

870106  
26  
2ej.

# UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

## ESCUELA DE BIOLOGIA



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### "Aislamiento y secuencia nucleotídica de la región reguladora del gene estructural de la enzima penicilino amidasa de E. coli"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

GUILLERMO GOSSET LAGARDA

GUADALAJARA JALISCO. 1986



## **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.

## I N D I C E

	P49.
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	5
MATERIALES Y METODOS.....	24
RESULTADOS.....	28
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	41
PERSPECTIVAS.....	47
RESUMEN.....	50
BIBLIOGRAFIA.....	51

## INTRODUCCION

La Ingeniería Genética se puede definir como el conjunto de técnicas que permiten aislar y unir el ADN de organismos de la misma especie o de especies distintas *in vitro*, formando moléculas de ADN recombinante o híbridas, las cuales pueden ser introducidas a una bacteria donde serán replicadas y mantenidas indefinidamente.

El poder de esta tecnología radica en la facilidad con la que permite a un investigador el aislamiento de una región específica del genoma de un organismo, esta región puede abarcar desde varios genes hasta unos pocos pares de bases. Con lo cual es posible un estudio bastante fino de la organización del genoma y de los elementos que lo constituyen. Estas metodologías también han permitido la introducción de genes de varios orígenes en bacterias, y cuando se emplean vehículos de expresión adecuados, estos genes pueden ser sobreexpresados en la bacteria huésped, habiéndose logrado así, la producción de algunas proteínas eucariotas a escala industrial (13).

Como podemos ver, con las técnicas de Ingeniería Genética es posible obtener un conocimiento mucho más profundo (en algunos aspectos) que con cualquier otra técnica. Si este conocimiento se apoya en datos de fisiología y genética, es posible poder describir a

detalle el funcionamiento e interrelaciones de los genes.

Por otra parte, en nuestro laboratorio se ha estado trabajando con el gene que codifica para la enzima penicilino amidasa (PA) de E. coli ATCC11105. Esta enzima cataliza la hidrólisis de la penicilina G, dando como productos ácido fenilacético y ácido  $\beta$ -amino penicilánico ( $\beta$ -AP $\beta$ ), ver fig 1. El  $\beta$ -AP $\beta$  forma el núcleo a partir del cual se pueden sintetizar las penicilinas semisintéticas, las cuales tienen ventajas terapéuticas sobre su precursor, la penicilina G (20). Aunque el  $\beta$ -AP $\beta$  puede ser producido mediante métodos químicos, la hidrólisis de la penicilina G resulta más económica si se emplea la PA de E. coli. (34). Debido a que la PA proveniente de E. coli ATCC 11105, es la enzima más utilizada para la producción de  $\beta$ -AP $\beta$  a nivel industrial, y es además interesante desde el punto de vista de investigación básica (ver sección de antecedentes), se decidió realizar un estudio sobre el gene que codifica para dicha enzima, que aportara información sobre los posibles elementos que intervienen en la regulación de su expresión a nivel de transcripción.

Por lo mencionado anteriormente, se decidió utilizar las técnicas de Ingeniería Genética para la realización del presente trabajo, el cual tiene como objetivo principal la determinación de la secuencia nucleotídica de la región reguladora del gene estructural de la enzima penicilino amidasa (PA) de Escherichia coli ATCC 11105. Los objetivos secundarios son los siguientes:

a).- Análisis de la secuencia de la región reguladora del gene que codifica para la PA (pac), comparándola con regiones de regulación de otros genes.

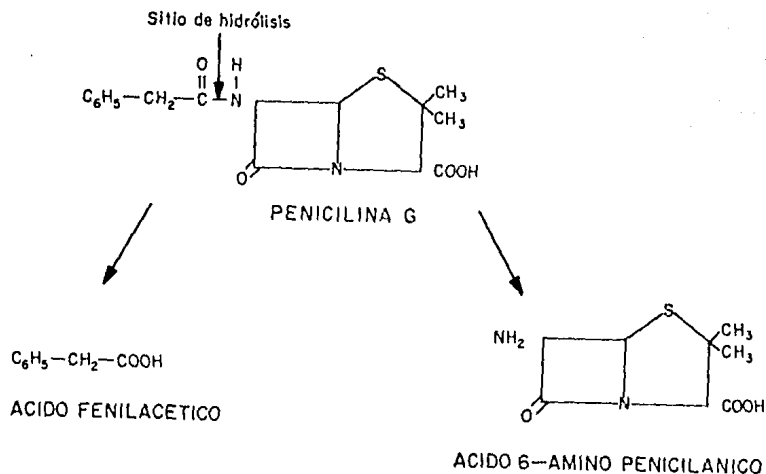


Figura 1.- Hidrólisis de la penicilina G por la penicilino amidasa. La flecha indica el sitio de corta. Los productos de la reacción son el ácido fenilacético y el ácido 6-amino penicilánico, este último forma el núcleo a partir del cual se producen las penicilinas semisintéticas.

b).- Determinación del inicio de la transcripción del gene pac,  
y localización del promotor funcional.

Al cumplir con estos objetivos, será posible proponer un modelo de regulación que tome en cuenta tanto la información obtenida de estudios fisiológicos de la expresión del gene para la FA, así como los resultados de este trabajo. Logrando de esta forma una descripción más precisa de la regulación de un gene procarionte a nivel de la transcripción.

## ANTECEDENTES

Debido a la importancia industrial de la enzima penicilino amidasa (PA) de E. coli, se han realizado estudios con el fin de conocer como es regulada la producción de esta enzima por distintos factores del medio externo. Se ha determinado que ciertas sustancias presentes en el medio de cultivo afectan el grado de producción de la enzima, en algunos casos haciéndola casi nula, y en otros aumentándola considerablemente. De esto se deduce que *pac* no es un gene que se expresa constitutivamente, sino que responde a cambios en el medio en el que se encuentra E. coli. A continuación se mencionan los factores que afectan la producción de la PA, y en que forma lo hacen:

El ácido fenilacético ha sido identificado como el inductor del gene *pac*, su adición al medio de cultivo ocasiona un incremento de 8 a 10 veces en la síntesis de la enzima. Este efecto se logra cuando la concentración del ácido fenilacético es del 0.1 %. A una concentración mayor, este ácido es un inhibidor del crecimiento de las bacterias. En E. coli la producción de PA se ve reprimida por la presencia de glucosa en el medio de cultivo (34, 35). Gang y Shalkh (12) demostró que esta represión está mediada por AMP cíclico, y que ocurría nivel de la transcripción. La temperatura del medio de



cultivo tiene un efecto importante en la síntesis de la enzima, a 30 grados C se presenta la mayor producción (6). En cambio a 37 grados C, aunque las bacterias crecen más rápidamente, no producen enzima en la misma cantidad. También se ha observado que cuando la fermentación se lleva a cabo en condiciones de baja aereación, la producción de enzima es mayor. Se desconoce el mecanismo por el cual el nivel de oxígeno regula los niveles de la enzima (32).

Se han hecho intentos por modificar a la cepa productora de PA, con el fin de aumentar su capacidad como organismo productor de PA. La estrategia que ha dado mejores resultados a sido la clonación molecular del gene pac y su introducción a la misma cepa poseedora del gene, esto trae como consecuencia la sobreproducción de la enzima (5, 11, 25, 26). Además la clonación de pac ha permitido caracterizar con detalle este gene, pues se ha determinado parcialmente su secuencia nucleotídica y el mecanismo por el cual se procesa el precursor de la FA.

La enzima FA es producida como un solo precursor de 92 kD, al cual se le procesa un péptido líder al ser exportado al espacio periplásmico de la bacteria. Después recibe otro corte interno que produce las dos subunidades que forman la enzima madura, una de 20.5 o 21.4 kD y otra de 69 kD. El péptido de 20.5 ó 21.4 kD es la subunidad alfa, contiene en su extremo carboxilo la región en donde se une la penicilina G. Esta subunidad puede encontrarse con dos extremos carboxilos terminales, debido a que los cortes durante el procesamiento pueden ser en dos sitios. En un caso, el extremo carboxilo terminal es una fenilalanina, dando lugar a la subunidad de 20.5 kD. La subunidad de 21.4 kD tiene como extremo carboxilo

terminal a una alanina, que se encuentra a siete aminoácidos de la fenilalanina mencionada con anterioridad. Los dos tipos de subunidades alfa se encuentran en cantidades aproximadamente equimolares, por lo tanto es posible suponer que la frecuencia de corte en los dos sitios es similar. El péptido de 69 Kd es la subunidad beta, esta contiene el sitio catalítico de la enzima. Solo posee un extremo amino terminal, una serina. Esto indica que debe de ocurrir otro corte que elimine los 54 ó 62 aminoácidos existentes entre el extremo carboxilo terminal de la subunidad alfa y el amino terminal de subunidad beta. Ver fig. 2. Este tipo de procesamiento, en el que una proteína pierde un péptido conector interno, es común para algunas proteínas de origen eucariote, pero es la primera vez que se reportó para una proteína bacteriana (5). La información obtenida a partir de la secuencia nucleotídica de una parte de este gene, confirma en parte el modelo propuesto para el procesamiento de la PA. Hasta el momento no se ha estudiado la región reguladora de parte a nivel de secuencia nucleotídica, al conocerla será posible compararla con la de otros genes, lo cual permitirá la localización de regiones de regulación homólogas. Posteriormente la función de estas regiones podrá ser demostrada en forma experimental.

