

166  
Rej.

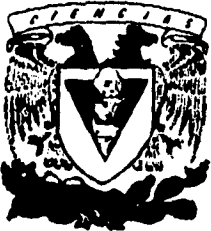


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE  
FRAGMENTOS DE ADN DE *Rhizobium etli*  
QUE COMPLEMENTAN CEPAS MUTANTES DE  
*Escherichia coli cya- y crp*"

**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  
JUAN MAURICIO TELLEZ SOSA



Este trabajo se realizó en el Centro de  
Investigación sobre Fijación de Nitrogeno UNAM  
bajo la asesoría del Dr. Miguel Ángel Cevallos.

MEXICO, D.F.

1985

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE**  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Facultad de Ciencias  
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron el pasante(s) Juan Mauricio Téllez Sosa

con número de cuenta 8522107-7 con el Título: "Aislamiento e identificación de secuencias de ADN de Rhizobium etli que complementan a cepas mutantes cya<sup>-</sup> y crp<sup>-</sup> de Escherichia coli"

Otorgamos nuestro **Voto Aprobatorio** y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de Biólogo

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
Doctor	Miguel Angel	Carlos Cevallos Gaos	
Director de Tesis Biólogo	Carlos Alberto	Castillo Pompeyo	
Doctor	Rene de Jesús	Cárdenas Vázquez	
M.en B.	José Adolfo	Escalante Lozada	
Suplente M.en C.	Víctor Manuel	Valdés López	
Suplente			

Al ser cuya  
existencia es el  
único motivo en mi  
vida: Mi Madre

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo es un pequeño aporte que se une al esfuerzo de cientos de personas que se han obstinado en hacer ciencia desde México.

Debo agradecer a mi tutor Dr. Miguel Angel Carlos Cevallos Gaos el empeño, enseñanza, confianza y paciencia sostenida durante el desarrollo y redacción de este trabajo.

A mis padres Trinidad Téllez Ortega y Socorro Sosa Carbajal, al igual que a mis hermanos Pancho, Chato, Trini, Maribel y Manuel, debo agradecer la confianza, el apoyo, el respeto y el cariño desinteresado que me han demostrado desde siempre, base de mi formación personal.

A todos mis amigos de la facultad de ciencias y muy especialmente a mis complices Nacho, Trompas, Cano, Perrito, y Cabro; debo agradecerles su compañía y fraternalismo infinito.

A mi amiga Itzia le doy gracias por su amistad incondicional.

Debo agradecer y reconocer la importancia que han tenido algunas personas en mi formación profesional y personal. Doy gracias a Samuel Briones, Silvio Briones, Carlos Castillo Pompeyo y Javier Taboada.

A todas las personas que de alguna manera se involucraron en el desarrollo de este trabajo mil gracias.

## RESUMEN

Bacterias del genero *Rhizobium* son capaces de reducir el nitrógeno atmosférico mediante el establecimiento de una relación simbiótica con plantas leguminosas, utilizando para tal fin energía proveniente de fotosintatos de la planta. La fijación del nitrógeno requiere de la formación de estructuras radiculares denominadas nódulos, en las cuales se albergan las formas bacteroidales directamente encargadas de la fijación del nitrógeno. Durante esta compleja interacción el patrón de la expresión génica en ambos organismos sufre cambios drásticos. La naturaleza de las señales involucradas con este proceso diferencial de la expresión génica permanecen no del todo aclaradas. En otras bacterias Gram negativas como *E.coli*, el AMPc y su proteína receptora, CRP; forman parte de un sistema multigénico de Regulación Global. El complejo AMPc-CRP tiene por función regular la transcripción y de esta forma la expresión de un amplio número de operones involucrados con numerosas funciones celulares tales como: el control de la represión catabólica, la regulación de algunas enzimas biosintéticas y de algunas proteínas reguladoras (incluyendo su propia autorregulación), la síntesis de algunos componentes de la membrana celular, la síntesis de flagelo y toxinas, replicación de ciertos plásmidos, lisogénia de bacteriófagos, etc. Por otra parte, aunque sí bien, es cierto que existe mucha información sobre el papel regulador del complejo AMPc-CRP en bacterias entéricas, también es cierto que es poca la información existente sobre el papel del AMPc en otro tipo de bacterias. En algunas especies de *Rhizobium*, el AMPc se ha detectado incluso en el estado de bacteroide, implicándolo en el control de algunas funciones celulares, tales como: represión catabólica, regulación de la asimilación de amonio durante la simbiosis, regulación del metabolismo de hidrógeno, etc. Sin embargo, debido a la falta de cepas deficientes en la síntesis de AMPc, no ha sido posible establecer de forma categórica el papel preciso del AMPc en bacterias Rhizobiaceas. En el presente trabajo se describe el aislamiento e identificación de fragmentos de ADN que contienen los genes que codifican para la adenilato ciclasa y CRP de *R. etli*, por complementación de cepas mutantes de *E. coli* *cya*<sup>-</sup> y *crp*<sup>-</sup> con cósmidos provenientes de un banco genómico de la cepa CE3 de *R. etli*. En el caso de la complementación de la cepa de *E. coli* *crp*<sup>-</sup> se identificaron tres cósmidos que complementan a la cepa mutante; las cepas complementadas con los distintos cósmidos, a diferencia de la cepa *crp*<sup>-</sup>, fueron capaces de utilizar lactosa, maltosa, galactosa, además que fueron sensibles a la fosfomicina y a la serina. Por otra parte, en el caso de la complementación de la cepa *cya*<sup>-</sup> de *E. coli* se clonó un fragmento Hind III de aproximadamente 1.3 Kb, que le confiere a la cepa mutante la capacidad para utilizar lactosa y maltosa como fuentes de carbono.

## INDICE

INTRODUCCION	1
-Regulación global	1
-Red de regulación global AMPc-CRP	2
-Funciones celulares reguladas por el complejo AMPc-CRP	2
Represión catabólica	3
Motilidad	6
División celular	6
Patogénesis	8
Fase estacionaria	8
Anaerobiosis	9
-Complejo AMPc-CRP en bacterias no entéricas	9
-Complejo AMPc-CRP	9
Adenilato ciclasa y el AMPc	9
CRP: Proteína receptora del AMPc	10
-Regulación transcripcional mediada por el complejo AMPc-CRP	12
Activación	12
Represión	15
Familia de reguladores transcripcionales CRP-FNR	16
ANTECEDENTES	17
-Represión Catabólica en <i>Rhizobium</i> spp.	17
-AMPc en <i>Rhizobium</i> spp.	18
-CRP en <i>Rhizobium</i> spp.	20
OBJETIVOS	22
METODO	23
-Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo	23
-Cruza triparental	24
-Preparación de células competentes por cloruro de calcio	24
-Transformación de células competentes	24
-Purificación de plásmidos	25
-Curvas de crecimiento	25
-Experimentos de subclonación	26
RESULTADOS	27
-Identificación de fragmentos de ADN de <i>Rhizobium etli</i> que complementan a cepas <i>cya-</i> y <i>crp-</i> de <i>E. coli</i>	27
Análisis de los patrones de restricción de las clonas de ADN que complementan a la mutante <i>cya-</i> de <i>E. coli</i>	27
Análisis de los patrones de restricción de las clonas de ADN que complementan a la mutante <i>crp-</i> de <i>E. coli</i>	28

-Caracterización de las cepas <i>cya</i> y <i>crp</i> complementantes	29
1) Crecimiento en placas de medio mínimo M9	30
2) Fenotipos en placas de agar MacConkey	30
3) Sensibilidad a fosfomicina	30
4) Sensibilidad a aminoácidos	31
5) Curvas de crecimiento de las cepas mutantes complementadas	31
-Clonación de un fragmento de ADN de <i>R. etli</i> de 1.3 kb que complementa parcialmente una mutante <i>cya</i> de <i>E. coli</i>	34
-Caracterización de la cepa de <i>E. coli cya</i> complementada con el plásmido pH1.3	37
<b>DISCUSION Y CONCLUSIONES</b>	<b>45</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>49</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>50</b>
<b>APENDICES</b>	<b>56</b>



## **INTRODUCCION**

### **REGULACION GLOBAL**

Muchas actividades bacterianas involucran la participación coordinada de gran cantidad de operones, los cuales están organizados en sistemas multigénicos de regulación denominados "Redes Regulatorias". Algunos sistemas de este tipo involucran la inducción coordinada de un grupo de operones controlados por una proteína reguladora común (activador o represor). A este conjunto de operones se les ha dado el nombre de Regulón. Usualmente éstas proteínas reguladoras interactúan directamente con el ADN en secuencias particulares comunes a todos los operones miembros del Regulón para llevar a cabo su función activadora o represora según sea el caso. En otros sistemas la red está definida por un factor sigma alternativo que reprograma la ARN polimerasa para que reconozca únicamente los promotores de los operones miembros de la red. En algunos otros casos se involucra tanto la participación de proteínas reguladoras como de factores sigma. Comúnmente los operones de un Regulón codifican para distintas proteínas cuyas funciones pueden, en un momento dado, estar relacionadas y expresarse coordinadamente bajo circunstancias particulares dadas por cambios en el medio ambiente. Un Regulón puede inducirse por más de un estímulo del medio ambiente y así también, más de un Regulón puede ser inducido por el mismo estímulo. De lo anterior se desprende el concepto de Estimulón, que se aplica al conjunto de genes que se expresan bajo un estímulo dado del ambiente.

En *E. coli* muchos de los operones descritos, hasta el momento, se han ubicado en distintos sistemas multigénicos de regulación, los cuales a su vez pueden ser agrupados en cuatro distintos tipos de "Redes de Regulación Global".

- a) Redes involucradas en la respuesta a la limitación de nutrientes (carbono, nitrógeno, fósforo).
- b) Redes involucradas en reacciones de óxido-reducción y transporte electrónico.
- c) Redes concernientes a la respuesta al daño por oxidación, radiación, temperatura y presión osmótica extrema.
- d) Redes relacionadas con cambios morfofisiológicos celulares tales como: división celular, esporulación, adaptación a la fase estacionaria, etc.

Cabría mencionar que algunos de los operones de *E. coli* se han asignado a más de una red regulatoria y que, en instancias particulares es posible que cada operón sea controlado independientemente del resto de la Red por reguladores específicos.

## **RED DE REGULACION GLOBAL AMPc-CRP**

Entre algunas de las redes involucradas en la limitación de carbono en bacterias entéricas se encuentra una de las redes de regulación global mejor conocidas en la actualidad, la Red AMPc-CRP (Gottesman et al, 1984), cuyos elementos como lo indica su nombre son: el AMPc (Adenosín 3'-5' monofosfato ciclico), el cual funciona como señal metabólica; la proteína CRP (proteína receptora del AMPc), también llamada CAP (proteína activadora del catabolismo), que lleva a cargo la actividad reguladora. Los operones sometidos a este tipo de regulación suelen ser, aunque no siempre, operones involucrados en la utilización de fuentes secundarias de carbono y poseen en su región reguladora una secuencia nucleotídica común para el reconocimiento y unión de CRP. Esta red es en parte responsable del fenómeno conocido como "Represión catabólica", que aunado a otros fenómenos como la "Represión transitoria" y la "Exclusión inducida" conforman el llamado "Efecto glucosa". El "Efecto glucosa" describe la acción inhibitoria que ejerce el metabolismo de la glucosa sobre el catabolismo de fuentes secundarias de carbono. Por medio de este efecto la bacteria asegura la prioridad de la glucosa como fuente principal de carbono y energía. En la "Represión transitoria" se observa una severa inhibición de la síntesis de enzimas catabólicas inducibles, ante la adición de glucosa a un cultivo de bacterias que crece en una fuente de carbono secundaria. En la "Exclusión inducida" la presencia de glucosa impide la entrada de otros substratos inducibles a la bacteria, al inactivar sus permeasas (Magasanik y Neidhardt, 1987). Por otra parte, si bien es cierto que a la Red AMPc-CRP se le describió inicialmente por su importancia en el control de la "Represión catabólica" en bacterias entéricas, es también cierto que el efecto de esta red se amplía no solo al control de este fenómeno, si no que se le involucra con muchos otros fenómenos distintos. De hecho se podría decir que aún en *E. coli* se desconoce el total de operones miembros de la Red (Neidhardt et al., 1990).

## **FUNCIONES CELULARES REGULADAS POR EL COMPLEJO AMPc-CRP**

Son cuantiosos los reportes que involucran al complejo AMPc-CRP en la regulación de diversos procesos celulares independientes del control de la represión catabólica (Tabla I), en enterobacterias y más particularmente en *E. coli*, en donde ésta Red esta más ampliamente estudiada.

