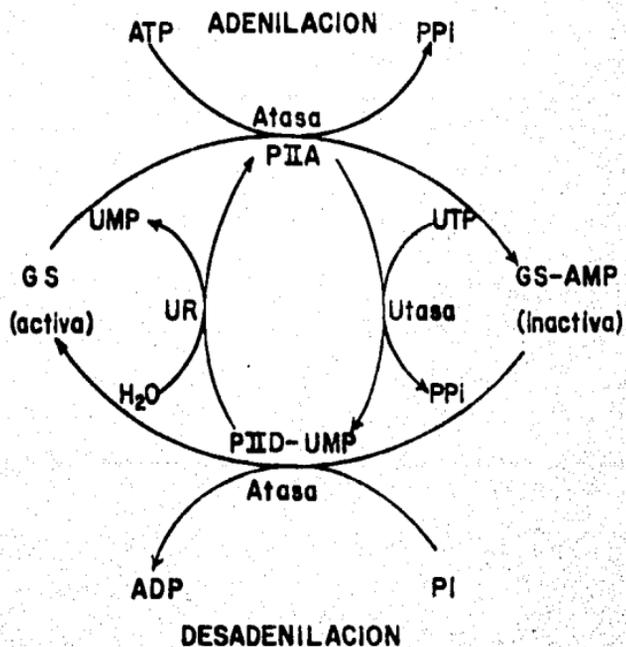


FIGURA 2

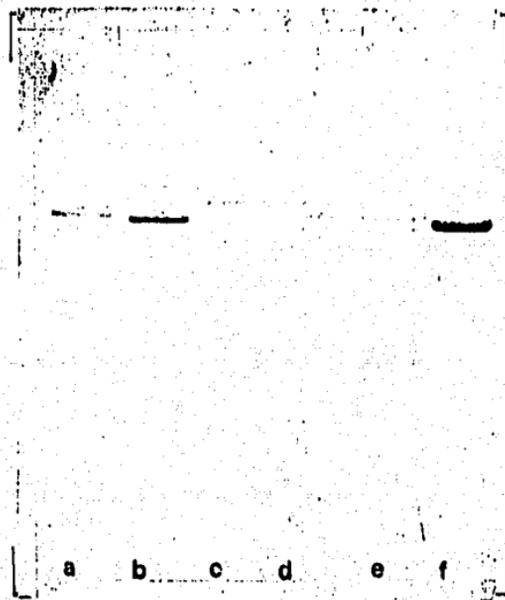
SISTEMA DE MODIFICACION DE GLUTAMINO
SINTETASA



SALA DE LA BIBLIOTECA

FIGURA 3

Electroforesis en acrilamida-SDS⁽¹⁾ de
GS purificada por afinidad a sefarosa

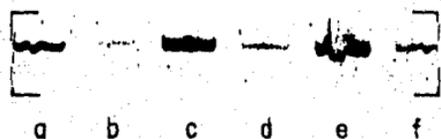


- a) RRI
- b) MX 615
- c) MX 763
- d) MX 768
- e) MX 769

(1) Tinción: azul de Coomassie

FIGURA 4

Electroforesis en acrilamida⁽¹⁾ de
GS purificada por cristalización
con sulfato de zinc



a) MX 615 (4 μ g) b) MX 763 (4 μ g)

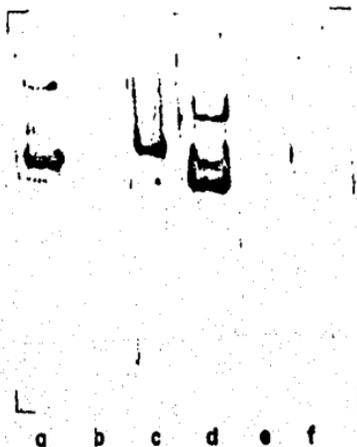
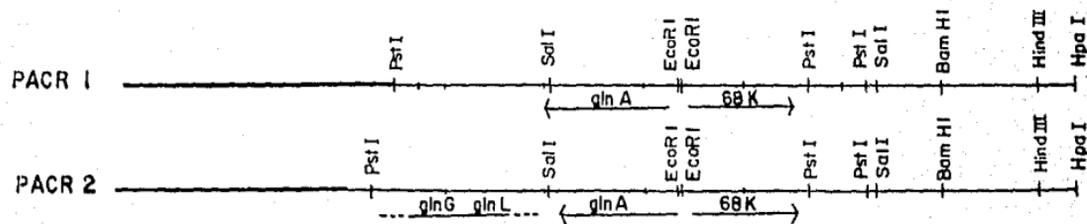
c) MX 615 (8 μ g) d) MX 763 (8 μ g)

e) MX 615 (16 μ g) f) MX 763 (16 μ g)