Hasta el momento, se han secuenciado las regiones reguladoras de varios genes. Esto ha generado una serie de datos, los cuales han permitido reconocer que existen sitios en común entre ellas, los cuales cumplen funciones específicas dentro de la regulación de la expresión genética. Por lo general los genes que intervienen en una determinada vía metabólica, se encuentran agrupados en operones o unidades de transcripción. Cada operón tiene por lo menos un promotor, el cual permite la transcripción coordinada de todos los

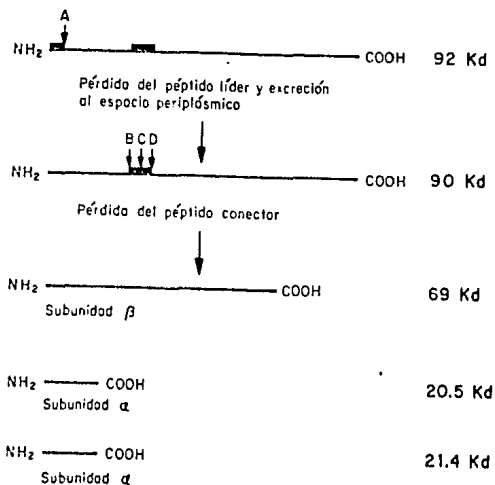


Figura 2.- Procesamiento de la enzima PA. El proprecursor de la enzima pierde el péptido líder al recibir un corte en el sitio A, y es exportado al espacio periplásmico. En este, pierde un péptido conector, por medio de un corte en el sitio D y otro que ocurre con igual frecuencia en el sitio B o C. Estos cortes dan origen a los dos tipos de subunidades alfa y la subunidad beta, la enzima activa se forma de la unión de una subunidad alfa con una beta.

genes que lo conforman. En algunos casos se han encontrado promotores dentro de las unidades de transcripción, los cuales permiten la expresión diferencial de algunos de los genes que la constituyen. Un promotor es una región en el ADN que abarca aproximadamente 40 pares de bases, es el sitio donde interacciona la ARN polimerasa para iniciar la transcripción. Los promotores son regiones en el ADN, formadas por una secuencia asimétrica, la cual siempre se presenta en el ADN en la cadena con sentido. A partir de la secuencia de 168 promotores, se determinó una secuencia consenso, tomando en cuenta las bases que se conservaban con mayor frecuencia. Se sabe que esta secuencia consenso es la que tiene la mayor afinidad por la ARN polimerasa. La secuencia consenso es: TTGACA y TATAAT, aproximadamente 35 y 10 pares de bases antes del inicio de la transcripción respectivamente. La distancia entre esos dos sitios tiende a variar poco, siendo en promedio 17 pares de bases. Existen también algunas otras bases que tienden a conservarse, aunque no con tanta frecuencia, estas se encuentran cercanas a los sitios -10 y -35 mencionados anteriormente. En la fig. 3 se muestran las frecuencias observadas para las bases más conservadas de un promotor de E. coli (14, 27).

En los genes que responden a regulación por el nivel de AMP cíclico, se ha encontrado la presencia de uno o más sitios de unión para la molécula CRP. Esta proteína funciona como activador de la transcripción en varios genes de E. coli, facilitando la unión de la ARN polimerasa al ADN. Los sitios de unión para CRP se caracterizan por la conservación de ciertas bases, siendo la secuencia consenso:

	T	T	G	A	C	A	-	T	A	T	A	A	T
G	9.8	5.4	78.6	2.7	9.8	15.2	-	9.8	0.9	16.1	15.2	12.5	0
A	1.8	5.4	1.8	64.3	23.2	44.6	-	1.8	94.6	25.9	58.9	50.9	0.9
T	82.1	83.9	9.8	17	13.4	33	-	79.5	2.7	43.8	13.4	17	96.4
C	6.3	5.4	9.8	16.1	53.6	7.1	-	8.9	1.8	14.3	12.5	19.6	2.7

Figura 3.- Frecuencias de aparición de las cuatro bases en la secuencia consenso de promotores de E. coli. Esta frecuencia se expresa en porcentajes, tomando 112 como 100%.

5'-A A N T G T G A N N T H K K N C A N A T T-3'.

Las frecuencias observadas para cada una de las bases del consenso se pueden ver en la fig. 4. A diferencia de los promotoras, los sitios de unión para CRP es posible encontrarlos en las dos cadenas del ADN. La distancia de estos sitios a el inicio de la transcripción puede ser desde 107 hasta 36 pares de bases. En algunos genes se han encontrado dos sitios de unión para CRP, uno de los dos sitios tiene menor afinidad que el otro debido a que no se acerca tanto al consenso, se cree que el sitio secundario no es funcional, únicamente atrae a la proteína CRP con el fin lograr una mayor concentración de la misma en la proximidad del sitio funcional

	A	A	H	T	G	T	G	A	2H	T	4H	C	A	H	A	T	T
G	6.3	12.5	-	0	94.1	0	100	0	-	11.8	-	0	29.4	-	11.8	23.5	0
A	56.3	62.5	-	0	0	5.9	0	100	-	11.8	-	5.9	52.9	-	64.6	11.8	35.3
T	31.3	18.8	-	88.2	5.9	94.1	0	0	-	52.9	-	23.5	5.9	-	11.8	52.9	58.8
C	6.3	6.3	-	11.8	0	0	0	0	-	23.5	-	70.6	11.8	-	11.8	11.8	5.9

Figura 4.- Frecuencias de aparición de las cuatro bases en la secuencia consenso de sitios de unión para CRP en E. coli. Esta frecuencia se expresa en porcentajes, tomando 17 como 100%.

de unión de CRP. En algunos casos CRP puede funcionar como represor, cuando al interactuar con el ADN, bloquea la unión de la ARN polimerasa, como es el caso del gen de galactosa.

Otro dato importante que se ha obtenido del estudio de genes regulados por CRP es el siguiente: la región -35 de los promotores de estos genes, se aleja bastante de la secuencia consenso, y en algunos casos no es aparente. La región -10 igualmente es poco parecida al consenso. Esto se explica tomando en cuenta que la función de CRP es estimular la transcripción, por lo tanto no tendría sentido que un promotor fuerte tuviera un sitio de unión de CRP, ya que la función de este último como activador de la transcripción no sería significativa (9, 19).

Otra característica presente en algunos genes es que cercano al promotor, existe una región llamada operador. Estas regiones pueden ser palíndromos perfectos o imperfectos, su tamaño es variable, pero tienden a ser aproximadamente de 20 pares de bases. Estos sitios son reconocidos por proteínas reguladoras específicas para un gen o un grupo de genes. La proteína que interactúa con el operador, recibe el nombre de represor, su función es disminuir el nivel de transcripción del gen que regula. El represor solo se unirá al operador cuando las condiciones metabólicas de la bacteria no requieran que el gen o el operon se exprese en ese momento. Si las condiciones del medio hacen necesaria su expresión, entonces el represor no se unirá al operador y la transcripción continuará a su nivel normal (16).



Por último, otra región importante en la organización del genoma bacteriano es la del sitio del inicio de la traducción de los ARN mensajeros. Esta región interacciona con el extremo 3' del ARN ribosomal 16S. Su secuencia nucleotídica, así como su distancia del codón iniciador, tiende a conservarse en los 124 genes procariotes estudiados. La secuencia de las primeras once bases del extremo 3' del ARN ribosomal es la siguiente: 3'-HO-AUUCUCCACU-5'. Con esta secuencia, los ARN mensajeros son complementarios en su extremo 5' en forma parcial generalmente (33).

La mayor parte de los estudios mencionados anteriormente, fueron realizados usando técnicas de ADN recombinante. Ya que el presente trabajo también usará algunas de esas técnicas, a continuación se presentará una breve explicación de ellas.

El origen de las técnicas en ADN recombinante o Ingeniería Genética se remonta a la década de los setentas, en la cual se realizan los primeros experimentos para la creación de moléculas híbridas de ADN en el laboratorio (2).

Fue con el descubrimiento de que el ADN es la molécula portadora de los caracteres hereditarios, por Avery y sus colaboradores (1), que se inició la manipulación del ADN in vitro. Avery logró la transferencia de material genético de una cepa virulenta de *Pneumococcus* a otra que no lo era, aislando in vitro el ADN de la primera y poniéndolo en contacto con la segunda. Este tipo de manejo del ADN, al igual que otros con los que se contaban hasta antes de la ingeniería genética, permitía la transmisión de material genético

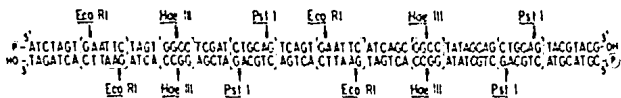
entre bacterias de la misma especie, pero tenia varias limitaciones, una fue que no era posible seleccionar la región del ADN del organismo donante a introducir en la bacteria receptora, por lo que era necesario buscar entre toda la población de bacterias, aquellas que contenían los marcadores genéticos que se deseaban, lo cual no siempre se podía hacer fácilmente. Además estos primeros intentos estaban limitados a la transferencia de ADN entre organismos de la misma especie.