Tabla 1: Funciones reguladas por el AMPc en *E. coli* y *S. typhimurium*

Genes	Función	Criterio
<i>ansB</i>	L-Asparaginasa II	B, D, F, G
<i>appR</i>	Fosfatasa ácida	D
<i>cat</i>	Cloramfenicol acetiltransferasa	D
<i>ccd</i>	Deoxicitidina deaminasa	F
<i>cidA</i>	Catabolismo de N-Acetilglucosamina	D
<i>cir</i>	Receptor del Colicina	D
<i>cpdB</i>	Fosfodiesterasa 2',3'-cíclica	A, F
<i>crp</i>	Proteína receptora del AMPc	A, B, C, D, E, F
<i>cup</i>	Toma de Carbohidratos	B
<i>cya</i>	Adenil ciclasa	A, B, C, D, E, F
<i>dnaA</i>	Regula genes involucrados en replicación	E
<i>gltT</i>	Metabolismo de galactosidos	D
<i>fadBC</i>	Utilización de ácidos grasos	B, F, G
<i>fic</i>	Filamentación	D
<i>flaAB</i>	Síntesis de flagelo	D
<i>flaD</i>	Síntesis de flagelo	D
<i>fru</i>	Expresión del regulón de la fructosa	D
<i>fur</i>	Expresión del regulón para la toma de hierro	D, F, G
<i>glpD</i>	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	B, F
<i>glgC</i>	Síntesis de Glucógeno	E, G
<i>ilvA</i>	Expresión de la treonina desaminasa	D, F, G
<i>ihvB</i>	Acetohidroxiácido sintasa I	D
<i>malR</i>	Síntesis del activador de la melibiosa	E, F
<i>pck</i>	Expresión de la PEP Carboxilasa	A, B, G
<i>sdh</i>	Operón de la Succinato deshidrogenasa	F
<i>speC</i>	Omitina decarboxilasa	B, E
<i>tdc</i>	Treonina deshidratasa	B
<i>toxAB</i>	Producción de enterotoxinas	A, B, D, F, G
<i>tra</i>	Genes de transferencia en el plásmido F	C
<i>tsx</i>	Proteína de la membrana exterior	C, D, G
<i>ubiG</i>	Síntesis de la ubiquinona	A, D, G
<i>uxs CA</i>	Metabolismo de galactosidos	D
	Respuesta al "Heat shock"	C
	Promotor P4 del pBR322	A, B
	Número de copias del plásmido P4	B
	Formación del pili	D, F
	Reducción del fosfato	A

Esta tabla es una modificación de la Tabla 1 presentada por Boteford y Harman (1992)

Criterios: A. Función sensible a represión catabólica; B. Función afectada por la adición de AMPc; C. Cuantificación de nucleótidos cíclicos; D. Evidencias genéticas apartir de cepas mutantes *cya*<sup>-</sup> y *crp*<sup>-</sup>; E. Evidencias bioquímicas "in vitro"; F. Sitios de unión consenso para CRP presentes en la secuencia; G. Estudios con fusiones de genes reporteros.

### Represión catabólica

En el termino "Represión catabólica" originalmente propuesto por Magazanik (1961) se presuponia que como producto del metabolismo de la glucosa se producian altos niveles de intermediarios metabólicos, algunos de los cuales podrian causar alguna represión en la síntesis de enzimas catabólicas de fuentes secundarias de carbono en *E. coli*. Actualmente en distintos grupos de bacterias no entericas se han descrito numerosas proteínas no involucradas con el catabolismo

del carbono cuya expresión esta sujeta al fenómeno de la represión catabólica, ejercida no solo por la glucosa como en el caso de enterobacterias, sino también por otras fuentes de carbono en bacterias no entéricas. Algunas de estas proteínas se relacionan con diversos fenómenos como la bioluminiscencia, la fotosíntesis, la esporulación, la motilidad, la biosíntesis de toxinas y la biosíntesis de pigmentos, etc.

Sin duda alguna es en *E. coli* donde el fenómeno de la represión catabólica esta más ampliamente entendido y donde se ha demostrando con claridad la participación del complejo AMPc-CRP. Sin embargo, cabría mencionar que en otras bacterias no entéricas se han propuesto diversos mecanismos para el control de la represión catabólica AMPc-independientes. Esto se ha demostrado ya que los niveles de AMPc en estas bacterias no tienen ninguna relación con el fenómeno de la represión. Al menos siete distintos mecanismos AMPc-independientes se proponen que podrían tener un papel en la regulación de la síntesis de proteínas específicas en respuesta a la disponibilidad de una fuente de carbono en Eubacterias (Tabla 2). Estos mecanismos involucran nuevos reguladores de la transcripción, nuevos factores sigma particulares de ciertos estados metabólicos, y tres distintos sistemas enzimáticos de fosforilación de proteínas (Saler, 1991).

En *E. coli*, la represión catabólica describe la permanente represión de la síntesis de enzimas inducibles aún en la presencia de sus inductores apropiados por efecto del metabolismo de la glucosa. Para activar la síntesis de enzimas que intervienen en el catabolismo de fuentes secundarias de carbono, se requiere de la activación de los promotores pertenecientes a aquellos operones miembros de la red AMPc-CRP, entre los cuales se pueden mencionar a los operones de la lactosa, arabinosa, maltosa, galactosa, etc. En dicha red los operones miembros poseen en la región 5' una secuencia de nucleótidos característica a la cual es necesario que se una el complejo AMPc-CRP para que se active su transcripción (Alba et al., 1982).

La presencia de glucosa en el medio interfiere en la síntesis de AMPc de la siguiente manera (Fig. 1): La síntesis del AMPc se lleva a cabo por la enzima adenilato ciclasa (AC), mientras que la degradación corre a cargo de una fosfodiesterasa. La adenilato ciclasa es una enzima que se encuentra adosada a la membrana, y cuya actividad se modula por una segunda proteína membranar denominada proteína III<sup>Glc</sup>, también conocida como proteína IIA (producto del gen *crr*). Tal proteína es componente del sistema de la fosfotransferasa (PTS) del complejo fosfoenolpiruvato (PEP) y tiene por función el introducir glucosa al interior de la célula.

Tabla 2 : Mecanismos establecidos y postulados que median la represión catabólica en bacterias y levaduras

Mecanismos	Proteínas putativas involucradas en la regulación	Potenciales blancos de regulación	Consecuencias fisiológicas de las interacciones regulatorias	Organismos donde el fenómeno ha sido demostrado
1) PTS: la represión involucra la proteína IIGlc	La proteína IIGlc ; Enzimas I, HPr y IIBC del PTS	Adenil ciclasa, lactosa y maltosa permeasas, glicerol kinasa	Reducción de la concentración del AMPc e inductor	Enterobacterias ( <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> )
2) PTS: la represión involucra fosforilación directa de los sistemas blanco	Enzimas I, II, y HPr del PTS	Glicerol kinasa y lactosa permeasa	Inhibición de la síntesis y toma del inductor	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>
3) Modulación de la disponibilidad del factor sigma	$\sigma^{12}$ , $\sigma^{42}$	Genes involucrados en la respuesta a cierto tipo de estres o privación	Incrementa la expresión de los genes involucrados en la privación	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i>
4) Represión mediada por CcpA	CcpA	Gen <i>amyE</i>	Represión del catabolismo de la glucosa	<i>B. subtilis</i>
5) Proteínas Cinasas median la fosforilación de factores transcripcionales	Proteínas cinasas y fosfatasa	Factores transcripcionales	Modulación de la transcripción de genes catabolicos	<i>S. cerevisiae</i>
6) Proteínas Cinasas median la fosforilación del efector	HPr (ser) cinasas HPr (ser-P) fosfatasa; HPr y la Enzima I de el PTS	Permeasas del gluconato, glucitol, y lactosa	Inhibición de la toma del inductor	<i>B. subtilis</i> <i>Lactobacillus brevis</i>
7) Sistema Spo	Proteínas cinasas sensores, SpoOF, SpoOB, y SpoOA .	Genes apo	Inducción de la cascada de esporulación en respuesta a la privación	<i>B. subtilis</i>
8) Sistema Cre	CreC; CreB	Genes blanco no identificados		<i>E. coli</i>
9) FruR media el control de enzimas centrales del metabolismo de carbohidratos	FruR	Genes que codifican enzimas de la glucólisis, gluconeogénesis, Ciclo de Krebs, y transporte electrónico	Control del metabolismo fermentativo	Enterobacterias ( <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> )

Esta tabla es una modificación de la Tabla 1 presentada por Saier (1991)

Se han propuesto al menos dos teorías para explicar la activación de la AC por la proteína III<sup>Glc</sup>. En el primer caso se propone que durante el transporte de la glucosa la proteína III<sup>Glc</sup>-P cede su grupo fosfato a las moléculas de glucosa entrantes, quedando dicha proteína en un estado desfosforilado en el cual la AC es totalmente inactiva. Esto se debe a que la AC requiere para su funcionamiento ser alostericamente activada por la proteína III<sup>Glc</sup> fosforilada, es decir, como III<sup>Glu</sup>-P (Neidhardt et al., 1990). En el segundo caso se propone que tanto la AC como la glucosa se fosforilan diferencialmente por la proteína III<sup>Glc</sup>. En ausencia de glucosa en el medio, la AC se fosforila y se activa, iniciando así la síntesis del AMPc. Por otra parte, en presencia de glucosa en el medio, la proteína III<sup>Glc</sup> preferencialmente fosforila al azúcar entrante y la AC se desfosforila e inactiva (Saler, 1989). Sin importar cual sea el mecanismo existente en la activación de la AC; la concentración de glucosa en el medio celular interfiere determinadamente en la actividad de la enzima y por ende en los niveles celulares del AMPc. Finalmente cuando la concentración de glucosa en el medio es nula o muy baja; aumenta rápidamente la actividad de la adenilato ciclasa, incrementandose la síntesis y niveles del AMPc celular y la formación del complejo AMPc-CRP. El complejo AMPc-CRP puede entonces activar la síntesis de los operones miembros de la red en la presencia de sus inductores específicos, fuentes secundarias de carbono y energía (Saler, 1989).

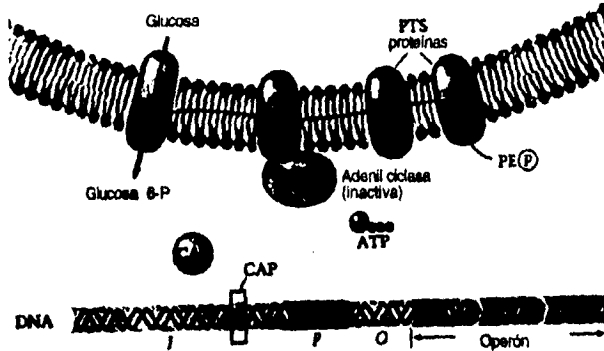
### **Motilidad**

Se ha demostrado, al menos para enterobacterias, que el complejo AMPc-CRP activa la expresión del operón *flaAB* y del gen *flaD* cuyas productos se encargan de la síntesis del flagelo en estas bacterias. Cepas mutantes deficientes tanto en AMPc como CRP son inmóviles ya que no forman flagelos (Kutsukake et al., 1990).

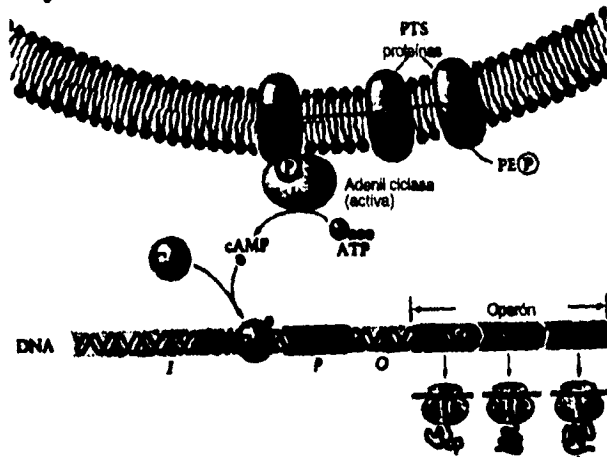
### **División Celular**

Algunos reportes proponen que el AMPc y CRP intervienen en el proceso de la división celular en *E. coli*. Dos genes involucrados en la división celular, *sfA* y *sfC*, requieren del complejo para su expresión al igual que el gen *fts* que codifica para una proteína localizada en la membrana interna involucrada en el proceso de la división celular (Holtje et al., 1984).

(A) Represión en presencia de glucosa



(B) Activación en ausencia de glucosa



**Figura 1:** Modelo propuesto por Saler (1989) que esquematiza como la glucosa, al interferir en la síntesis del AMPc, indirectamente regula la expresión de enzimas catabólicas de fuentes de carbono secundarias (tomado de Neidhardt et al., 1990).

(A) En presencia de glucosa, la adenil ciclasa se encuentra inactiva, no se sintetiza AMPc y por lo tanto no hay formación de complejos AMPc-CRP; lo que impide la activación de los operones blanco.

(B) En ausencia de glucosa, la adenil ciclasa sintetiza AMPc, se forman complejos AMPc-CRP que se unen en secuencias específicas en el ADN, para activar la transcripción de los operones blanco.

## **Patogénesis**

En *S. typhimurium* mediante mutagénesis con Tn10 se realizaron inserciones en los genes *cya* y *crp*, ambas cepas mutantes crecieron más lentamente que la cepa silvestre y fueron completamente avirulentas para células intestinales de ratón en cultivo. Esto indica que el complejo AMPc-CRP es necesario para el desarrollo de la virulencia en estas bacterias (Curtiss y Kelly, 1987).