(1) Tinción con azul de coomassie

FIGURA 5

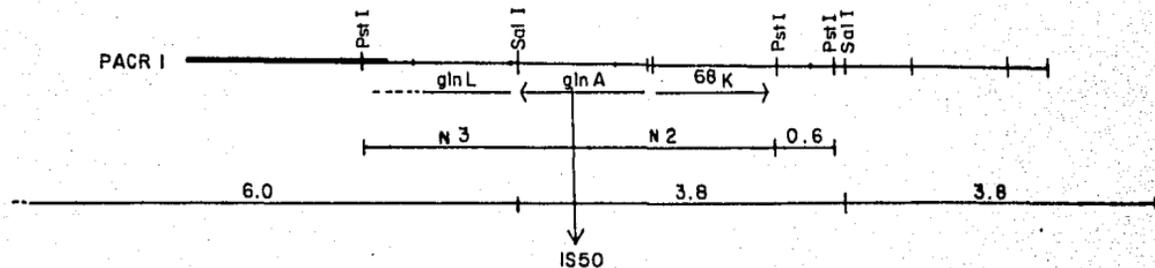
Análisis por Southern de la cepa MX 850



	Origen cromosomal	DNA Digestión	Plásmido hibridizado
a)	MX 615	Pst I	PACR 1
b)	MX 850	Pst I	PACR 1
c)	MX 850	Pst I	PACR 2
d)	MX 615	Sal I	PACR 1
e)	MX 850	Sal I	PACR 1
f)	MX 850	Sal I	PACR 2

FIGURA 6

Análisis por Southern de la cepa MX 762



Origen DNA cromosomal	Digestión
a) MX 615	Pst I
b) MX 762	Pst I
c) MX 615	Sal I
d) MX 762	Sal I