Fue hasta después de una serie de descubrimientos dentro del Área de la Biología Molecular, que se contó con las herramientas necesarias para la manipulación del ADN in vitro en una forma fina y reproducible.

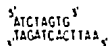
Uno de estos descubrimientos, fue el de las enzimas de restricción, estas fueron descubiertas gracias a los estudios de interacciones de bacteriófago-bacteria por Luria y Human (21). Posteriormente estas enzimas fueron caracterizadas y purificadas, lo cual permitió su uso como herramienta para la modificación del ADN in vitro. Las enzimas de restricción se dividen en tres clases en base a su estructura y modo de acción. Las enzimas de la clase II son las más utilizadas en experimentos de ingeniería genética, su utilidad radica principalmente, en que estas reconocen y cortan el ADN en sitios específicos. El sitio de reconocimiento es una secuencia que puede ser de 4 o más pares de bases, este sitio tiene la característica de ser en la mayoría de los casos un palíndromo. Una región de ADN es un palíndromo, cuando su secuencia es idéntica al leerse en las dos cadenas de ADN en dirección 5' a 3'. Una vez que la enzima reconoce el sitio de restricción, procede a realizar un corte

en cada una de las dos cadenas. Algunas enzimas cortan el ADN al mismo nivel en las dos cadenas, otras lo hacen a distintos niveles generándose esa forma extremos que contienen regiones de cadena sencilla, las cuales son complementarias entre sí. Algunos sitios de reconocimiento y tipos de cortes generados se muestran en la fig. 5.

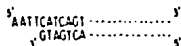
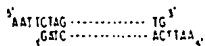
Las enzimas de restricción permiten la disección de fragmentos grandes de ADN en otros más pequeños, los cuales pueden ser caracterizados con mayor facilidad. Esto ha hecho posible el estudio detallado del genoma de organismos eucariotes y ha permitido el aislamiento de genes individuales para su estudio posterior (29, 30). Los fragmentos generados por la acción de una enzima de restricción, pueden ser estudiados directamente o pueden ser introducidos a una bacteria donde serán mantenidos indefinidamente. Sin embargo generalmente un fragmento de ADN no se puede mantener dentro de una bacteria si carece de regiones de replicación específicas. Este problema se ha resuelto con la construcción de vehículos moleculares de clonación. Estos son moléculas de ADN circular, los cuales tienen la propiedad de ser replicados y transcritos por la maquinaria enzimática de la bacteria huésped. Se han derivado de plásmidos y bacteriófagos, los cuales se modificaron con el fin de funcionar como vehículos de clonación molecular. El vehículo molecular que se desee usar, es digerido con la misma enzima de restricción que se utilizó para el aislamiento del fragmento de ADN que se quiere estudiar, o con una enzima que deje extremos compatibles para la unión. Solo es posible la unión covalente, si se utiliza la enzima ADN ligasa, la cual forma dos enlaces fosfodiéster en cada uno de los dos extremos (4).



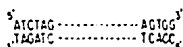
Digestión con *Eco RI*



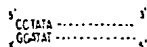
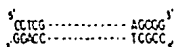
Extremos adhesivos hélice sencilla 5'



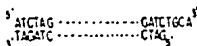
Digestión con *Hae III*



Extremos cuadrados



Digestión con *Pst I*



Extremos adhesivos hélice sencilla 3'

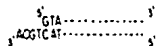
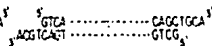


Figura 5.- Sitios de reconocimiento y corte para las enzimas de restricción *Eco RI*, *Hae III* y *Pst I*. Las flechas indican los sitios de corte de cada una de las enzimas en el fragmento de ADN de doble cadena. En la parte inferior se muestran los fragmentos resultantes de la acción de cada una de las enzimas, así como los extremos generados.

Una vez que se tiene la molécula de ADN recombinante, es necesario introducirla a una bacteria donde pueda ser mantenida por replicación. Esto se logra por medio del proceso de transformación. Este consiste en la adquisición de ADN del medio externo por una bacteria, el cual es integrado al cromosoma bacteriano o es mantenido como un plásmido. En E. coli la transformación no ocurre en forma natural, sin embargo existen métodos para lograr la transformación de E. coli artificialmente. Estos consisten en la modificación de las membranas celulares con sustancias químicas, las cuales la hacen más permeable al ADN. Una vez que el vehículo molecular entra a la bacteria, es replicado, y junto con el, el ADN que le fué ligado (8, 22). De esta forma es posible obtener cantidades importantes del fragmento de ADN que se introdujo en el vehículo, lo cual permite su caracterización física.

Una de las técnicas más útiles para el estudio del ADN es aquella que permite la determinación de la secuencia de bases que lo conforman. Existen dos métodos para secuenciar ADN:

1).- El método de Maxam y Gilbert se basa en la ruptura específica del ADN al nivel de cada una de las cuatro bases que lo componen: citosina, adenina, guanina y timina. La ruptura se hace en forma parcial, usando sustancias químicas las cuales cortan el ADN en forma específica. El ADN usado es marcado radioactivamente en uno de sus extremos. Los fragmentos de ADN generados, son separados en un gel de poliacrilamida-urea. Leyéndose la secuencia a partir de la autorradiografía del gel (24). Ver fig. 6.

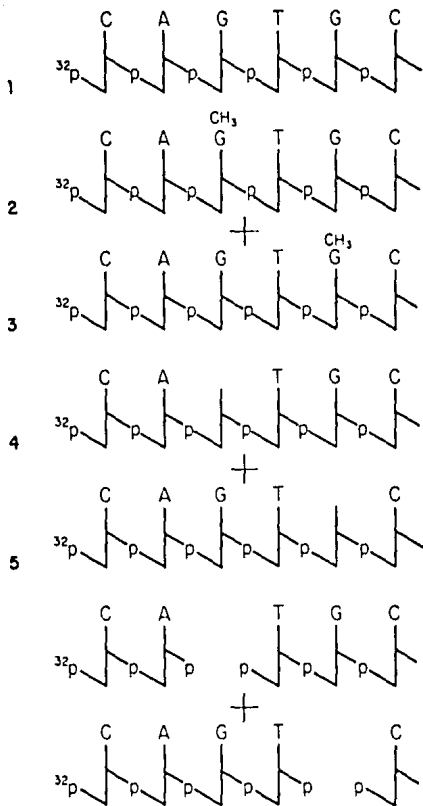


Figura 6.- Método de Maxam y Gilbert para secuenciar ADN. 1.- Marcado del ADN en un extremo con  $^{32}\text{P}$ . 2.- Modificación de las bases al azar, por ejemplo metilación del N7 de las guaninas por dimetilsulfato. 3.- Desprendimiento de las bases modificadas. 4.- Corte de la cadena por beta deaminación de los fosfatos de los azúcares que perdieron sus bases. 5.- Electroforesis de los productos de corte de cada una de las cuatro distintas reacciones de modificación de bases.

2).- El método de Sanger consiste en generar fragmentos de distintos tamaños a partir de la inhibición de la polimerización por dideoxínucleótidos. El ADN que se desea secuenciar es ligado a uno de los derivados del fago M13. Este es un fago filamentososo, el cual durante una fase de su ciclo de vida posee ADN de cadena sencilla, ha sido modificado con el propósito de ser usado para la determinación de la secuencia nucleotídica por el método de Sanger. El fragmento que se desea secuenciar, es insertado en la región del poliadaptador del fago.

Se purifica ese mismo fago en la fase en la que contiene ADN de cadena sencilla como material genético, a este se le llama templado. El templado es colocado en una solución junto con un oligonucleótido sintético llamado primero, que es un fragmento de ADN, el cual generalmente tiene una longitud que va desde 15 hasta 30 bases. La secuencia del primero es complementaria a una región del fago M13 que se localiza adyacente a la región del poliadaptador, de tal forma que el extremo 3' del primero se dirija hacia el poliadaptador. Por lo tanto al someter al templado y al primero a condiciones que facilitan la hibridización, este último se unirá al templado, formando una doble cadena de ADN. El templado y el primero son divididos en cuatro muestras: G, A, T, y C. A cada una de ellas se le adicionarán dideoxínucleótidos y una pequeña proporción del dideoxínucleótido correspondiendo a cada una de las cuatro muestras, de tal forma que en la muestra G estén presentes los cuatro dideoxínucleótidos y además exista una pequeña parte de dideoxiguanosina, lo mismo ocurre con las otras cuatro muestras. Se añade ADN polimerasa, la cual comenzará a copiar el templado a partir del primero. Cuando la polimerasa inserte en la cadena de ADN un dideoxínucleótido, la cadena deja de crecer,

ya que no es posible la formación de un enlace fosfodiéster, al faltar radicales hidroxilo en la posición 3' del dideoxinucleótido. Es así como se generan fragmentos de distintos tamaños, todos terminando en un dideoxinucleótido específico. Estos fragmentos se corren a un gel de poliacrilamida-urea, el cual los separa según su peso molecular; como uno de los dideoxinucleótidos usados durante la polimerización, está marcado radioactivamente, la secuencia puede ser leída directamente de la autorradiografía del gel (31). Fig. 7.