## **Fase Estacionaria**

Muchas bacterias han desarrollado sofisticados mecanismos de sobrevivencia a condiciones del ambiente adversas como lo es la limitación de algún nutriente esencial para su desarrollo. Algunas especies forman esporas, otras forman agregados y cuerpos fructíferos, mientras que organismos como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, y muchas otras bacterias Gram negativas entran en un estado metabólicamente poco activo y muy resistente a distintas condiciones de estrés cuando entran a la fase estacionaria (Siegele y Kolter, 1992). Las bacterias en fase estacionaria presentan cambios morfofisiológicos relacionados con cambios en el patrón de la expresión génica. En *E. coli* la limitación de un determinado nutriente induce una respuesta específica. Los sistemas de regulación involucrados (AMPc/CRP para carbono, NtrB/NtrC/ $\sigma^{54}$  para nitrógeno, y PhoR/PhoB para fósforo), controlan la síntesis de una gran cantidad de proteínas específicas para cada tipo de deprivación (Hengge-Aronis, 1993). Durante la deprivación de carbono se induce la síntesis de treinta proteínas con distintos patrones temporales de expresión, algunas de las cuales han mostrado ser de importancia para la sobrevivencia de la bacteria. Veinte de estas treinta proteínas están bajo el control transcripcional del complejo AMPc-CRP. Los genes que codifican a estas proteínas se han llamado genes *cst*. Se piensa que están relacionados con la preparación de la bacteria para escaparse de la deprivación, puesto que muchos de estos genes codifican para proteínas catabólicas y transportadoras de sustratos de carbono. Así de encontrarse en el medio alguna fuente de carbono sería rápidamente metabolizada. Las otras diez proteínas se inducen no solo bajo la deprivación de carbono, sino también cuando el limitante es el nitrógeno o el fósforo. Al grupo de genes que codifican para estas proteínas se les llamo genes *pex* (Shultz et al., 1988). Se cree que la función de los genes *pex* esta asociada con la resistencia, ya que se sabe que algunos de estos genes también se expresan bajo condiciones de estrés osmótico, oxidativo, y "heat shock" (Matin, 1991).



## **Anaerobiosis**

Más de 50 proteínas se expresan cuando *E. coli* crece en condiciones anaeróbicas algunas de ellas están relacionadas con la respiración anaeróbica y las otras son específicas del metabolismo fermentativo. Se ha demostrado la participación del AMPc y CRP en el control de la expresión de algunas de estas proteínas, por ejemplo; la enzima L-asparaginasa II dependiente de FNR, también depende de AMPc y CRP, puesto que mutantes en *cya* o en *crp* tienen una expresión alterada de esta enzima (Russell y Yamazaki, 1978).

### **COMPLEJO AMPc-CRP EN BACTERIAS NO ENTERICAS**

En 1985 Biville y Guiso presentan evidencias de la presencia de AMPc en doce diferentes bacterias gram negativas, algunas de las cuales no son entéricas, reporta que la regulación de la concentración del AMPc como una función de las condiciones del crecimiento, son similares a las descritas para *E. coli*. También, mediante el empleo de ensayos radioinmunológicos, describe la posible presencia de CRP en algunas de las bacterias empleadas en su estudio. Por otra parte, pese a los numerosos reportes en que se ha demostrado la participación del AMPc en la regulación de diversos procesos celulares en bacterias no entéricas, aun no se ha logrado establecer categóricamente si es que el AMPc actúa en combinación con CRP en la regulación de la transcripción en todos los casos reportados. Interesantemente en bacterias no entéricas como *Haemophilus influenzae* y *Vibrio fischeri*, al complejo AMPc-CRP, más que relacionarlo con el fenómeno de la represión catabólica se ha acreditado su participación en la regulación del desarrollo de la competencia y de la luminiscencia, respectivamente (Chandler, 1992; Dunlap, 1989). Lo anterior hace suponer que el complejo AMPc-CRP es un factor transcripcional ampliamente distribuido entre las bacterias, y cuya participación en la regulación de distintos procesos celulares puede ser muy diversa entre diferentes bacterias.

### **COMPLEJO AMPc-CRP**

#### **Adenilato Ciclasa y el AMPc**

El AMPc es una molécula reguladora ampliamente distribuida entre una enorme variedad de procariontes y eucariontes. Se le involucra en el control transcripcional de ciertos genes en bacterias y como un segundo mensajero en algunos procesos regulados hormonalmente en células animales. La enzima adenilato ciclasa sintetiza el adenosín 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) en una reacción que utiliza ATP como sustrato. Esta reacción introduce un enlace

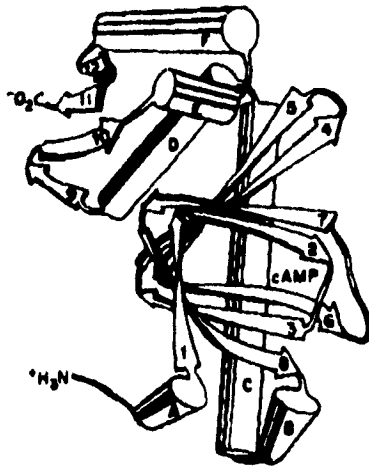
fosfodiéster entre los dos extremos 3' y 5' del azúcar del nucleótido. La degradación del AMPc corre a cargo de una fosfodiésterasa, que rompe el enlace fosfodiéster para producir AMP. En la célula bacteriana los niveles del AMPc están regulados por la actividad de ambas enzimas y por su excreción al medio. Algunos autores suponen que la síntesis, aun más que la degradación, es el factor determinante en la concentración intracelular del AMPc (Neidhardt et al., 1990). Aiba y colaboradores (1983) logran clonar y secuenciar al gen *cya* que codifica para la adenilato ciclasa en *E. coli*, actualmente se cuenta con las secuencias homologas de distintas bacterias.

### **CRP : Proteína Receptora del AMPc**

La proteína CRP, también conocida como CAP e incluso como CGA (activador de genes catabólicos), fue descubierta hace más de 20 años (Emmer et al., 1970; Zubay et al., 1970; Anderson et al., 1971), pero no es hasta los 80's en que es posible clonar y secuenciar a *crp*, el gen codificador en *E. coli* (Aiba et al., 1982). La cristalografía de rayos X identificó a CRP como una proteína homodimérica constituida por subunidades de 209 aminoácidos, con un peso aproximado de 23,619 D. (McKay et al., 1982; Weber y Steiz, 1987).

Cada subunidad posee dos dominios (Fig. 2): El dominio amino terminal, al cual se le une una molécula de AMPc en el interior de una estructura "β-roll" (McKay et al. 1982; Weber y Steiz, 1987) y el dominio carboxilo terminal, en el que se encuentran los motivos hélice vuelta hélice que interaccionan específicamente con el ADN (Steiz et al., 1982; Schultz et al., 1991). En el dominio amino terminal, constituido por los residuos 1 al 135, se ubican las α hélices A, B, C y 8 hojas β plegadas en las que se encuentra los sitios de unión al AMPc. El dominio carboxilo terminal incluye los residuos 136 a 209 y se constituye principalmente de las α hélices D, E, F y 4 hojas β-plegada (McKay et al., 1982).

Los contactos intersubunidad en el dímero se realizan por los dominios amino entre las estructuras α hélice C de cada subunidad, concomitantemente existen contactos entre las hojas β5, β6, β7 de una subunidad y la α hélice C de la otra (McKay et al., 1982)



**Figura 2:** Representación esquemática del monómero CRP que muestra los dominios amino y carboxilo terminal (tomado de McKay et al., 1992).

Cada dímero interactúa con dos moléculas de AMPc. El AMPc se une a cada subunidad de CRP estableciendo contactos con la estructura "β-roll" y la α hélice C del dominio amino terminal, en forma tal que cada molécula puede interactuar distintamente con ambas subunidades del dímero. Las principales interacciones son puentes de hidrógeno entre: el grupo fosfato del AMPc con la Arg-82 y la Ser-83. La ribosa se une a la Ala-84 y Glu-72. Mientras que el anillo de la Adenina contacta a las α hélices C de las dos subunidades; específicamente en el residuo Thr-127 de la subunidad a la cual el AMPc está unido y al residuo Ser-128 de la subunidad opuesta (McKay et al., 1982).

La unión de las moléculas de AMPc al dímero se acompaña por cambios estructurales que alteran la orientación relativa de las dos subunidades. Logrando entonces que el complejo se una a secuencias específicas en el ADN (Kypř y Mrazek, 1985). Actualmente se sabe que la unión de una molécula de AMPc al dímero es suficiente para aumentar la afinidad de CRP por secuencias específicas en el ADN (Fried y Crothers, 1984; Heiduk y Lec, 1989).

La estructura tridimensional del complejo AMPc-CRP es asimétrica según estudios de cristalografía de rayos X. La orientación de los dominios de unión al ADN en relación con los dominios de unión al AMPc difieren en las dos subunidades. En una, llamada subunidad "cerrada", existen contactos extensivos

entre ambos dominios; mientras que en la otra, subunidad "abierta", se presenta una aparente separación entre los dos dominios y son pocos los contactos existentes (McKay y Steiz, 1987).

La proteína CRP se une al ADN por sus dominios carboxilo terminal mediante interacciones entre los motivos hélice vuelta hélice de cada subunidad ( $\alpha$  hélices F y E) y dos secuencias simétricas del ADN en dos surcos mayores consecutivos. Los operones dependientes de CRP presentan regiones específicas de unión a diferentes distancias "upstream" del inicio de transcripción, que varía entre -40 y -200. La inspección de 26 sitios de unión conocidos muestran una secuencia consenso palindrómica de 22 pb (AAATGTGATCT\*AGATCACATT) en la cual el motivo TGTGA está altamente conservado entre todos los sitios examinados (Berg y vonHippel, 1988).

### **REGULACION TRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR EL COMPLEJO AMPc-CRP**

Como se ha mencionado anteriormente CRP unido a AMPc actúa en *E. coli* como un activador de la transcripción de enzimas catabólicas inducibles, entre otras funciones celulares que incluyen: la expresión de algunas enzimas biosintéticas y proteínas reguladoras (incluyendo su propia autoregulación); síntesis de algunos componentes de la membrana celular; replicación de ciertos plásmidos y lisogénia de bacteriófagos. Por lo general cada una de estos procesos se regula a nivel de transcripción. Ningún papel del complejo AMPc-CRP se ha reportado fuera del dominio de la transcripción al menos en *E. coli* (Adhya y Gargos, 1982).

Cabe mencionar que existen reportes en que se acredita al AMPc papeles independientes de CRP. Se reporta que para que *E. coli* continúe creciendo en condiciones de anaerobiosis en un medio con glucosa, requiere de AMPc pero no de CRP. Se observó que mutantes defectivas en la síntesis de AMPc, detienen su crecimiento bajo estas condiciones mientras que mutantes defectivas en CRP continúan creciendo (Uden y Guest 1984). Por otra parte, se reporta en *E. coli* que el AMPc se une a la proteína DnaA para colaborar con esta en su unión al ADN en el origen de replicación (*oriC*) (Hughes et al., 1986).

#### **Activación**

El complejo AMPc-CRP activa la transcripción de algunos promotores y reprime la de otros. Los mecanismos en ambos casos son muy distintos, aunque generalmente, tanto en la activación como en la represión el nivel de regulación esta dada al inicio de la transcripción.

La activación transcripcional mediada por el complejo AMPc-CRP puede realizarse por mecanismos directos e indirectos. El AMPc y CRP participan directamente en la activación transcripcional de aquellos operones que presentan en su región reguladora sitios de unión a CRP cercanos al inicio de transcripción. Ejemplo de lo anterior son los promotores *galP1*, *lacP1*, y *malT1*, en donde el sitio de unión de CRP se sitúa a -41, -65, y -70, respectivamente. Los tres sitios están separados del sitio de unión de la polimerasa por un número íntegro de giros helicoidales del ADN. Lo que sugiere que CRP debe encontrarse en una posición estereoespecífica con respecto de la ARN polimerasa, quizás debido a que existen contactos CRP-ARN polimerasa similares en los tres casos, que son requeridos para la activación (Collado-Vides et al., 1991). En estos casos la participación del complejo AMPc-CRP es suficiente para activar la transcripción por la ARN polimerasa. En aquellos promotores que presentan el sitio de unión de CRP a mayor distancia "upstream" del inicio de transcripción; la activación depende, por lo general, de la participación de CRP y un segundo regulador, tal es el caso de los promotores de *araB*, *malE*, *papI*. En estos casos la participación de CRP puede considerarse como indirecta (Kolb et al., 1993).

Crothers y Steltz (1992) proponen un modelo para el mecanismo de activación directa de los promotores de *galP1* y *lacP1* en base a algunas evidencias como: El doblamiento entre 90° y 130°, dependiente de la secuencia de unión de CRP, que sufre el ADN debido a su interacción con el complejo AMPc-CRP (Dripps y Wartell 1987). La existencia de interacciones proteína-proteína entre CRP y ARN polimerasa (Pinkney y Hoggett, 1988). Y finalmente el doblamiento del ADN ligeramente mayor de 180° observado en complejos CRP-ARN polimerasa-ADN (Zinkel y Crothers, 1991). Tal modelo propone que: Inicialmente la ARN polimerasa localiza un complejo CRP-ADN e interactúa con éste para formar un complejo cerrado. Para lo cual se requiere que la polimerasa interactúe con el ADN "downstream" del sitio de unión de CRP, probablemente en la región -10, y que posteriormente establezca contactos con CRP. Ambas interacciones contribuyen a que en la región "upstream" del sitio de unión de CRP se forme un "loop". El establecimiento de esta estructura intermediaria es esencial para la formación del complejo abierto. La transición de el complejo cerrado al complejo abierto es presumiblemente asistida por interacciones entre la polimerasa y CRP. En el complejo abierto se observa que el "loop" anteriormente formado se curva de forma tal que atrapa en su interior a CRP y a la polimerasa. Finalmente la energía almacenada en el doblamiento aunado a la tendencia del ADN por extenderse, colaboran a desestabilizar los contactos CRP-ADN y CRP-polimerasa.

contribuyendo de esta manera a que la polimerasa logre escaparse del promotor.