FIGURA 7

Región de DNA cromosomal
contenida en F 14

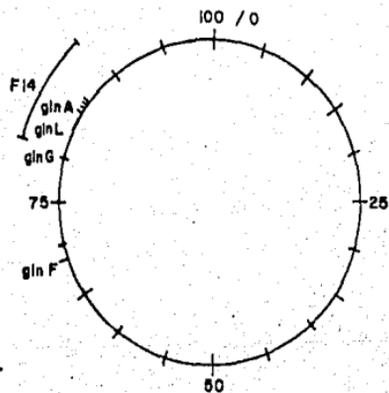


FIGURA 8

KANA MICINA SENSIBILIDAD DE
LA CEPA MX 615

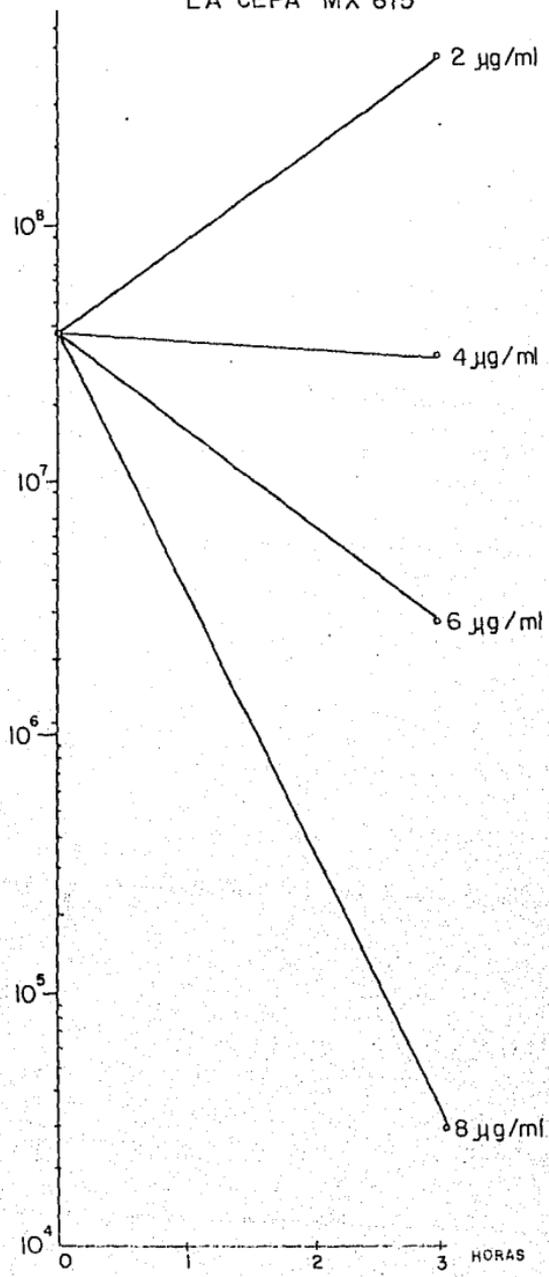


FIGURA 9

CRECIMIENTO DE DERIVADAS KAN^r DE MX 764
Y MX 769 EN DIFERENTES FUENTES DE
NITROGENO

Δ glutamina 1mg/ml

• NH₄⁺ 15mM

● arginina 0.2%

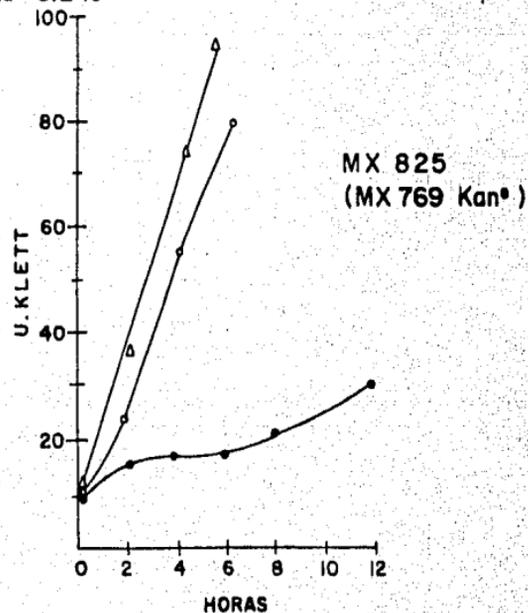
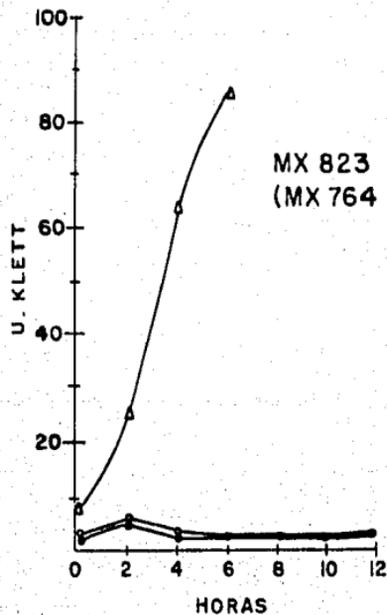


FIGURA 10.

MAPEO DEL Tn5 INTEGRADO EN LA CEIJA MX727 UTILIZANDO LA
TECNICA DE SOUTHERN



a) pACR1
b) MX615
c) MX727 } digestión con EcoRI

d) pACR1
e) MX615
f) MX727 } digestión con Sall

g) pACR1
h) MX615
i) MX727 } digestión con Pst

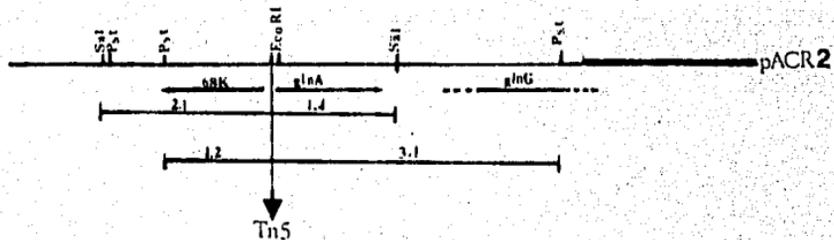
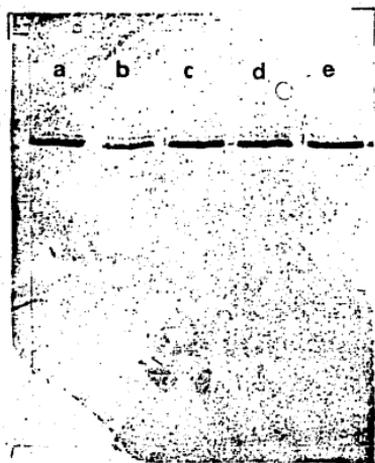


FIGURA II

ELECTROFORESIS EN ACRILAMIDA SDS⁽¹⁾ DE GS PURIFICADA
POR CRISTALIZACION CON SULFATO DE ZINC A PARTIR DE
REVERTANTES Gln⁺ DE MX904



- a) MX615 d) MX 911
b) MX 909 e) MX 912
c) MX910

(1) Tinción azul de Coomassie