A partir de la secuencia nucleotídica de un fragmento de ADN es posible obtener una gran cantidad de información, como:

a).- Secuencia de aminoácidos resultante de la traducción del fragmento de ADN secuenciado.

b).- Identificación de posibles regiones de regulación.

c).- Determinación de sitios de corte para enzimas de restricción.

Un método usado para la identificación del sitio del inicio de la transcripción, y en forma indirecta del promotor funcional, es el de extensión de primero. Este método se basa en la síntesis de ADN complementario a ARN mensajero, usando la enzima transcriptasa reversa. El sitio del inicio de la síntesis es definido usando un primero sintético, el cual es marcado con un radioisótopo. Se determina el tamaño del fragmento de ADN sintetizado, corriéndolo en un gel de poliacrilamida-urea.

Conociendo de antemano la región donde el primero hibridiza con



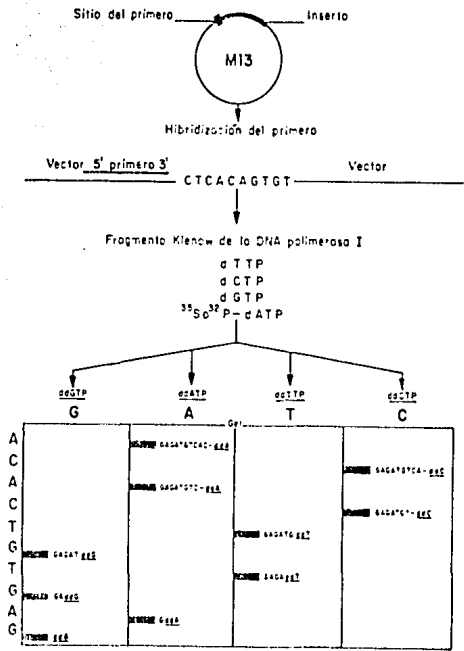


Figura 7.- Método de Sanger para secuenciar ADN (ver antecedentes).

el ARN, es posible saber el nucleótido con el que comienza la transcripción. Comparando la secuencia de la región que precede al inicio de la transcripción, con la secuencia consenso para promotores, es posible identificar al promotor funcional para el gene estudiado (17).

## MATERIALES y METODOS

### Cepas bacterianas.

E. coli K12 HB101 (F<sup>-</sup>, hsdS20(ir<sup>-</sup>, m<sup>-</sup>), recA13, ara-14, proA2, lacY1, gal K2, rpsL20, (Sm<sup>r</sup>), xyl-5, ml1-1, supE44, lambda<sup>-</sup>).

E. coli JH101 sup E, thi, delta(lac-pro AB), (F<sup>r</sup>, tra D36, pro AB, lac Iq 2 delta HIS).

E. coli ATCC 11105

Transformación de una cepa de Escherichia coli (16).

Purificación de ADN de plásmido.

El método utilizado es el que se denomina 'lisis alcalina' (23).

Microensayo de ADN de plásmido.

El método es similar al anterior pero en este caso se crecen solo 3 ml.

de células. Los pasos son idénticos al anterior hasta obtener el sobrenadante claro que en este caso se extrae con fenol-cloroformo y se precipita con etanol. Se resuspende en 10 ul de agua y está listo para ser digerido con la enzima de restricción deseada (23).

#### Electroforesis de ADN en geles de agarosa o poliacrilamida.

La electroforesis se llevó a cabo en placa. Los geles de agarosa se corrieron a 150 V durante una hora en solución amortiguadora Tris-boratos-EDTA (TBE). Los geles de acrilamida se corrieron a 200 V durante una hora en solución TBE (3).

#### Electroelución de fragmentos de ADN a partir de un gel.

Se siguió el método reportado por Maniatis (23).

Extracción de ADN con fenol:cloroformo (23).

Síntesis química de ADN.

Se utilizó el método de fosfotriéster sobre fase sólida (10).

Secuencia de ADN.

Los fragmentos de ADN clonados en derivados del fago M13 fueron secuenciados por el método de Sanger (31).

Purificación de ARN total.

ARN total de E. coli fue purificado siguiendo el método comunicado por Riba (28).

Extensión de primero.

El método utilizado es una modificación del reportado por Leon (17). Se marca el primero en su extremo 5', usando gama-ATP (P32). Se usa un exceso 100X molar, de primero en relación al ARN mensajero específico. Se usan 50 uCi para 2 pmol de primero. Mezclar el ARN total con el primero marcado y precipitar con NaOAc 3M 1/10 del volumen, y etanol 2.5 volúmenes. Resuspender en: 1 ul Tris 50 mM, 2ul EDTA 1 mM y 2.7 ul de agua. La mezcla se deja 5 min. a 100 grados C, y se congela inmediatamente en hielo seco. Descongelar a

temperatura ambiente durante 45 min. Poner en baño maría a 43 grados durante 13 hrs.

Agregar:

1 ul Tris 1M pH 8.3

2ul HgCl<sub>2</sub> 0.1 M

1 ul dTTP 20 mM

1 ul dATP 20 mM

1 ul dCTP 20 mM

1 ul dGTP 20 mM

0.4 ul DTT 0.2 M

0.8 ul KCl 1 M

15-25 unidades de transcriptasa reversa.

Se deja en baño maría a 43 grados C durante 30-45 min. Se hierve 5 min. Agregar 1ul de RNasa A (10 mg/ml) en un volumen total de 100 ul, dejar 1 hr. a 37 grados C. Extraer con 1 volumen de fenol. Agregar 5 ul de tRNA (1 ugr/ul). Precipitar con 1/10 de volumen de NaOH 3M y 2.5 volúmenes de etanol. Lavar con 250 ul de etanol al 70%, dos veces. Se resuspende en 3ul de agua y se agregan 5 ul de mezcla de parada de secuencia. Se hierven las muestras de 2.5 min. y se corren en un gel de secuencia.

## RESULTADOS

1.-Aislamiento de fragmentos de ADN que contienen la region que precede al gene estructural de la enzima FA.

Se cuenta con varios plásmidos portadores del gene pac, uno de ellos, el pFA2, tiene un inserto de ADN cromosomal de 7.5 kb dentro del cual se encuentra el gene de la FA. Se ha observado que al transformar con el pFA2 una cepa que carece de este gene, la expresion del gene se ve regulada por el acido fenilacetico. Por otra parte se sabe que plásmidos derivados del pFA2, que solo llevan el sitio HindIII proximo al gene estructural, no contienen la region reguladora (5). En base a estos datos era de esperarse que el pFA2 llevara las regiones de regulacion normales del gene para la FA.

Torando como base el mapa de restriccion de los plásmidos pFA2 y pFA4, y la secuencia nucleotidica de las primeras 1400 pares de bases del gene estructural, se decidio aislar fragmentos obtenidos de la digestion del plásmido pFA2 con la enzima HpaII. Esto se hizo con la idea de obtener fragmentos que llevaran tanto parte del gene estructural, del cual se conocia parte de la secuencia, y parte de la region que le antecede. Se hicieron digestiones dobles HpaII-HindIII, con el fin de localizar las bandas que eran cortadas por la última

enzima, esto indicaría que fragmentos contenían un sitio de HindIII. Ya que solo existen tres sitios de HindIII en el pPA2, y el gene estructural se encuentra a 49 pares de bases de uno de ellos, la probabilidad de que una de esas bandas de HpaII sea la que contenga parte de la region reguladora es de 1/3.

Una vez localizadas las bandas, se procedio a digerir plasmido pPA2 con la enzima HpaII. Esta digestión se corrió en un gel de acrilamida al 7.5 %. Las bandas de interés se cortaron del gel y se electroeluyeron. Además se decidió aislar el fragmento de HindIII que antecede al gene estructural de la PA en el plasmido pPA2. Este fragmento se identificó haciendo digestiones sencillas del plasmido pPA2 con la enzima HindIII, y digestiones dobles HindIII-EcoRI. La unica banda que no fue cortada por EcoRI, es la que antecede al gene estructural de la PA. En la fig. 8 se muestran los mapas de restricción de los plásmidos pPA4 y pPA2. El fragmento de HindIII del pPA2 aislado tiene 2300 pares de bases, debido a las limitaciones técnicas del método de secuencia utilizado, solo era posible secuenciar la region reguladora en una de las dos orientaciones. Como se carece de datos acerca del mapa de restricción de esa region, no es posible saber cual extremo del fragmento ha sido secuenciado.