Crothers y Steitz concluyen que CRP activa la transcripción alterando uno o más parámetros del inicio de transcripción: Por ejemplo, al participar en la captura de la polimerasa, favorece la formación del complejo cerrado. Posteriormente en la formación del complejo abierto, CRP acelera la isomerización del complejo cerrado al complejo abierto. Finalmente al estimular la tasa de escape de la polimerasa, da paso a la formación de un complejo de inicio estable que se acompaña de la pérdida de la subunidad sigma. Para algunos autores CRP activa los distintos promotores diferencialmente, es decir, en ciertos casos CRP altera preferentemente algunos parámetros del inicio de transcripción que otros, dependiendo de la arquitectura global de la región promotora y de la distancia entre su sitio de unión al ADN y el inicio de transcripción del gen. De esta forma se propone, por ejemplo, que CRP colabora en la captura de la polimerasa, favoreciendo la formación del complejo cerrado en aquellos promotores que presentan su sitio de unión centrado en -41 ó -65, más que en aquellos casos en que CRP se une en -70 (Kolb et al., 1993).

En la activación indirecta el complejo AMPc-CRP coopera con otras proteínas reguladoras en la activación de la expresión de ciertos genes. Un ejemplo de este tipo de activación se presenta en la expresión del regulón *mal* en *E. coli*. El regulón incluye al menos 5 operones (*malS*, *malZ*, *malPQ*, *malEFG*, *malK* *LamB* *malM*), los cuales codifican proteínas requeridas para la utilización de maltosa y maltodextrinas como fuentes de carbono. El transporte de maltosa involucra al menos cinco proteínas, MalF, MalG, MalE, MalK, y LamB. El catabolismo de estos sustratos requiere dos enzimas específicas, la amilomaltasa y la maltodextrina fosforilasa, codificadas por los genes *malQ* y *malP*, respectivamente (Schawartz, 1987). La inducción que ejerce la maltosa sobre la transcripción de los distintos operones es mediada por la proteína activadora MalT. El gen *malT*, así como algunos otros miembros del regulón, dependen también de la activación mediada por el complejo CRP-AMPc. Cepas mutantes en los genes *cya*, *crp* y *malT*, son incapaces de crecer en maltosa, lo que indica que la expresión del regulón se controla a nivel transcripcional por los dos activadores. La activación de los promotores que pertenecen a los operones *malE* y *malK* dependen de CRP y MalT. Los promotores de *malE* y *malK* son divergentes, estos se encuentran separados por una región intergénica de 271 pb, en la que se encuentran 5 sitios de unión a MalT y tres sitios de unión a CRP, estos últimos localizados entre los sitios 2 y 3 de unión a MalT. Los sitios 1 y 2 de unión de MalT están cercanos al promotor de *malE*, mientras que los sitios 3, 4, y 5 se acercan al promotor de *malK*. Posterior al descubrimiento de los sitios 3, 4, y 5, se encontraron tres sitios más (de menor

afinidad), que se sobrelapaban con los anteriores, a los que llamaron 3', 4', y 5'. La presencia del complejo AMPc-CRP, ocupando los tres sitios correspondientes, tiene dos efectos. Incrementa la unión de MalT a los sitios 1 y 2 cercanos al promotor de *malE*, y logra desplazar las tres proteínas MalT, que originalmente se encuentran unidas en los sitios 3, 4, y 5, ubicandolas en los sitios 3', 4', y 5', desde donde son capaces de activar el promotor del gen *malK*. En este caso el papel de CRP es la reubicación de MalT de un sitio inactivo a un sitio activo (Richet et al., 1991).

### **Represión**

Los mecanismos de represión transcripcional mediados por el complejo AMPc-CRP pueden ser considerados de dos tipos: directos e indirectos. La represión directa ocurre cuando los sitios de unión del complejo AMPc-CRP se sobrelapan con los sitios de unión de la ARN polimerasa, interfiriendo de esta forma con la unión de la polimerasa en la región promotora del operón en cuestión; ejemplos de este tipo de represión es el que se presenta en la expresión del gen *cya* y del operón *gal*. La región reguladora del gen *cya* de *E. coli* posee tres promotores putativos, de los cuales el promotor encargado de la expresión del gen (*cyaP2*) presenta en la región operadora una secuencia de unión para el complejo AMPc-CRP. Estudios de footprinting demostraron que el complejo se une en la región operadora del promotor cubriendo el ADN entre las posiciones -20 y +11, lo que impide que la polimerasa logre hacer contacto con la región promotora (Roy et al., 1988). La expresión del operón *gal* de *E. coli* depende de dos promotores, ambos sujetos al control del complejo AMPc-CRP; mientras que el promotor 1 (*galP1*) se activa, el promotor 2 (*galP2*) se reprime. El sitio de unión del complejo AMPc-CRP en la región reguladora del operón *gal* se sobrelapa con el *galP2* bloqueando de esta manera el acceso de la polimerasa a la región -35 de este promotor (Musso et al., 1977).

La represión indirecta puede realizarse por distintos mecanismos, uno de ellos se presenta en la regulación del gen *crp* en *E. coli*. La expresión de *crp* se autoregula por el complejo AMPc-CRP. La región reguladora del gen posee dos promotores divergentes y un sitio de unión para CRP en la posición +42 en relación con el inicio de transcripción del ARNm de *crp*; el complejo AMPc-CRP al unirse a este sitio activa el promotor divergente, en la cadena opuesta del gen *crp*, generando la síntesis de un ARNm antisentido. Aparentemente existe una competencia entre los dos promotores por la unión de la ARN polimerasa, que ante la presencia de AMPc y CRP, se favorece la unión de la polimerasa en el promotor divergente en la cadena contraria al gen *crp* (Hanamura y Aiba, 1991).

Otro ejemplo de represión efectuada por el AMPc y CRP se presenta en la expresión de ciertos genes, involucrados con el catabolismo de nucleósidos, cuyos promotores se regulan negativamente por CytR. Todos los promotores dependientes de CytR presentan sitios de unión a CRP localizados a 40 pb "upstream" del inicio de transcripción. La transcripción de estos genes se reprime cooperativamente por la unión de CRP y CytR en secuencias cercanas a la región promotora. La unión de CRP favorece mediante interacciones proteína-proteína, que el represor directo CytR se una en la región operadora del gen reprimiendo su transcripción (Sogaard-Andersen et al., 1991).

### **Familia de Reguladores Transcripcionales CRP-FNR**

El análisis de las secuencias de distintas proteínas reguladoras demostró que existen ciertas características comunes entre distintos reguladores transcripcionales, lo cual propició la formación de familias de proteínas reguladoras. La familia CRP-FNR es un grupo de proteínas reguladoras cuyas principales características estructurales comunes son: la presencia de al menos cinco residuos de glicina en el dominio amino terminal, y el motivo hélice-vuelta-hélice presente en el dominio carboxilo terminal de todas las proteínas miembros de la familia. Funcionalmente a muchas de estas proteínas se les han propuesto actividades regulatorias, tanto de activación como de represión transcripcional. Los miembros de esta familia se han dividido en tres clases basándose en la similitud de su secuencia de aminoácidos y en semejanzas funcionales. La clase I incluye a FNR de *E. coli* y once proteínas cuya similitud con FNR varía del 24 % al 74 % en su secuencia de aminoácidos. Funcionalmente todas estas proteínas tienen en común su participación en la regulación de diversos procesos celulares bajo condiciones anaeróbicas. En la clase II se encuentra el CRP de *E. coli* y las proteínas "CRP-like" de otras bacterias Gram negativas, no todas ellas entéricas como *Haemophilus influenzae* y *Xantomonas campestris*. En estos dos últimos casos dichas proteínas se relacionan con el desarrollo de la competencia y la regulación de la fitopatogénesis, respectivamente, más que con la regulación de los genes catabólicos como sucede en enterobacterias. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas CRP de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, y *Klebsiella aerogenes* están extremadamente conservadas, mientras que el CRP de *H. influenzae* y el CLP de *X. campestris* muestran un menor grado de homología al CRP de *E. coli* (76 % y 44 % de semejanza en la secuencia de aminoácidos, respectivamente). Finalmente en la clase III se incluye a un grupo de proteínas de cianobacterias que se involucran con el control del metabolismo del nitrógeno y azufre (Fischer, 1994).



## ANTECEDENTES

Las bacterias del genero *Rhizobium* reducen el nitrógeno atmosférico mediante asociaciones simbióticas con plantas leguminosas. El proceso de la fijación de nitrógeno requiere de la formación de estructuras radiculares denominadas nódulos, en las cuales se albergan las formas bacteroidales directamente encargadas de la fijación del nitrógeno. Durante esta compleja interacción el patrón de la expresión génica en ambos organismos sufre cambios drásticos. La naturaleza de las señales involucradas en este proceso diferencial de la expresión génica no estan del todo aclaradas. En otras bacterias Gram negativas se conoce el papel del complejo formado por AMPc y CRP en la regulación de diversos procesos celulares. En algunas especies de *Rhizobium*, el AMPc se ha detectado, incluso en el estado de bacteroide (Cateneze et al., 1989), implicandolo en en el control de algunas funciones celulares tales como: la represión catabólica, regulación de la asimilación de amonio durante la simbiosis, regulación del metabolismo de hidrogeno

### **Represión Catabólica en *Rhizobium* spp.**

En vida libre las distintas especies de *Rhizobium* se encuentran confrontadas con una enorme variedad de fuentes de carbono. La cantidad y calidad de las mismas puede ser en un momento dado un factor limitante para el crecimiento. Dada la disponibilidad de más de una fuente de carbono en el suelo, el control de la represión catabólica en estas bacterias es de gran importancia. Fenómenos similares al de la represión catabólica descrito para *E. coli*, se han observado en varias especies de *Rhizobium* en vida libre; con la diferencia de que en la mayoría de los casos reportados son los ácidos dicarboxílicos como el succinato, más que la glucosa, los encargados de ejercer el efecto represor. Ucker y Singer (1978) reporta, por primera vez para una especie de *Rhizobium*, la existencia de un fenómeno similar a la represión catabólica. El demuestra que el succinato, la mejor fuente de carbono para *R. meliloti*, causa una inmediata reducción en la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa cuando se adiciona a células crecidas en lactosa. Arias (1982) reporta que ácidos dicarboxílicos, como el succinato y malato, ejercen represión sobre el catabolismo de la manosa en *R. meliloti*. Reportes de Rohm y colaboradores (1985) demuestran, que el succinato reprime la respiración de fenol de células en vida libre y bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum*. Stowers y Elkan (1985) describen que el succinato regula los niveles de distintas enzimas catabólicas de hexosas pertenecientes a las rutas metabólicas de ED (Entner-Doudoroff) y EMP (Embden-

Meyerhof-Parnas) en *B. japonicum*. Las enzimas encargadas de la utilización del formato (formato deshidrogenasa y RuBP carboxilasa) en *B. japonicum* están también sujetas a represión catabólica por dicarboxílicos según reportes de Simpson (1979) y Manian (1982). En las investigaciones realizadas por McGetrick (1985 A) se plantea que distintas fuentes de carbono, entre ellas intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, ejercen represión sobre la fijación del CO<sub>2</sub>, al reducir la actividad de la enzima RuBP carboxilasa en *R. meliloti*. Mandal (1993) reporta que las enzimas de las rutas ED y EMP encargadas del metabolismo de hexosas en *Rhizobium sp.*, que infecta a *Cicer arietum*, son inducibles por la glucosa, y están sujetas a represión catabólica por el succinato. Finalmente habría mencionar que, aunque se ha intentado en algunos de los reportes anteriormente expuestos, en ninguno de estos casos se ha logrado comprobar la participación del AMPc en el control de los fenómenos descritos.

#### **AMPc en *Rhizobium* spp.**

Al descubrir el papel del AMPc en la regulación de numerosos fenómenos, primeramente en *E. coli* y después en algunas otras enterobacterias, sin duda alguna se propició la búsqueda del nucleótido en muchas otras bacterias. En algunas especies de *Rhizobium* existen evidencias que involucran a el AMPc en la regulación de diversos fenómenos. Por ejemplo, durante la simbiosis los bacteroides activan la síntesis de la nitrogenasa, al tiempo que reprimen la síntesis de enzimas encargadas de la asimilación de amonio. Upchurch y Elkan (1978) describen el papel del AMPc en la regulación de la asimilación de amonio en *B. japonicum*, reporta que la adición de AMPc a un medio de cultivo adicionado con NH<sub>4</sub>Cl, reprime la expresión de las tres enzimas involucradas con la asimilación de amonio (glutamino sintetasa, glutamato sintasa y glutamato deshidrogenasa), los niveles de las tres enzimas disminuyeron hasta cinco veces por la adición de 1 mM de AMPc. De lo anterior se desprende que el AMPc posiblemente toma parte en la regulación de la simbiosis al participar en la regulación de la síntesis de las enzimas involucradas en la asimilación de amonio. Por otra parte se ha reportado que en bacteroides de *B. japonicum*, la adenilato ciclasa y la fosfodiesterasa presentan patrones de actividad totalmente distintos, es decir, al cuantificar la actividad de ambas enzimas en el bacteroide, se encontró que la actividad de la fosfodiesterasa disminuye conforme el nódulo se desarrolla, a la vez que se incrementa la actividad de la adenilato ciclasa. Lo anterior apoya que el AMPc tiene un papel durante la simbiosis (Catenese et al, 1989). Lim y Shanmugam (1979) reportan que en *B. japonicum*, intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, como el malato o el succinato, reducen la utilización de H<sub>2</sub>. También observa que

cuando agrega AMPc a células creciendo en medios de cultivo con malato como única fuente de carbono, la inhibición ejercida por el malato sobre la toma de H<sub>2</sub> se supera. Con lo cual concluye que posiblemente el AMPc tiene algún papel en la regulación del metabolismo del H<sub>2</sub>. En el mismo reporte también se demuestra que las pozas del AMPc intracelular varían dependiendo de la fuente de carbono disponible, de forma similar a como ocurre en *E. coli*. Los niveles del nucleótido fueron bajos cuando las células se crecieron en malato, pero altos cuando se crecían en presencia de glutamato. Posteriormente MacGetrick (1985 A) demuestra que se logra aliviar el efecto represor del malato sobre la toma de H<sub>2</sub> incrementando la dosis génica. Esto se logra introduciendo una copia del gen *cya* de *R. meliloti* en su cepa de *B. japonicum*. Cuando se crece en acetato a *Rhizobium* sp., que infecta a *Cicer arietum*, la adición de succinato causa represión sobre la actividad de la isocitrato liasa, enzima de la ruta del glioxilato. La adición de AMPc exógeno substancialmente alivia la represión ejercida por el succinato (Mandal y Chakrabarty, 1992).

Los genes que codifican para la adenilato ciclasa de *R. meliloti* (Kiely, 1983) y *B. japonicum* (Guerinot y Chelm, 1984) se han clonado en ambos casos mediante experimentos de complementación de cepas mutantes de *E. coli* deficientes en la producción de AMPc. La secuencia del gen *cya* de *R. meliloti* no muestra un alto grado de similitud con su gen homólogo en *E. coli*. La adenilato ciclasa de *R. meliloti* es una proteína de 193 aminoácidos de un peso aprox. de 25 KD significativamente más pequeña que la correspondiente en *E. coli*, la cual es de 848 aminoácidos y tiene un peso aprox. de 95 KD (Roy y Danchin, 1982). Por otra parte mediante experimentos de hibridación de ADN se comprobó que el gen que codifica para la adenilato ciclasa en *B. japonicum* no muestra similitud con el gen *cya* de *E. coli*. Alineamientos de las secuencias codificadoras de distintas adenilato ciclasas demostraron, sorprendentemente, que la enzima de *R. meliloti* es más parecida a las adenil y guanocil ciclasas de eucariontes, que a las de bacterias como *E. coli* (Peterkofsky et al., 1993). La clonación de los genes *cya* de *R. meliloti* y de *B. japonicum* favoreció la construcción de cepas mutantes *cya*<sup>-</sup> en estas bacterias. Las mutantes, para el caso de *R. meliloti*, se obtuvieron mediante la generación de inserciones del Tn5 en la región codificadora del gen clonado en *E. coli*, para posteriormente homogenotizar las construcciones obtenidas en una cepa silvestre. Las mutantes así obtenidas reducen la producción de AMPc, pero no la abaten totalmente (Boesten et al., 1988). Una situación similar se presentó en el caso de las mutantes *cya*<sup>-</sup> de *B. japonicum*. (Guerinot y Chelm, 1985). Lo anterior indica

que estos organismos poseen mecanismos alternativos para la producción de AMPc, es decir, que posiblemente poseen más de una copia del gen *cya*. (O'Regan et al., 1989). Por otra parte se desconocen los mecanismos que regulan la actividad de la adenil ciclasa en las Rhizobaceas. Se ha descrito que aparentemente carecen del sistema de fosfotransferasa (PTS), componente necesario en la regulación de la actividad de la adenil ciclasa en enterobacterias. Incluso dado el reducido tamaño de la enzima de *R. meliloti*, se propone la posibilidad de que carezcan de un dominio para la regulación por PTS (Peterkofsky et al., 1993).

#### **CRP en *Rhizobium* spp.**

Las evidencias que suponen la existencia de CRP en *Rhizobium* son indirectas. McGetrick (1985 B) demuestra que el operón de la lactosa de origen entérico presente en el transposon TN951, cuya expresión depende de el complejo AMPc-CRP; puede expresarse tanto en *R. meliloti* como en *B. japonicum*. La expresión del TN951 se ensayó cuantificando los niveles de  $\beta$ -galactosidasa, en cepas crecidas en presencia de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-thiogalactopiranosido, inductor del operón). Tanto para *R. meliloti* como para *B. japonicum* se cuantificó actividad de  $\beta$ -galactosidasa, lo que indica que hubo expresión del operón de la lactosa.

Wang et al. (1993) presentan evidencias que establecen que el complejo AMPc-CRP reprime la expresión del gen *dctA* de *R. meliloti*, en un sistema reconstituido en *E. coli*. DctA es el transportador de ácidos tricarbóxicos y forma parte del operón Dct junto con los genes B y D. En este experimento se monitorea la transcripción del gen *dctA* mediante una fusión con *lacZ*. Se observa que la expresión de *dctA* se induce en la presencia de succinato (como en *Rhizobium*), pero también ante glucosa y maltosa. La expresión del promotor de *dctA* en presencia de glucosa fue considerablemente mayor que cuando se empleaba maltosa como fuente de carbono, lo que indica que la expresión diferencial observada es dependiente de la fuente de carbono empleada y que posiblemente el complejo AMPc-CRP juega un papel en la regulación de la expresión del promotor de *dctA*. Para demostrar esta hipótesis, monitorean la expresión de *dctA* en un par cepas mutantes de *E. coli*, *cya<sup>-</sup>* y una doble mutante *cya<sup>-</sup> crp<sup>-</sup>*. En ambas cepas mutantes la expresión fue elevada en comparación con la cepa silvestre, sin embargo, para la cepa *cya<sup>-</sup>* tal expresión decreció ante la adición de AMPc exógeno. Estos resultados demuestran que el complejo AMPc-CRP tiene un efecto represor sobre la expresión del promotor de *dctA* y que este efecto es dependiente del nivel de AMPc presente. Posteriormente demuestran *in vitro*, mediante ensayos de retardamiento de la movilización de ADN

en un corrimiento electroforético que el complejo AMPc-CRP se une directamente a la región promotora del gen *dctA*. Finalmente analizando la secuencia del promotor concluyen que los sitios probables de unión de CRP, son precisamente dos sitios confirmados de unión de DctD (el activador del operón).

## OBJETIVOS

Pese a que en distintas especies de *Rhizobium* el AMPc ha sido detectado e incluso implicado en diversas funciones celulares tanto en vida libre como en simbiosis, no ha sido posible discernir en forma precisa cual es el papel del nucleótido en estas bacterias. Por otra parte, el AMPc es una importante molécula que participa conjuntamente con CRP en la regulación transcripcional de numerosos genes involucrados en distintos procesos celulares en *E. coli* y otras bacterias Gram negativas. En este sentido es posible que el AMPc y CRP participen en el control de la expresión génica en *Rhizobium*, tanto en vida libre como en simbiosis.

Para discernir el papel del AMPc y de su proteína receptora en *Rhizobium*, es necesario la obtención de cepas mutantes de *Rhizobium* deficientes tanto en la proteína adenilato ciclasa, encargada de la síntesis de AMPc, como en CRP. El objetivo del presente trabajo es la clonación de los genes que codifican para la enzima adenilato ciclasa (gen *cya*) y para la proteína CRP (gen *crp*) en *Rhizobium etli*. La estrategia planeada para la clonación de ambos genes consiste en la complementación de cepas mutantes de *E. coli*, *cya*<sup>-</sup> y *crp*<sup>-</sup>, con fragmentos de ADN procedentes de un banco genómico de *R. etli* cepa CE-3.

## METODO

### Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo

Para la realización de este trabajo se utilizaron las cepas y los plásmidos que se muestran en la tabla #3. Los medios de cultivo empleados fueron LB (Ap.1); medio mínimo M9 suplementado con la fuente de carbono apropiada al 0.2% (w/v) y tiamina (10 mg/ml) (Ap.2); medio mínimo M9 adicionado con peptona de caseína al 0.3 % (w/v) además de la fuente de carbono y tiamina; agar MacConkey adicionado con la fuente de carbono apropiada a una concentración de 1% (w/v). Se emplearon antibióticos cuando se requirió a las siguientes concentraciones: tetraciclina (Tc) a 10 mg/ml, carbencilina (Cb) a 100 mg/ml, kanamicina (Km) a 30 mg/ml, estreptomycin (Sm) a 100 mg/ml. Así también se empleó X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactosido), IPTG (isopropilthio- $\beta$ -D-galactosido) ambos a la concentración de 20 mg/ml y AMPc (adenosin 3'-5' monofosfato cíclico) a la concentración de 1 mM. Los siguientes aminoácidos: serina, metionina, glicina y leucina; se emplearon a una concentración final de 1 mM. Las cepas se crecieron a 37 °C en agitación constante a 250 rpm cuando se cultivo en medios líquidos.

Tabla 3: Cepas bacterianas y plásmidos.

Cepas y Plásmidos	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i>		
HB101	F-hsdS20, leuB6, proA2, thy-1, lacY1, supE44, ara14, galK2, xyl5, rpsL20, recA13	Boyer y Rullán-Ducloux (1969)
DH5 $\alpha$	F-, hsdR17, thi-1, gyrA, $\Delta$ (lacZYA-argF), supE44, recA1, ( $\phi$ 80d $\Delta$ lacZ M15), relA	Woodcock et al. (1989)
SP850	relA1, spoT1, $\Delta$ (cya-1400)::kan, thi-1	Shah et al. (1991)
CA8445-1	relA1, spoT1, $\Delta$ crp-45, rpsL136, thi-1	Sabourin et al. (1975)
Plásmidos		
pLAFR1	Tc <sup>R</sup>	Friedman et al. (1982)
pBluecriptII SK	Amp <sup>R</sup>	Stratagene
pRK2073	Sp <sup>R</sup>	Ditta et al. (1980)

### **Cruza triparental**

Se realizaron dos cruza triparentales empleando como cepas receptoras las cepas mutantes de *E. coli* SP850 (*cya<sup>-</sup>*) y CA8445-1(*crp<sup>-</sup>*). Como donadoras se utilizó a las cepas derivadas de la cepa HB101 de *E. coli* que albergan el banco genómico de la cepa CE3 de *R. etli*. El banco genómico lo constituyen 1200 cósmidos derivados del pLARF1 que poseen un inserto promedio de 20 Kb. El banco tiene al menos tres veces representado el genoma de la cepa de *R. etli* CE3. También se empleó a la cepa HB101 que posee el pRK2073 como plásmido ayudante.

Para las cruza se crecieron las cepas receptoras y la cepa HB101 que porta el pRK2073 en 5 ml de LB durante una noche. Posteriormente se plaquearon conjuntamente 100 ml del cultivo de la cepa receptora y 100 ml de la HB101/pRK2073 en placas de LB sin antibiótico. Las 1200 colonias del banco genómico fueron entonces replicadas sobre estas placas e incubadas a 37°C durante una noche. Las transcojugantes se seleccionan en placas de medio mínimo M9 con maltosa como única fuente de carbono, y los respectivos antibióticos (TcKm para el caso en que se empleó la cepa SP850, y TcSm cuando se utilizó la cepa CA8445-1).

### **Preparación de células competentes por Cloruro de Calcio**

La cepa de interés se inocula en 100 ml de LB con su respectivos antibióticos, y se crecen a 37°C en agitación toda una noche. De este cultivo se toman 5 ml para inocular 100 ml de LB y se deja crecer hasta alcanzar una D.O entre 0.3 y 0.4 a 540 nm. Se centrifugan las células por 5 min a 10,000 rpm en un rotor Beckman tipo JA-14 y se resuspenden en 50 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M frío. Las células se mantiene en hielo por 30 min y nuevamente se centrifugan por 5 min a 10,000 rpm. Las células se resuspenden en 8.7 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M frío y 1.3 ml de glicerol al 100 %. Se alicotan 200 ml de células que se mantienen en congelación a -70°C. (Modificado de: Mariatis et al. 1989 )

### **Transformación de células competentes**

A 200 ml de células competentes, previamente descongeladas, se les agregan entre 100 y 200 ng del ADN plasmídico de interés, se incuban en hielo por 30 min y después se someten a un choque térmico a 42°C por 2 min. Las células se recuperan en 1 ml de LB en agitación a 37°C por 1 hr. Posteriormente se plaquean 200 ml de la mezcla de transformación en placas de LB con el antibiótico adecuado y se mantienen en incubación a 37°C hasta obtener las colonias transformantes (Modificado de: Mariatis et al. 1989 ).