Existen dos formas de saber en que orientación se encuentra el fragmento clonado, una de ellas es buscando sitios de restricción en la secuencia y posteriormente localizándolos en el plasmido pPA2; la otra es comparando la secuencia del fragmento de HindIII fragmento III. con los fragmentos de HpaII fragmentos I y II, ya que en estas últimas no existe duda sobre su orientación.



## 2.-Clonación de los fragmentos en el fago M13.

Los fragmentos de HpaII del pFA2, fueron ligados al fago M13 mp8 digerido con la enzima AccI, esto fué necesario hacerlo ya que no existe sitio de HpaII en el poliadaptador del mp8. Los extremos AccI y HpaII son cohesivos entre si, sin embargo al ser ligados, desaparecen los dos sitios de restricción. El fragmento de HindIII del pFA2, se ligo al fago M13 mp18 digerido con la misma enzima. En la figura 9 se explica la construcción de las clonas I y II, en la fig. 10 la construcción de la clona III.

## 3.-Identificación de los fragmentos por la técnica de microensayo.

Después de haber ligado los tres fragmentos, se transformaron en la cepa JM101. Se obtuvieron placas blancas y azules en las tres cajas. Debido a que ocasionalmente la presencia de placas blancas puede ser el resultado de una delección en la región del poliadaptador, se determino la presencia de inserto en el fago, usando la técnica de microensayo. Se estudiaron 20 clonas de los tres tipos ( I, II y III ), y en todas se encontró inserto (datos no mostrados). Para secuenciarlas, se tomaron algunas de esas clonas.

## 4.-Determinación de la secuencia nucleotídica de las tres clonas.

En la fig. 11 se muestra la orientación y el tamaño de las tres clonas obtenidas. Se puede observar que la clona III abarca parte del gene estructural y parte de la región reguladora. Se utilizo la técnica de Sanger para secuenciar los tres fragmentos insertados en el fago M13. En total se lograron leer 361 bases en dirección 5' a partir del codon inicial del gene estructural. Inicialmente no se

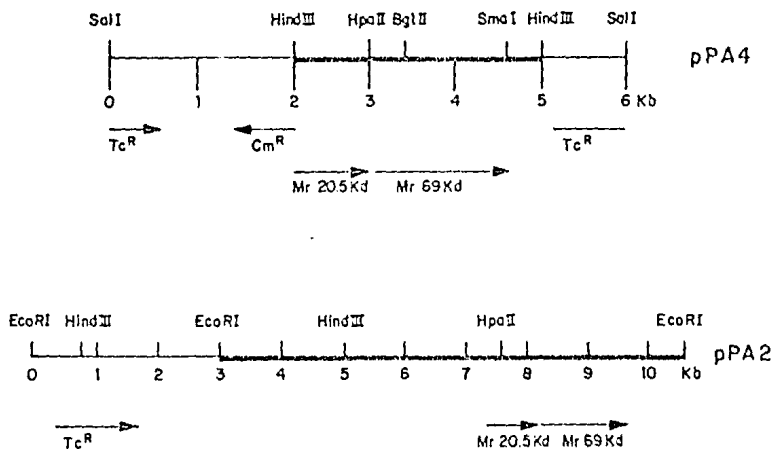


Figura 8.- Mapas lineales de los plásmidos pPA2 y pPA4. La línea gruesa indica ADN cromosomal de *E. coli* ATCC 11105 y la línea delgada el vehículo de clonación. Las flechas representan algunos de los genes expresados en los dos plásmidos, tanto del vehículo como del inserto. Solo se indican los sitios de restricción más importantes para este trabajo.

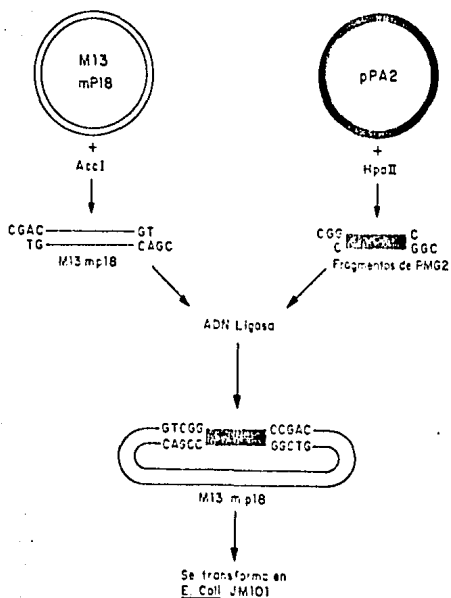


Figura 9.- Construcción de las clonas I y II. Se digirió al fago M13mp18 con la enzima *AccI* y al plásmido pPA2 con la enzima *HpaII*. Se purificaron los fragmentos del pPA2 que contenían la región reguladora, y se unieron en forma covalente al fago M13mp18 usando la enzima ADN ligasa. En esta construcción se pierden los dos sitios usados para la clonación, *AccI* y *HpaII*.

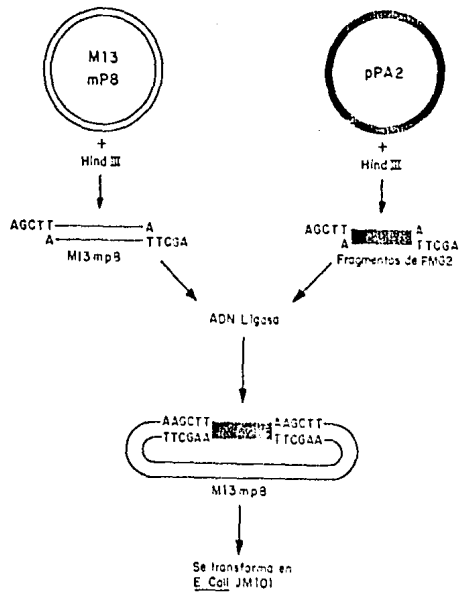


Figura 10.- Construcción de la clona III. Se digirió tanto al fago M13mp8 como al plásmido pPA2 con la enzima HindIII. Los fragmentos del plásmido pPA2 se unieron en forma covalente al fago M13mp8 usando la enzima ADN ligasa.

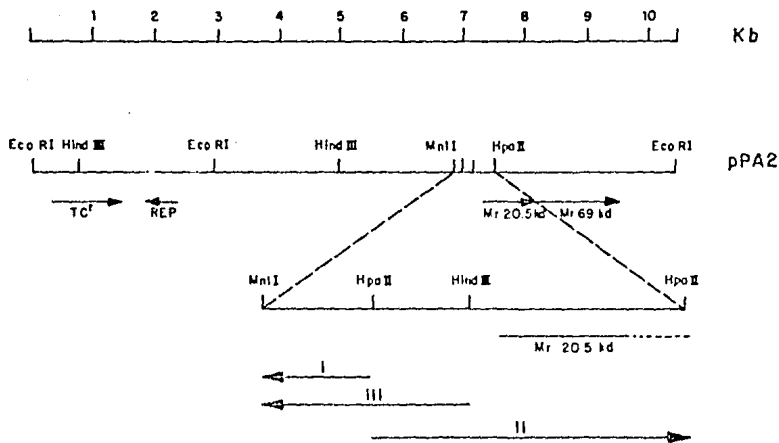


Figura 11.- Tamaño y orientación de las tres clonas usadas para determinar la secuencia de la región reguladora del gene para la PA. Se muestra un mapa del plásmido pPA2, y una ampliación de la región secuenciada, indicando el tamaño y la orientación de las clonas I, II y III.

estaba totalmente seguro de que la clona III fuera la que contenía la región que precedía inmediatamente al gene estructural, fué hasta que se secuenció la clona II, que se logró confirmar esa hipótesis. La clona II abarca parte tanto del gene estructural como de la región que la precede. Al comparar la clona II con la III, se confirmó que efectivamente esta última contenía la región que antecede al gene estructural. La clona III lleva el inserto en la misma orientación que la clona I.

Se corrieron en total 27 secuencias, veinte de ellas fueron en geles sin gradiente. Estas se corrieron a distintos tiempos, desde una hora hasta 6 horas, esto se hizo con el fin de lograr leer el mayor número de bases de cada una de las tres clonas. Como se tuvieron algunos problemas en ciertas regiones de la secuencia, debido al empaquetamiento de bandas que correspondían a citidinas consecutivas, se decidió hacer secuencias en geles con gradiente. En total se hicieron siete, sin embargo estas no lograron determinar el número de bandas. Este problema se resolvió corriendo geles sin gradiente, durante 5 horas, lo cual ocasionó que las bandas se separaran lo suficiente para permitir su lectura. Al reunir la información obtenida a partir de todos geles de secuencia de las tres clonas, se lograron leer en total 331 bases en dirección 5' a partir del codón inicial de la PA. Esta secuencia se muestra en la fig 12.