### **Purificación de plásmidos**

La purificación de plásmidos se realizó por el método de lisis alcalina, de la siguiente manera: se parte de un cultivo saturado de la cepa que porta el plásmido de interés, se transfieren 1.5 ml del cultivo a un tubo eppendorf. Las células se centrifugan a máxima velocidad durante 20 segundos y se decanta el sobrenadante. La pastilla se resuspende en 0.5 ml de Buffer TE (Ap.3), después se centrifuga a máxima velocidad por 20 segundos y se decanta el sobrenadante. La pastilla se resuspende en 100 µl de la solución I (Ap. 4), se agregan 200 µl de la solución II (Ap.5). se mezcla e incuba en hielo por 5 min; en seguida se agregan 150 µl de la solución III, se mezcla y se incuba en hielo durante 5 min. Se centrifuga a velocidad máxima por 10 min y se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf. Se añaden 400 µl de fenol saturado y 400 µl de cloroformo, y se agita con ayuda del vortex por 12 segundos y se centrifuga 10 min a velocidad máxima. Con la fase acuosa se repite la operación anterior. A la fase acuosa se adiciona 1 µl de etanol absoluto y se mezcla agitando por inversión, se incuba 10 min a temperatura ambiente para posteriormente centrifugar 10 min a velocidad máxima. Se descarta el sobrenadante y a la pastilla se le agregan 0.5 µl de etanol al 70 %, se agita brevemente y se centrifuga a velocidad máxima por 5 min, se descarta el sobrenadante. La pastilla de ácidos nucleicos se seca usando una bomba de vacío y finalmente se disuelve en 40 µl de agua desionizada (Modificado de: Maniatis et al. 1989).

### **Curvas de crecimiento**

Las cepas se crecen a saturación durante una noche en 100 ml de medio rico LB con los antibióticos correspondientes. Los cultivos se centrifugan por 10 minutos a 10,000 rpm en un rotor Beckman tipo JA-14. Para posteriormente se lavan las células un par de ocasiones con agua destilada estéril con el fin de eliminar el medio rico restante. En seguida se concentran las células en 10 ml de agua estéril. Se lee a 540 nm la densidad óptica de una dilución 1:10 del resuspendido celular. Los medios para realizar las curvas de crecimiento se inoculan a una densidad óptica inicial de 0.05 a 540 nm.

El volumen de cultivo requerido para inocular se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{volumen requerido} = ((0.05)(0.1)/D.O) \cdot 100$$

donde: 0.05 = densidad óptica a la que se desea inocular.

0.1 = volumen expresado en ml que se tomó para medir la D.O de el cultivo concentrado.

D.O = densidad óptica a la que se encuentra el cultivo concentrado.

100 = volumen expresado en ml del medio a inocular.

Una vez inoculados los medios deseados se procede a tomar una muestra de 1 ml para leer a 540 nm la densidad óptica inicial. A distintos intervalos de tiempo se toman muestras de 1 ml de los cultivos y se lee la densidad óptica a 540 nm.

### **Experimentos de subclonación**

En la clonación de los distintos fragmentos de ADN se utilizó el vehículo pBluescriptII SK (+). Este plásmido de 2961 pb es un derivado del pUC19 que confiere resistencia a ampicilina, y que posee el origen de replicación *f1* del fago M13 y el *colE1*. Debido a que el pBluescriptII SK (+) contiene parte del gen entérico de *LacZ*, incluyendo su secuencia promotora, posibilita el tipo de complementación a en aquellas cepas de *E. coli* que posean una mutación particular denominada *LacZDM15*. El fenotipo *Lac+*, en estas bacterias, se reconoce fácilmente ya que forman colonias azules en placas de LB con IPTG y X-gal (substrato cromogénico). Sin embargo la inserción de fragmentos de ADN extraño en el "polilinker" de este plásmido resulta en la pérdida de la  $\alpha$ -complementación, y dado que el "polilinker", conformado por 21 sitios únicos de restricción, se ubica dentro del gen *LacZ*; las bacterias portadoras de estos plásmidos recombinantes producen colonias blancas en placas de LB X-gal e IPTG.

La clonación de los fragmentos de ADN se realizó de la siguiente manera: Inicialmente se digiere con la misma enzima de restricción el ADN del vehículo y de la clona que contiene los fragmentos de interés. Usualmente 1 mg de ADN se digería en un volumen total de 20 ml. Cuando se realizaron digestiones parciales generalmente se reducía tanto la cantidad de enzima como el tiempo de digestión. Las digestiones se analizaron en corrimientos electroforéticos de geles de agarosa al 1%-TAE (Buffer Tris-Acetato-EDTA). Posteriormente se ligan ambas digestiones en reacciones de 50 ml, usando 25 u de DNA ligasa de T4. Las concentraciones comúnmente requeridas de ADN del vector y del inserto fueron de 100 y 500 ng, respectivamente. Las condiciones para las reacciones de digestión y de ligación dependen de las especificaciones que recomiendan los distintos fabricantes de las enzimas. La reacción de ligasa se precipita con 1/10 del volumen de Acetato de Sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto. El ADN se resuspende en 10 ml de agua, que se utiliza para transformar la cepa de *DH5 $\alpha$*  de *E. coli*. Se seleccionan en este caso aquellas colonias blancas que crecen en placas de LB Cb, X-gal e IPTG. A estas colonias se les extrae el ADN plásmidico para analizar su patrón de restricción con endonucleasas.

## RESULTADOS

### IDENTIFICACION DE FRAGMENTOS DE ADN DE *Rhizobium etli* QUE

#### COMPLEMENTAN A CEPAS *cya*<sup>-</sup> Y *crp*<sup>-</sup> DE *E. coli*.

La estrategia empleada para identificar los genes *cya* y *crp* de *R. etli* fue complementar cepas mutantes de *E. coli* *cya*<sup>-</sup> y *crp*<sup>-</sup>, con cósmidos pertenecientes a un banco genómico de *R. etli* cepa CE3. Para ello se introdujeron los 1200 cósmidos del banco en las cepas mutantes SP850 (*cya*<sup>-</sup>) y CA8445-1 (*crp*<sup>-</sup>) mediante una cruza triparental. Puesto que ambas mutantes son incapaces de crecer en fuentes de carbono distintas a la glucosa, (i. e. maltosa, lactosa, etc.) y dado que la expresión del operón *malt* de *E. coli*, requerido para la utilización de maltosa, esta bajo el control positivo del AMPc y de su proteína receptora. Se seleccionaron aquellas transcojugantes capaces de crecer en maltosa, es decir, transcojugantes que portan clonas que restauran la capacidad de las mutantes *cya*<sup>-</sup> o *crp*<sup>-</sup> para crecer en maltosa. En el caso de la complementación de la cepa *cya*<sup>-</sup> se identificaron cuatro clonas que complementan la cepa mutante. Mientras que en el caso de la cepa *crp*<sup>-</sup> se encontró que ocho clonas logran complementar la mutante. Las transcojugantes elegidas se analizaron con otros criterios, como describiremos posteriormente, para determinar si realmente portan los genes homólogos para la adenilato ciclasa o para la proteína receptora del AMPc de *R. etli*.

#### Análisis de los patrones de restricción de las clonas de ADN que complementan la mutante *cya*<sup>-</sup> *E. coli*.

Se comparó el patrón de restricción con EcoRI de las cuatro clonas llamadas pTS933, pTS934, pTS1179 y pTS1190, que complementan a la mutante *cya*<sup>-</sup> de *E. coli*. No obstante que el patrón de restricción de las cuatro clonas es distinto, todos los cósmidos comparten fragmentos Eco RI de distintos pesos moleculares. Los cósmidos pTS933, pTS1179 y pTS1190 tienen en común un fragmento de 2.6 Kb y otro de 1.2 Kb, mientras que los cósmidos pTS1179 y pTS1190 comparten al menos tres fragmentos más, de 1.9, 1.4 y otro de 7 Kb aproximadamente. El plásmido pTS934 posee un fragmento de 2.3 Kb que comparte con los plásmidos pTS933 y pTS1190. (Fig. 3).

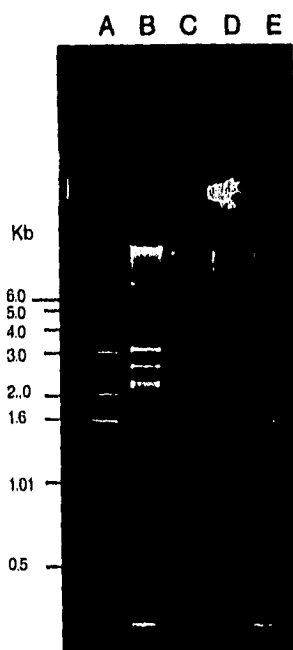


Figura 3: Análisis de restricción con EcoRI de los cósmidos que complementan a la mutante *cyo<sup>-</sup>* de *E. coli*. línea A. Ladder 1 Kb; de la línea B a la E son los cósmidos pTS933, pTS934, pTS1179 y pTS1190, respectivamente.

#### **Análisis de los patrones de restricción de las clonas de ADN que complementan la mutante *crp<sup>-</sup>* de *E. coli***

Un total de ocho clonas procedentes del banco genómico de *R. etli* complementaron la cepa *crp<sup>-</sup>* de *E. coli*. Las clonas se llamaron pJT41, pJT42, pJT459, pJT490, pJT1012, pJT1013, pJT1088 y pJT1096. De estas ocho clonas se encontraron solo tres patrones de restricción con Eco RI diferentes, es decir, las primeras seis clonas presentan exactamente el mismo patrón y las dos últimas tienen patrones diferentes. No obstante en los distintos patrones se presentan fragmentos EcoRI comunes, es decir, aparentemente las tres cosmidos comparten un fragmento de aproximadamente 1.2 Kb en común; mientras que los plásmidos pJT1013 y pJT1088 comparten fragmentos de 4.9 y 1.8 Kb (Fig. 4).



Figura 4: Análisis de restricción con EcoRI de los cósmidos que complementan a la mutante *crp*<sup>-</sup> de *E. coli*. línea A. Ladder 1 Kb; de la línea B a la D son los cósmidos pJT1013, pJT1088 y pJT1096, respectivamente.

#### CARACTERIZACION DE LAS CEPAS *cya*<sup>-</sup> y *crp*<sup>-</sup> COMPLEMENTANTES

Se analizaron distintos criterios para determinar si realmente las cepas complementantes portan los genes homólogos para la adenilato ciclasa y para la proteína receptora del AMPc de *R. etli*. Los criterios examinados fueron: 1) crecimiento en placas de medio mínimo M9 y 2) fenotipos en placas de agar MacConkey, ambos medios adicionados con distintas fuentes de carbono, cuyo catabolismo depende en *E. coli* del complejo AMPc-CRP; 3) sensibilidad a la fosfomicina, antibiótico cuyo efecto en bacterias entéricas es dependiente del AMPc y CRP; 4) sensibilidad a una mezcla de aminoácidos que inhiben el crecimiento de *E. coli* y cuyo efecto es también dependiente del complejo AMPc-CRP; 5) finalmente se realizaron dinámicas de crecimiento en medio mínimo M9 adicionado con lactosa y maltosa.

### **1) Crecimiento en placas de medio mínimo M9**

Como se ha mencionado con anterioridad, el catabolismo de numerosas fuentes de carbono dependen del complejo AMPc-CRP. Debido a lo cual, se examinó la capacidad de las cepas mutantes *cya*<sup>-</sup> y *crp*<sup>-</sup> complementadas, para crecer en distintas fuentes de carbono, cuya utilización en *E. coli* depende del AMPc. Las cepas complementantes se crecieron en placas de medio mínimo M9 con lactosa o maltosa como fuentes de carbono. Las cuatro cepas mutantes *cya*<sup>-</sup> complementadas fueron capaces de crecer en las dos fuentes de carbono empleadas. Por su parte, las ocho cepas *crp*<sup>-</sup> complementantes crecieron utilizando lactosa y maltosa como fuentes de carbono (Tabla 4).

### **2) Fenotipos en placas de agar MacConkey**

Se examinó la fermentación de distintos azúcares en placas de agar MacConkey. El agar MacConkey es un medio rico que contiene el colorante rojo neutro. Este medio carece de una fuente de carbono en particular, debido a lo cual es posible añadir el carbohidrato deseado y monitorear cualitativamente su fermentación por medio del colorante rojo neutro; el cual funciona en enterobacterias como un indicador de la fermentación de azúcares. De esta manera, las colonias capaces de utilizar la fuente de carbono adicionada se tornan rojas, mientras que colonias que no fermentan tal carbohidrato son de color dorado. El agar MacConkey se adicionó con los siguientes azúcares: lactosa, maltosa, galactosa, arabinosa y xilosa. Las cepas mutantes *cya*<sup>-</sup> complementadas únicamente fermentaron lactosa, maltosa y galactosa. Por otra parte, en el caso de las cepas *crp*<sup>-</sup> complementadas, la cepa que porta el pJT1096 utiliza lactosa, maltosa y galactosa; mientras que el resto las cepas mutantes complementadas solo utilizan lactosa y maltosa. Ninguna de las cepas complementantes *cya*<sup>-</sup> o *crp*<sup>-</sup> fermentan arabinosa, ni xilosa (Tabla 4).

### **3) Sensibilidad a fosfomicina**

Ciertos antibióticos como la fosfomicina ó el ácido nalidixico se introducen a *E. coli* por mecanismos de transporte propios de fuentes de carbono (Alper y Ames, 1978) Para el caso de la fosfomicina, inhibidor de la síntesis de pared celular, el transporte se lleva a cabo por los sistemas que normalmente transportan L- $\alpha$ -glicerofosfato y hexosas fosfato, ambos regulados positivamente por el AMPc (Koch et al., 1964; Winkler et al., 1970). Consecuentemente, las cepas mutantes de *E. coli* *cya*<sup>-</sup> y *crp*<sup>-</sup> son resistentes a bajas concentraciones del antibiótico. Se examinó la

respuesta de las cepas mutantes complementantes a la fosfomicina en placas de agar MacConkey adicionado con lactosa, y fosfomicina a una concentración final de 25 mg/ml. Las cepas complementadas *cya*<sup>-</sup> y *crp*<sup>-</sup> fueron sensibles a la fosfomicina, mientras que ambas cepas mutantes son resistentes a dicho antibiótico (Tabla 4).

#### **4) Sensibilidad a Aminoácidos**

Uzan y Danchin (1976) observaron que el crecimiento de *E. coli* se inhibe en la presencia de concentraciones elevadas de serina y que el mismo efecto se potencia cuando se confronta a *E. coli* con una mezcla de aminoácidos que incluye: serina, metionina, leucina y glicina. El efecto preciso de la serina en el crecimiento de *E. coli* no se ha aclarado del todo, aparentemente existe alguna interrelación entre las rutas metabólicas que sintetizan los distintos aminoácidos. En este sentido aparentemente el efecto de la serina consiste en desbalancear la síntesis de aminoácidos de cadenas ramificadas (i. e. isoleucina, valina, etc.), lo que posiblemente provoca la auxotrofia de alguno de estos aminoácidos. Daniel y Danchin (1979) demuestran que el complejo AMPc-CRP participa en la respuesta de *E. coli* hacia la serina. Observan que cepas mutantes *cya*<sup>-</sup> o *crp*<sup>-</sup> son resistentes a la inhibición por la serina. Proponen que el complejo regula positivamente la síntesis de la acetolactato sintasa, con lo cual cepas mutantes *cya*<sup>-</sup> o *crp*<sup>-</sup> no presentan actividad de esta enzima, favoreciendo la acumulación de 2-cetobutirato, precursor del aminoácido isoleucina. La sensibilidad a la serina de las cepas *cya*<sup>-</sup> y *crp*<sup>-</sup> complementadas se examinó en placas de medio mínimo M9 con glucosa, como única fuente de carbono, y la mezcla de los siguientes aminoácidos serina, metionina, glicina y leucina. El crecimiento de todas las cepas *cya*<sup>-</sup> y *crp*<sup>-</sup> complementantes se inhibió por la serina (Tabla 4).

#### **5) Curvas de Crecimiento de las cepas mutantes complementadas**

Se realizaron curvas de crecimiento de las cepas complementantes de *E. coli* *cya*<sup>-</sup> y *crp*<sup>-</sup>, en medio mínimo M9 adicionado con lactosa o maltosa como únicas fuentes de carbono. Para el caso de las cepas *cya*<sup>-</sup> complementadas se tomaron lectura de las muestras en los siguientes intervalos de tiempo: primer lectura a las 5 hrs, segunda lectura a las 11 hrs y tercer lectura a las 24 hrs de iniciada la dinámica de crecimiento. En el caso de las cepas *crp*<sup>-</sup> complementadas la curva de crecimiento se elaboró únicamente con las cepas complementadas que portan las clonas distintas, es decir, con las cepas que portan los plásmidos pJT1013,

pJT1088 y pJT1096. La lectura de las muestras se realizó en los mismos intervalos de tiempo a las anteriores, tomándose una cuarta lectura a las 48 hrs de iniciada la dinámica de crecimiento. Por otra parte, debido a la falta de una cepa silvestre de *E. coli* para emplearla como control positivo en la elaboración de las distintas curvas, decidimos utilizar la cepa mutante de *E. coli cya<sup>-</sup>* creciéndola en presencia de AMPc en una concentración final de 1 mM.

En la gráfica 1 se presentan las curvas de crecimiento correspondientes a las cepas *cya<sup>-</sup>* complementantes crecidas en medio mínimo M9 adicionado con lactosa. Mientras que la cepa mutante es incapaz de utilizar lactosa como única fuente de carbono, el resto de las cepas logran crecer en este medio. Particularmente la cepa que porta el plásmido pTS1179 crece tan bien como la cepa mutante *cya<sup>-</sup>* crecida en presencia de AMPc. Ambas cepas después de 11 horas de crecimiento alcanzan una D.O. de 1.0, mientras que el resto de las cepas complementadas crecen a una D.O. aproximada de 0.5 exceptuando a la cepa que alberga el plásmido pTS934 que crece a una D.O. de 0.75. El rendimiento final de las cepas complementadas y de la cepa mutante crecida en presencia de AMPc, después de 24 horas de iniciada la dinámica el crecimiento, es 10 veces mayor al rendimiento que alcanza la cepa mutante *cya<sup>-</sup>*.

La gráfica 2 presenta las curvas de crecimiento de las cepas *cya<sup>-</sup>* complementantes crecidas en medio mínimo M9 suplementado con maltosa. No obstante que el rendimiento final de las cepas complementantes es similar al alcanzado por la cepa mutante crecida en presencia de AMPc, los tiempos de duplicación de las cepas complementantes se incrementan dos y hasta tres veces en comparación con el tiempo de duplicación de la mutante crecida con AMPc. Lo anterior es notorio después de 11 horas de incubación, ya que las densidades ópticas alcanzadas por las cepas complementantes van de 0.25 a 0.42, mientras que la D. O que alcanza la cepa mutante crecida con AMPc es de 0.97. Por su parte, el rendimiento final de la cepa mutante *cya<sup>-</sup>* es solo un 18 % del que alcanza cuando se crece ante AMPc.

La gráfica 3 describe el crecimiento de las cepas *crp<sup>-</sup>* complementantes crecidas en medio mínimo M9 suplementado con lactosa. Mientras que los rendimientos finales de las cepas *crp<sup>-</sup>* complementantes son similares al rendimiento de la mutante *cya<sup>-</sup>* crecida con AMPc, el rendimiento final de la cepa mutante *crp<sup>-</sup>*



representa un 16 % del crecimiento que alcanza la cepa *cya<sup>-</sup>* cuando se crece con AMPc. No obstante el patrón de crecimiento de las cepas *crp<sup>-</sup>* complementadas con los diferentes cósmidos es distinto. Mientras que la cepa complementada con el plásmido pJT1096 crece tan bien como la cepa *cya<sup>-</sup>* crecida en presencia de AMPc, las cepas complementadas con los plásmidos pJT1013 y pJT1088 presentan fases *lag* demasiado prolongadas. En el caso de la cepa *cya<sup>-</sup>* crecida con AMPc y de la cepa *crp<sup>-</sup>* complementada con el pJT1096, la fase *lag* dura 5 horas; mientras que en las cepas complementadas con los plásmidos pJT1013 y pJT1088 se prolongan al menos por 11 horas. También los tiempos de duplicación de la cepa que porta el pJT1088 se incrementan notoriamente. A 24 horas de iniciada la dinámica de crecimiento las cepas complementadas con los plásmidos pJT1096 y pJT1013 han alcanzado densidades ópticas cercanas a 1. al tiempo que la cepa que lleva el pJT1088 solo ha crecido a una D. O de 0.1.

La gráfica 4 representa el crecimiento de las cepas mutantes *crp<sup>-</sup>* complementadas crecidas en medio mínimo M9 suplementado con maltosa como única fuente de carbono. El rendimiento final de la cepa *crp<sup>-</sup>* representa un 18 % del crecimiento que alcanzan tanto la cepa *cya<sup>-</sup>* crecida con AMPc como las cepas *crp<sup>-</sup>* complementadas con los distintos plásmidos. Particularmente la cepa que porta el pJT1096 crece tan bien como la cepa *cya<sup>-</sup>* crecida con AMPc. Por su parte las cepas que portan los plásmidos pJT1013 y pJT1088 crecen más lentamente, es decir, presentan tiempos de duplicación que se incrementan al menos dos veces en comparación con el tiempo de duplicación de la cepa *cya<sup>-</sup>* crecida con AMPc. Lo anterior es más notorio a las 11 horas de crecimiento en que la cepa mutante *cya<sup>-</sup>* crecida ante AMPc han alcanzado una D.O de 0.42, al tiempo que las cepas que portan los plásmidos pJT1013 y pJT1088 alcanzan densidades ópticas de 0.14 y 0.11, respectivamente.

Tabla 4 : Complementación de las cepas mutantes de *E. coli*

Cepas	Medios empleados						Fostomicina	Senna	
	Agar MacConkey					M 9			
	Lactosa	Maltosa	Galactosa	Arabinosa	Manosa	Maltosa lactosa			
SP850	D	D	D	D	D	-	-	+	+
SP850/pLARF	D	D	D	D	D	-	-	+	+
SP850/pTS933	R	R	R	D	D	+	+	-	-
SP850/pTS934	R	R	R	D	D	+	+	-	-
SP850/pTS1179	R	R	R	D	D	+	+	-	-
SP850/pTS1190	R	R	R	D	D	+	+	-	-
CA8445-1	D	D	D	D	D	-	-	+	+
CA8445-1/pLARF	D	D	D	D	D	-	-	+	+
CA8445-1/pJT1013	R	R	D	D	D	+	+	-	-
CA8445-1/pJT1012	R	R	D	D	D	+	+	-	-
CA8445-1/pJT1088	R	R	D	D	D	+	+	-	-
CA8445-1/pJT1098	R	R	R	D	D	+	+	-	-
CA8445-1/pJT41	R	R	D	D	D	+	+	-	-
CA8445-1/pJT42	R	R	D	D	D	+	+	-	-
CA8445-1/pJT459	R	R	D	D	D	+	+	-	-
CA8445-1/pJT490	R	R	D	D	D	+	+	-	-

D colonias doradas, R colonias rojas, + crecimiento, - no crecimiento

Las cepas fueron crecidas en placas de medio mínimo M9 y A. MacConkey adicionando las fuentes de carbono listadas a una concentración final de 0.2 % y 1 %, respectivamente.

El efecto de la fostomicina fue examinada en placas de A. MacConkey - lactosa y fostomicina 25 mg / l.

El efecto de la serina se examinó en placas de medio mínimo M9 adicionado con glucosa y una mezcla de aminoácidos (serina, metionina, glicina y leucina) a una concentración final de 1 mM.

### CLONACION DE UN FRAGMENTO DE ADN DE *R. etli* DE 1.3 Kb QUE COMPLEMENTA PARCIALMENTE UNA MUTANTE *cya*<sup>-</sup> DE *E. coli*.

Para identificar el gen que codifica para la adenilato ciclasa en *R. etli* se continuo con la estrategia inicial, es decir, complementar la cepa mutante *cya*<sup>-</sup> de *E. coli* con ADN de *R. etli*. Para lo cual se eligió a uno de los plásmidos que complementan a la mutante *cya*<sup>-</sup>. El plásmido elegido fue el pTS934, se eligió a este plásmido debido a que durante la crucea triparental en que se identificó a las clonas que complementan a la cepa mutante *cya*<sup>-</sup> de *E. coli*, la cepa portadora del pTS934 creció antes que el resto de las cepas complementadas. Para reducir el tamaño del fragmento de ADN que contiene al gen *cya* de *R. etli*, se clonaron todos los fragmentos presentes en la digestión del pTS934 con EcoRI en el vector pBluescriptII SK (+) (Fig. 9). Posteriormente se examinó la capacidad de las cepas *cya*<sup>-</sup> transformadas con las distintas clonas para crecer en lactosa como única

fuelle de carbono. La cepa *cya*<sup>-</sup> que porta la clona llamada pE10 logró crecer en lactosa, tal clona contiene un fragmento de aproximadamente 10 Kb. Con la finalidad de elegir a alguna endonucleasa que no digiriera la clona en demasiados fragmentos; la clona pE10 fue digerida con varias de las enzimas de restricción que tienen sitio único en el "polilinker" del pBluescriptII SK(+). Posteriormente utilizando la endonucleasa Sal I se realizaron digestiones parciales de la clona pE10 para posteriormente religar en el mismo vehículo, con tal reacción se transforma a la cepa *cya*<sup>-</sup>. Las colonias que poseen el plásmido que conserva el fragmento de ADN que le permite a la cepa *cya*<sup>-</sup> utilizar lactosa se tornan azules en placas de M9 lactosa, peptona de caseína, Cb, y X-gal; mientras que aquellas colonias que poseen plásmidos que perdieron tal fragmento son totalmente blancas. Se extrajo ADN plasmídico de 5 colonias azules y 5 colonias blancas. Posteriormente se realizó el análisis de restricción de estos plásmidos utilizando la enzima Sal I. El patrón de restricción de los plásmidos que portan las colonias azules presentan un fragmento de ADN común, de aproximadamente 3 Kb; el mismo fragmento no se encuentra representado en ninguno de los patrones de restricción de los plásmidos que portan las colonias blancas (Fig. 10). El fragmento de ADN de 3 Kb se ligo al pBluescriptII SK (+) para formar la clona pS33.10. Esta clona se utilizó para transformar la cepa *cya*<sup>-</sup>. Las bacterias transformantes se seleccionaron en medio mínimo M9 con lactosa, peptona de caseína, Cb, y Xgal; todas las colonias que crecieron fueron azules, es decir, la clona pS33.10 complementa la capacidad de la cepa mutante de *E. coli cya*<sup>-</sup> para utilizar lactosa. Para reducir el fragmento de ADN que contienen el gen *cya* de *R. etli*, la clona pS33.10 fue digerida con algunas de las enzimas de restricción que tienen sitios únicos en el "polilinker" del pBluescriptII SK (+). Después de analizar los distintos patrones de restricción resultantes se decidió clonar los fragmentos de ADN presentes en la digestión de la clona pS33.10 con Hind III. Las clonas obtenidas fueron llamadas pH1.3, pH2.1 y pH3.1 (Fig 11). Células competentes de la cepa *cya*<sup>-</sup> fueron transformadas con las distintas clonas. Nuevamente el medio de selección fue medio mínimo M9 adicionado con lactosa, peptona de caseína, Cb y X-gal. Únicamente las colonias que portan el plásmido pH1.3 se tornaron azules en este medio, es decir, el plásmido pH1.3 posee un inserto de aproximadamente 1.3 Kb, procedente del genoma de *R. etli*, que complementa la capacidad de la cepa mutante de *E. coli cya*<sup>-</sup> para utilizar lactosa como fuente de carbono.