#### 5.- Análisis de la secuencia.

Al obtener la secuencia nucleotídica de la región que precede al gene estructural de la PA, se procedió a compararla con la secuencia de regiones reguladoras de otros genes. Tomando como base las reglas

-381  
5 -CGGTACCCAGGGAGCGATGTGGAGTCAACTATGGCCGGCCTGTTGGCAANTGCTGCCTGT

AsuII  
CTGCATTCGAAANTGGCTACAAATCCAAACCTAAAGAICGTTTACAACATATTTTTCTCG

ATTACATCAGATAATG=CCTGAGCTGTCTCTCTGGGGCCTCATCTATGGCTCCGGG HpaII

CGATCTGTCACTAAAGGAATAGAAACAAATCATLACCGGTCANTAAAGCATTCTGTT

TGCTCCTGTTAATGAAATTTTTGTATCAAAATTAATTATCGCGCTCACAGTTCATAAT

HindIII  
GAAACAACTTCTCTGCAATAGATAAACCCGAAAGCTTCGTTGCTAGTATCAATTCCTAATT

\*| \*\*\*  
ATACACCTGCCAGGGATACAAATGAAAAATAGAAATCGTATGATCGTCAACTGTGTTACTGCT  
MetLysAsnArgAsnArgMetIleValAsnCysValThrAla

\*\*\*\*\*  
ICCCGATGATATTATTGGAGCTTACCCTGCACTG...J  
SerLeuMetTyrTyrTrpSerLeuIleAlaLeu...COOH

Figura 12.- Secuencia nucleotídica de la región reguladora del gene pac. Se muestran 381 bases que preceden el codón inicial del gene estructural. Las primeras 75 bases que codifican para la enzima PA inician a partir de +1, debajo de la secuencia se muestra el péptido resultante de su traducción. El sitio de hibridización del primero se indica con el símbolo \*. Se indica la posición de los sitios únicos de HindIII, HpaII y AsuII.

propuestas por Stormo et al (33), se localizó un posible sitio de unión a ribosoma, el cual coincide con el propuesto por Bruns et al para el gene de amidasa (12). Las reglas usadas para la localización de este sitio son las siguientes: secuencia complementaria al extremo 3' del ARN ribosomal 16S, (no G en -3), (menos de 2 G entre -7 y -1), (una A o T en +5) y (una A o T en +10).

Se buscaron sitios de unión para la proteína CRP en toda la secuencia. Se encontraron dos posibles sitios, uno ó8 pares de bases antes del inicio de la transcripción y otro 110. A continuación se comparan con la secuencia consenso:

CONSENSO:	A A N T G T G A N N T N N N N C A N A T T
SITIO -68:	A A N T G T G A N N G N N N N A A N T A A
SITIO -110:	T A N T G T G A N N T N N N N C G N A T C

La comparación con el consenso permite observar que el grado de homología es ligeramente mayor para el sitio -110, que para el sitio -68.

Se encontraron tres secuencias palindrónicas centradas en las siguientes posiciones: -85, -18/-19 y +4/+5. Al realizar la traducción de la secuencia obtenida, no se encontró ninguna fase abierta de lectura de tamaño significativo.

5.- Determinación del inicio de la transcripción por el método de extensión de primero.

Con el fin de identificar el sitio del inicio de la transcripción del gene estructural de la PA, se realizó un



experimento de extensión de primer. Se sintetizó un oligonucleótido de 21 bases, siguiendo el método de fosfotriéster sobre fase sólida. La secuencia de este se escogió tomando en cuenta que debería de hibridizar en una región del ARN mensajero que se encontrara entre 100 y 200 bases a partir del probable inicio de la transcripción. Una vez que hibridice, será usado como primer por la enzima transcriptasa reversa, para sintetizar ARN complementario al ARN mensajero. El sitio de hibridización del oligonucleótido en la secuencia del gen estructural se muestra en la fig. 12.

Se purificó ARN total de las siguientes cepas: ATCC 11105 y ATCC 11105 + (pFA2). Estas cepas fueron crecidas en un medio que contiene el inductor ácido fenilacético, en una concentración del 1%, el cual también actúa como fuente de carbono. Este medio es el que causa la máxima producción de la enzima FA.

La pureza del ARN extraído de las dos cepas fue comprobada, corriendo muestras en un gel de agarosa-hidroxietil mercurio, no se encontró ARN contaminante ni degradación del ARN ribosomal (datos no mostrados), lo cual indicaba que el ARN extraído podía ser utilizado para la extensión de primer. Se marcó 1.5 pmol del oligonucleótido con 50 uCi de gama-ATP. Se utilizaron 50 ugr de ARN total de cada una de las dos cepas, para hibridizarlo con el primer marcado. El ARN de la cepa ATCC 11105 fue hibridizado con 0.1 pmol de primer marcado. Para el ARN de la cepa ATCC 11105 + (pFA2), se usó 1 pmol. La diferencia en la cantidad de primer usado es debido a que se esperaba una mayor cantidad de ARN mensajero específico en la cepa portadora del plásmido pFA2. Se usaron los siguientes controles: a) primer marcado + transcriptasa reversa + nucleótidos. b) primer

marcado + ARN total de la cepa ATCC 11105 + deoxinucleótidos.

En la fig. 13 se muestra la autorradiografía de uno de los geles de secuencia corridos con las muestras de la extensión de primer. Este experimento se repitió dos veces, en ambos casos se encontró una sola banda de ADN complementario, de 89 ó 90 nucleótidos en los carriles que corresponden a las muestras de las cepas ATCC 11105 y ATCC 11105 + (pPA2). En los carriles de los controles no se encontraron bandas. La resolución de los geles de secuencia usados para correr las muestras, no permitieron determinar con exactitud el tamaño de la banda de ADN complementario.

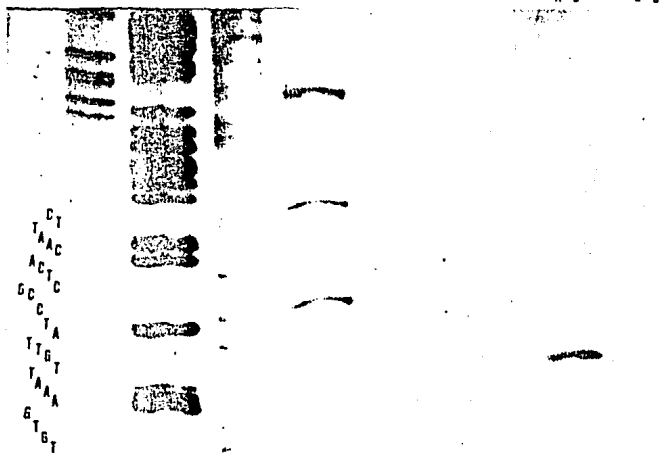


Figura 13.- Autorradiografía de la extensión de primero para el gene pac. Se indica parte de la secuencia nucleotídica del fago H13 mp8 usado como marcador. Se corrieron los productos de la extensión de primero del ARN de las cepas ATCC11105 y ATCC1105 + pPA2 en los carriles A y B respectivamente. En los carriles a y b se corrieron los dos controles mencionados en la sección de resultados.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

A partir del tamaño de la banda obtenida en el experimento de extensión de primer, se determinó el inicio de la transcripción para el ARN mensajero del gene estructural de la PA. Este se localiza 30 ó 31 pares de bases antes del codón inicial del gene estructural, en los dos casos el inicio de la transcripción coincide con una timidina. El hecho de que exista ambigüedad en cuanto a la definición del sitio exacto del inicio de la transcripción, no significa que este pueda ocurrir en cualquiera de las dos timidinas, sino que la metodología empleada no permite afirmar en cual de los dos sitios inicia la transcripción. El inicio de la transcripción en una timidina es poco común en E. coli, ocurre solo en cuatro casos de 143 estudiados (14).

A tres ó cuatro pares de bases del sitio del inicio donde comienza transcripción, se encuentra una secuencia que presenta bastante homología con la región -10 de un promotor: TAGTAT. Esta secuencia presenta cuatro de los seis residuos del consenso, incluyendo los tres más conservados, aquellos en las posiciones 1, 2 y 6.

Existe otra secuencia 17 pares de bases en dirección 5', la cual es muy parecida a una región -35 para un promotor: TAGATA. Esta

región coincide en cuatro bases con el consenso y contiene dos de los tres residuos más conservados. A continuación se comparan estos dos sitios con la secuencia consenso:

CONSENSO:        T T G A C A 17pb T A T A A T  
PROMOTOR PA:    T A G A T A 17pb T A G T A T

Tanto el grado de homología de estos dos sitios con el consenso, así como la distancia entre los mismos, y la distancia al inicio de la transcripción, sugieren que constituyen el promotor funcional de la PA, en las condiciones usadas para el crecimiento de la cepa productora para la purificación de AEN.

El posible sitio de unión para CRF en la posición -110, presenta una mayor homología con el consenso, que el sitio en la posición -68. Esto podría indicar que el primero es el sitio funcional para el gene de la PA. Sin embargo, se sabe que la distancia promedio al sitio del inicio de la transcripción para sitios de CRF que favorecen esta última, es de 69 pares de bases, lo cual es dos pares de bases mayor que la distancia del sitio -68, por lo tanto este sitio podría igualmente ser funcional. La información con la que se cuenta en este momento no permite determinar cual de los dos sitios sería el que estimula la transcripción, o si ambos realizan esa función.

Las regiones palindrónicas encontradas en las posiciones -65, -18/-19 y +4 +5, posiblemente estén involucradas en la regulación de la expresión del gene pac. por su posición relativa al promotor y a

los posibles sitios de unión para CRP, podrían ser sitios de reconocimiento para una proteína reguladora, posiblemente una que detecte los niveles de ácido fenilacético en la bacteria. En la fig. 14 se muestran los sitios que posiblemente están involucrados en la regulación del gene para la PA.

Si partimos de la idea de que los sitios que se han encontrado en esta región son funcionales entonces es posible proponer un modelo de regulación en base a los datos que se han obtenido hasta el momento en nuestro laboratorio, sobre el efecto de ciertas sustancias en la inducción o represión del gene para la PA.

Se encontraron dos sitios de unión para CRP, y se sabe que la expresión del gene *pac* está regulada a nivel de transcripción por AMP cíclico. Por lo tanto se puede suponer que el efecto de la concentración del AMP cíclico sobre la expresión del gene *pac* es debido a que la proteína CRP funciona como activador cuando se llega a cierta concentración de AMP cíclico. Además se ha observado que para lograr una alta producción de enzima, aparte de no usar glucosa o alguna otra fuente de carbono que disminuya los niveles de AMP cíclico, es necesario adicionar al medio de cultivo el inductor ácido fenilacético. La inducción de la expresión del gene por el ácido fenilacético, posiblemente sea mediada por una proteína reguladora, la cual sería un represor que funcionaría como tal cuando la concentración de ácido fenilacético fuera baja. Esto se propone, tomando en cuenta la presencia de tres regiones palindrómicas las cuales sobrelapan parcialmente al posible sitio de unión para CRP -68 y al promotor. Por lo tanto, si una proteína reguladora se une a cualquiera de las tres secuencias palindrómicas, no se permitiría el

GATTCGTTTTAGATCACATTAATGAAATTTTTGTATCAAAAATTAGTTATCGCGCTCACAGTTCATAATGAAA  
 CTAAGCAAATCTAGTGAATTACTTTAAAAACATAGTTTTTAATCAATAGCCCGAGTGTCAAGTATTACTTT

-----  
 Sitio de unión a CRP .

-----  
 Sitio de unión a CRP

-----  
 -35

-----  
 -10

\*\*

CAATTCTCTGCAAATAGATAAACCGAAGCTTCGTTGCTAGTATCAATTCGCTAATTATACACCTGCCAGAGGA S.D.  
 GTTAGAGACGTTTATCTATTTGGCTTCGAAGCAACGATCATAGTTAAGCGATTAATATGTGGACGGTCTCT

TACAATG  
 ATGTTAC  
 Met

Figura 14.- Posibles regiones que intervienen en la regulación del gene estructural para la PA. La línea discontinua señala los dos posibles sitios de unión para CRP. La línea punteada indica la región palindrómica. El -35 y el -10 señalan los dos hexanucleótidos que forman el promotor funcional de la PA. Los dos posibles sitios de inicio de la transcripción son indicados por el símbolo \*. La línea continua señala el codón inicial del gene estructural, debajo del mismo se indica la metionina inicial.

contacto de CRP o de la ARN polimerasa con su respectivo sitio de unión. Esto ocasionará que el nivel de la transcripción sea bajo.

En presencia del inductor, el represor no se unirá al operador, si la fuente de carbono que utiliza la bacteria en ese momento es glucosa, el gene se expresará débilmente, ya que CRP no activará la transcripción. Pero si en cambio, la bacteria utiliza una fuente de carbono que no disminuya los niveles de AMP cíclico, la proteína CRP se unirá al ADN, y se incrementará el nivel de transcripción de *pac*. Este modelo de regulación se muestra en la fig. 15, tomando en cuenta solo a uno de los posibles operadores. Este modelo deberá ser comprobado con experimentos posteriores, ya que no se ha demostrado (con excepción del promotor) que los sitios de regulación propuestos, sean funcionales.



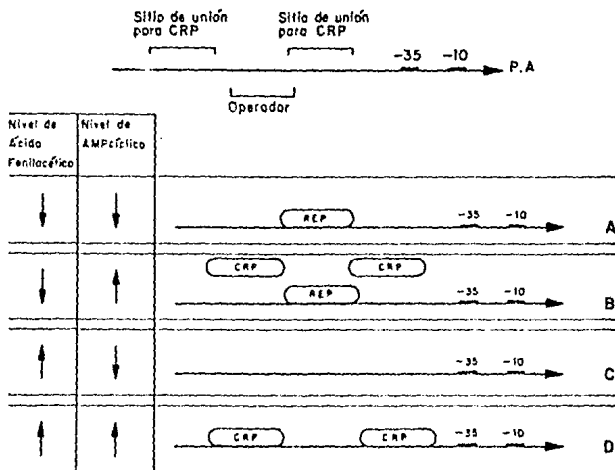


Figura 15.- Modelo de regulación para el gene *pac*. Se indican las posibles interacciones entre las proteínas reguladoras y la región 5' del gene *pac*, bajo distintos niveles de ácido fenilacético y AMP cíclico. El nivel de producción de amidaasa es mínimo en A y en B, aumenta en C, llegando a su máximo en D. Este modelo se basa en datos obtenidos en nuestro laboratorio.

## PERSPECTIVAS

La determinación de la secuencia nucleotídica de la región reguladora del gene *pac*, y la localización del inicio de la transcripción, son la base de futuras investigaciones que permitirán comprender mejor como se regula este gene. A continuación se proponen algunos de los trabajos que se podrían realizar, tomando como punto de partida la información obtenida en esta tesis, y que contribuirían al conocimiento de la regulación de un gene procarionte.

Una forma de conocer cuales son los elementos que intervienen en la regulación de *pac*, consiste en controlar la expresión de un gene, usando la la región reguladora de *pac*. Por lo general para este tipo de ensayos se utiliza un gene mutante de la beta galactosidasa, al cual se le ha deletado su región de regulación, la ventaja de usar este gene es que existen ensayos que permiten identificar con facilidad su producto. Una vez que se fusione la región reguladora de *pac* al gene de la beta galactosidasa presente en un plásmido, se someterá a la bacteria portadora del mismo a condiciones que se sabe afectan la expresión de *pac*. Se espera que la expresión de beta galactosidasa corresponda a la expresión observada para *pac* bajo las mismas condiciones metabólicas. Alguna diferencia sería debida posiblemente a que la regulación en ese caso no es a nivel de la

transcripción, sino que ocurre durante la traducción del ARN mensajero o en algún paso del procesamiento del precursor.

Aunque en este momento se conoce el promotor funcional para *pac* en condiciones que favorecen la producción de la enzima PA. Será necesario investigar si el mismo promotor es funcional bajo distintas condiciones metabólicas. Esto se podría hacer, realizando experimentos de extensión de primer, usando ARN extraído de bacterias crecidas en distintas condiciones, las cuales afecten la expresión de *pac*. Las condiciones se determinarían tomando en cuenta cuales son las condiciones medio ambientales que afectan la producción de la PA, estas se mencionan en la sección de antecedentes.

La determinación de la funcionalidad de los sitios de unión para la proteína CRF, puede realizarse siguiendo dos estrategias, que aunque no son las únicas, posiblemente sean las que aporten la mayor información. Una de ellas sería realizar experimentos de protección *in vitro* (EMSA), usando la proteína CRF, ARF cíclico y el fragmento de ADN a estudiar. Cambiando las concentraciones tanto de CRF como de ARF cíclico, es posible conocer si la unión del activador se presenta en condiciones cercanas a las fisiológicas. Además sería posible conocer en que sitio del ADN es donde se uniría CRF, esto se logra usando agentes que modifican el ADN. Los sitios protegidos por la proteína no serán modificados, siendo posible su localización a nivel de nucleótido, usando métodos similares a los reportados por Maxam y Gilbert para secuenciar ADN.

Otra estrategia consiste en determinar los posibles sitios de interacción CRF-ADN *in vivo*, usando la técnica de secuencia genómica

(7). Esto se hace crecindo las bacterias en distintas condiciones, y tratándolas con dimetilsulfato, esta substancia modifica el ADN libre, pero no aquellas regiones en las que se encuentra unida una proteína. El ADN cromosomal es extraído y secuenciado siguiendo el método de Maxam y Gilbert. Los fragmentos de ADN generados son estudiados usando rastreadores específicos para el gene que se desea estudiar, esto permite conocer los sitios de contacto entre proteínas y ADN. La ventaja de este método sobre el anterior radica en que no es necesario usar proteínas reguladoras purificadas, además de que el estudio se realiza in vivo.

Este método puede ser usado igualmente para determinar si las tres secuencias palindrómicas encontradas en la región reguladora, funcionan como sitios de reconocimiento para una proteína reguladora. Sería necesario modificar el ADN de bacterias que han crecido bajo condiciones en las que la represión del gene *pac* no es debida a la fuente de carbono sino a la ausencia de ácido fenilacético. Es en estas condiciones, en las que se espera que la proteína represora se encuentre unida al ADN. Si esto es cierto entonces el ADN extraído de bacterias crecidas bajo tales condiciones, deberá de estar protegido de la modificación del dimetilsulfato en la región que corresponde al operador.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

## RESUMEN

La enzima penicilino amidasa ( PA ) de *E. coli* cataliza la hidrólisis de la penicilina G para dar como productos el ácido 6-amino penicilánico ( 6-APA ) y el ácido fenilacético. El 6-APA es el núcleo a partir del cual se sintetizan las penicilinas semisintéticas las cuales tienen una utilidad terapéutica mayor que la penicilina G. Se sabe que la expresión del gen que codifica para la PA (pac) está regulada a nivel de transcripción por el tipo de fuente de carbono, esta regulación está mediada por AMP-cíclico. Además la expresión del gen se incrementa si al medio de cultivo se adiciona ácido fenilacético. Otros factores que modifican el nivel de expresión de pac son la temperatura y el nivel de oxígeno.

Con el propósito de conocer con mayor detalle los mecanismos que intervienen en la regulación de este gen, se decidió secuenciar la región reguladora del mismo, así como determinar el sitio del inicio de la transcripción y el promotor funcional. Para este fin, se utilizó plásmido FM62, el cual tiene un inserto de ADN cromosomal que incluye al gen pac y se ha demostrado que responde a las señales de regulación en la forma esperada. En base al mapa de restricción del plásmido FM62, se aislaron varios fragmentos de ADN que llevarán partes de la región que precede al gen estructural pac, para posteriormente ligarlos en los fagos M13 mp8 y M13 mp18. De esta forma se obtuvieron tres clones que llevaban la región que antecede a pac. Se procedió a determinar su secuencia nucleotídica por el método de Sanger. Se lograron leer 361 bases a partir del codón inicial, hacia el extremo 5'.

Con el propósito de establecer el sitio del inicio de la transcripción, se realizaron experimentos de extensión de primer. De esta forma se localizó el inicio de la transcripción para pac, así como el promotor funcional de este gen. El análisis de la secuencia revela dos posibles sitios de unión de CRP, uno de ellos presenta bastante homología con el consenso. Además existen tres secuencias palindrómicas, las cuales por su posición podrían ser un sitio de reconocimiento para una proteína reguladora.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Avery, O. T., MacLeod, C. H., and McCarty, M.. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types I. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus types III. *J. Exp. Med.*, Vol. 79, pp. 137-158. 1944.
- (2) Bolivar, F.. *Ingeniería Genética Molecular*. Ciencia. Vol. 31 pp. 155-163. 1980.
- (3) Bolivar, F., Rodriguez, L. R., Bellach, M. C., y Boyer H. U.. Construction and characterization of new cloning vehicles. I: Ampicillin resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene*, Vol. 2, pp. 75-93.
- (4) Boyer, H. U., Bellach, M., Bolivar, F., Rodriguez, R., Heynaker, H., Shine, J. and Goodman, H.. The construction of molecular cloning vehicles. *Recombinant Molecules: Impact on Science and Society*, Beers R. F. and Bassett E. G., Raven Press. New York. 1977.
- (5) Bruns, U., Hoppe, J., Tsai, H., Bruning, H. J., Maywald, F., Collins, J. and Mayer, H.. Structure of the penicillin acylase gene from Escherichia coli: A periplasmic enzyme that undergoes multiple proteolytic processing. *Journal of Molecular and Applied Genetics*, Vol. 3, No. 1, 1985.
- (6) Casas, L.: Producción del ácido  $\alpha$ -amino penicilánico por hidrólisis enzimática de la penicilina G. Tesis de maestría. U.N.A.M., 1981.

- (7) Church, G. M. and Gilbert, W. Genomic sequencing. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Vol. 81, pp. 1991-1995. 1984.
- (8) Cohen, S. N., Chang, A. C. and Hsu, L.. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by  $\lambda$ -factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 69, pp. 2110-2114, 1972.
- (9) Crombrughe, E., Eusby, S. and Euc, H.. Cyclic AMP Receptor Protein: Role in transcription activation. Science, Vol. 224, 1984.
- (10) Cuevas, G. M. A.. Síntesis de polinucleótidos mediante técnica estandarizada. Adaptador para la endonucleasa PstII. Tesis para químico farmacéutico biólogo. UNAM. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza. Mexico, D. F., 1983.
- (11) Ieretic, V., Francetic, O. and Glisin, V.. Instability of the plasmid carrying active penicillin acylase gene from Escherichia coli: conditions inducing insertional inactivation. FEMS Microbiology Letters, Vol. 24, pp. 173-177, 1984.
- (12) Gang, F. M. and Shaikho, K.. Regulation of penicillin acylase in Escherichia coli by cyclic AMP. Biochimica et Biophysica Acta. 425, pp. 110-114, 1976.
- (13) Gueriguian, J. L.. Insulins, growth hormone, and recombinant DNA technology. Raven Press, New York, pp. 12-33, 1981.
- (14) Hawley, D. and McClure, W.. Correlation and analysis of Escherichia coli promoter DNA sequences. Nucleic Acids Research. Vol. 11, No. 8. 1983.
- (15) Johnson, A., Meyer, E. J. and Flashne, M.. Interactions between DNA-bound repressors govern regulation by the lambda phage repressor. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 76, pp. 5061-5065. 1979.
- (16) Lacks, S., A.. Mechanisms of DNA uptake by cells. Genetic interactions and gene transfer. Erechtoven Synthesis in Ecology, No. 26, pp. 147-159. 1977.
- (17) Leon, F., Romero, D., Garcíarrubio, A., Bastarrachea, F. y Covarrubias

- A., Glutamine Synthetase Constitutive Mutation Affecting the *glnALG* Upstream Promoter of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 164, No. 3, 1985.
- (18) Lewin, B.: Control circuits: A panoply of operons. *Genes*. John Wiley and Sons. U.S.A., 1983.
- (19) Lewin, B.: Promoters: the sites for initiating transcription. *Genes*. John Wiley and Sons. U.S.A., 1983.
- (20) Lowe, D. A., Romancik, G. and Elander R. P.. Penicillin Acylases: A review of existing enzymes and the isolation of a new bacterial penicillin V acylase. *Dev. Ind. Microbiol.* Vol. 22, pp. 163-180, 1981.
- (21) Luria, S. E., and Human, M. L.. A non-hereditary, host induced variation of bacterial viruses. *J. Bacteriol.*, Vol. 64, pp. 557-567.
- (22) Mandel, M., and Higa, A.. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, Vol. 53, pp. 159-162.
- (23) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- (24) Maxam, A. M., and Gilbert, W.. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 74, No. 560, 1977.
- (25) Mayer, H., Collins, J. and Wagner, F.. Cloning of the penicillin G acylase gene of *Escherichia coli* ATCC 11105 on multicopy plasmids. Plasmids of medical, environmental and commercial importance. Timmis, K. and Puhler, A., Elsevier North Holland Biomedical Press. Amsterdam pp. 459-470. 1980.
- (26) Oliver, G., Valla, F., Rosetti, F., Gómez-Pedrozo, M., Santamaria, P., Gosset, G. and Bolívar, F.. A common precursor for the two subunits of the penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC11105. En publicación.
- (27) Reznikoff, U. and Abelson, J.. The *lac* promoter. *The Operon*. Miller, J. and Reznikoff, U.. Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 221-243, 1980.
- (28) Riba, L.. Comunicación personal: 1985.
- (29) Roberts, R.. The role of restriction endonucleases in Genetic



Engineering. Recombinant Molecules: Impact on Science and Society, Beers R. F. and Bassett E. G.. Raven Press, New York, 1977.

(30) Rodriguez, R., Tait, R.. Restriction Endonucleases. Recombinant DNA techniques. Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Ma. 1983.

(31) Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 74, 1977.

(32) Slezar, J. and Vojtisek, V.. Penicillinamidohydrolase in E. coli synthesis of the enzyme, kinetics and specificity of its induction and the effect of oxygen. Chemical Abstracts Biochemistry Sections. Vol. 85 No. 10, 1976.

(33) Stormo, G., Schneider, T and Gold, H.. Characterization of translational initiation sites in E. coli. Nucleic Acids Research. Vol. 10, No. 9. 1982.

(34) Szentirmai, A.. Production of penicillin acylase. Applied Microbiology. Vol. 12, No. 3, pp. 165-167, 1964.

(35) Vojtisek, V. and Slezar, J.. Penicillinamidohydrolase in E. coli III. Catabolite repression, diauxic effect of cAMP and nature of enzyme induction. Chemical Abstracts Biochemistry Sections. Vol. 85, No. 10, 1976.