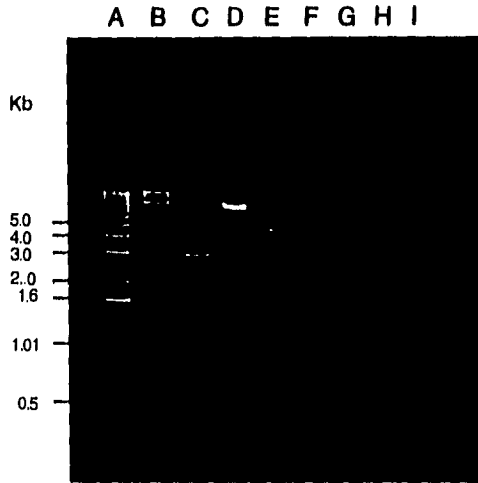


Figura 9: Análisis de restricción de las clonas obtenidas apartir de fragmentos EcoRI del cósmido pTS934. A. Ladder 1Kb; B. Digestión del cósmido pTS934 con EcoRI; C. pBluescriptII SK (+). D, E, F, G ,H , I. clonas obtenidas digeridas con EcoRI.

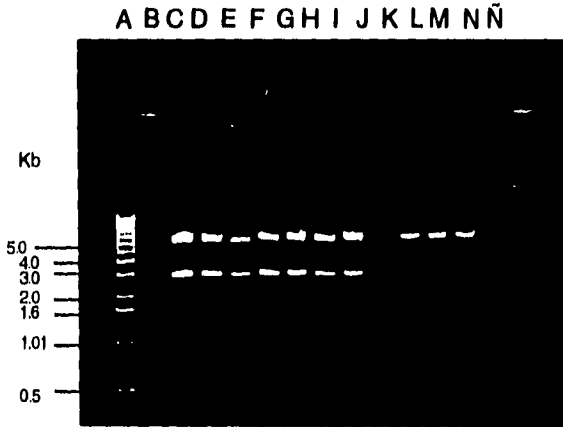


Figura 10: Análisis de restricción de las clonas obtenidas apartir de digestiones parciales con Sall de la clona pE10. A. Ladder 1 Kb; B. digestión de la clona pE10 con Sall; C, D, E, F, G, H, I clonas procedentes de colonias azules; J, K, L, M, N, Ñ clonas de colonias blancas.

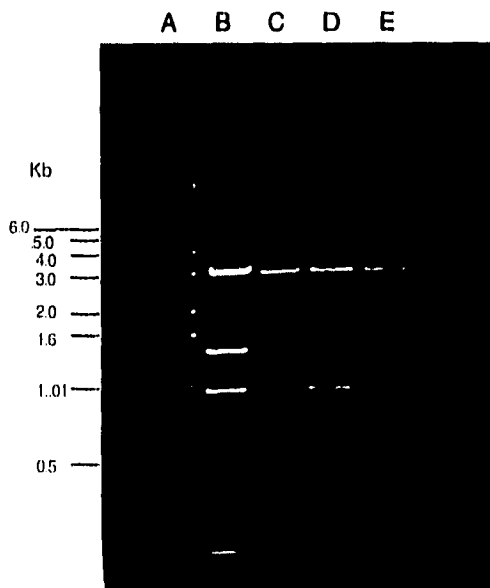


Figura 11: Análisis de restricción de las clonas que portan los fragmentos Hind III de la clona pS33.10. A. Ladder 1 Kb; B. Digestión Hind III de la clona pS33.10. C, D, E Digestión Hind III de las clonas obtenidas apartir de los fragmentos HindIII de la clona pS33.10. En la línea C se encuentra la clona llamada pH1.3 que complementa a la cepa *cya<sup>-</sup>* de *E. coli*.

### **CARACTERIZACION DE LA CEPA DE *E. coli cya<sup>-</sup>* COMPLEMENTADA CON EL PLASMIDO pH1.3**

Se caracterizó la cepa mutante *cya<sup>-</sup>* de *E. coli* complementada con el plásmido pH1.3 exaninando los criterios enteriormente empleados. La cepa *cya<sup>-</sup>* complementada con la clona pH1.3 creció en placas de M9 adiclonadas con lactosa y maltosa como únicas fuentes de carbono. Así también en el caso de las placas de agar MacConkey fue capaz de fermentar lactosa y maltosa, no así galactosa, arabinosa, ni xilosa. En lo relativo a la sensibilidad hacia la fosfomicina, la cepa complementada al igual que la cepa mutante fue resistente al efecto del antibiótico, es decir, ambas cepas crecen en presencia de la misma concentración de fosfomicina en el medio (25 mg/ml). Concentraciones elevadas de la mezcla de distintos aminoácidos no tienen efecto en el crecimiento de la cepa mutante, ni en el crecimiento de la cepa complementada (Tabla 5). La gráfica 5 describe el

crecimiento en medio mínimo M9 adicionado con lactosa como única fuente de carbono de la cepa mutante *cya<sup>-</sup>* complementada con la clona pH1.3. El rendimiento final de la cepa *cya<sup>-</sup>* fue un 13 % del rendimiento que alcanzó cuando se creció con AMPc. Si bien, el rendimiento final de la cepa *cya<sup>-</sup>* complementada con el pH1.3 fue ligeramente mayor que el alcanzado por la cepa *cya<sup>-</sup>* crecida con AMPc; la cepa complementada creció más lentamente, es decir, el tiempo de duplicación que presentó la cepa complementada con el pH1.3 fue casi el doble del tiempo que tardaba la mutante crecida con AMPc en duplicarse. Esto es visible a las 11 horas de iniciada la dinámica de crecimiento en que la cepa mutante crecida ante AMPc ha alcanzado una D.O de 0.97, al tiempo que la cepa mutante complementada con el pH1.3 solo alcanza una D.O cercana a 0.5.

La gráfica 6 presenta el crecimiento de la cepa mutante complementada con el pH1.3 crecida en medio mínimo M9 suplementado con maltosa. La cepa mutante después de 24 horas de incubación alcanza un rendimiento final igual al 18 % del rendimiento alcanzado por la misma mutante crecida con AMPc. Por su parte la cepa mutante complementada con el pH1.3 tiene un rendimiento final de 0.65 % del alcanzado por la *cya<sup>-</sup>* crecida con AMPc. Nuevamente el tiempo de duplicación de la cepa que porta el pH1.3 se incrementa hasta tres veces comparado con el tiempo de duplicación que presenta la cepa mutante crecida con AMPc.

Tabla 5 : Complementación de la cepa mutante de *E.coli cya-*

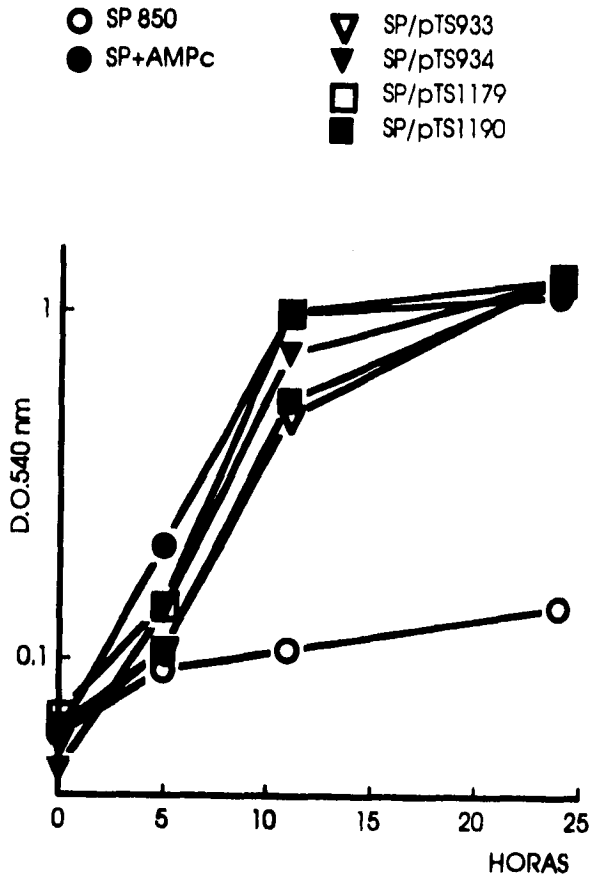
Cepas	Medios empleados								
	Agar MacConkey				M9		Fosfomicina	Serina	
	Lactosa	Maltosa	Galactosa	Arabinosa	Manosa	Maltosa	lactosa		
SP850	D	D	D	D	D	-	-	+	+
SP850/pBluescriptII SK (+)	D	D	D	D	D	-	-	+	+
SP850/pH1.3	R	R	D	D	D	+	+	+	+

D colonias doradas, R colonias rojas, + crecimiento, - no crecimiento

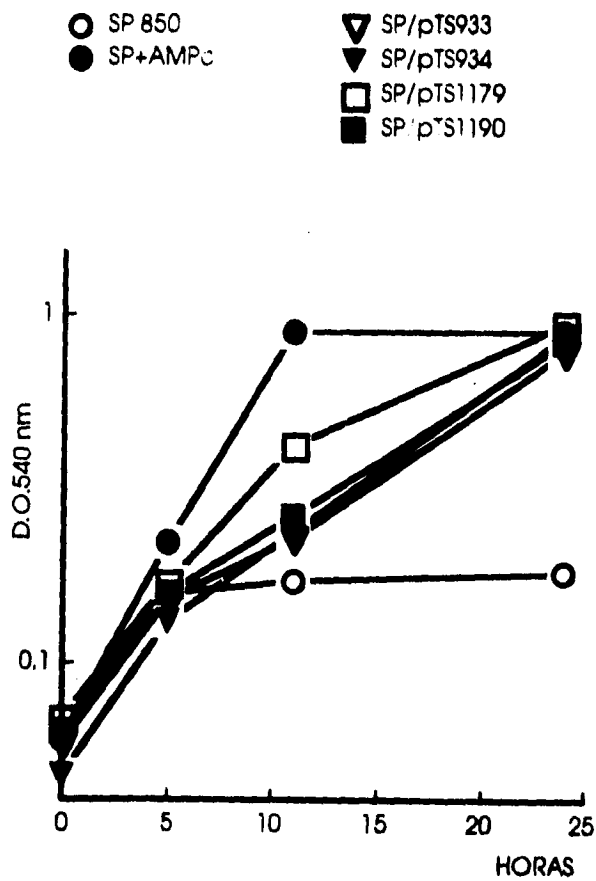
Las cepas fueron crecidas en placas de medio mínimo M9 y A. MacConkey adicionando las fuentes de carbono listadas a una concentración final de 0.2 % y 1 %, respectivamente.

El efecto de la fosfomicina fue examinada en placas de A. MacConkey - lactosa y fosfomicina 25 mg/l.

El efecto de la serina se examinó en placas de medio mínimo M9 adicionado con glucosa y una mezcla de aminoácidos (serina, metionina, glicina y leucina) a una concentración final de 1 mM.



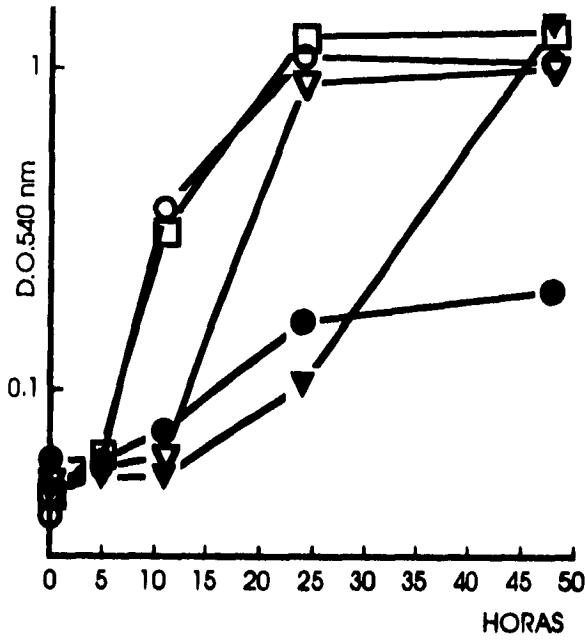
Gráfica 1 : Crecimiento de las cepas *cya*<sup>-</sup> complementadas crecidas en medio mínimo M9-lactosa



Gráfica 2: Crecimiento de las cepas *cya<sup>-</sup>* complementadas crecidas en medio mínimo M9-maltosa

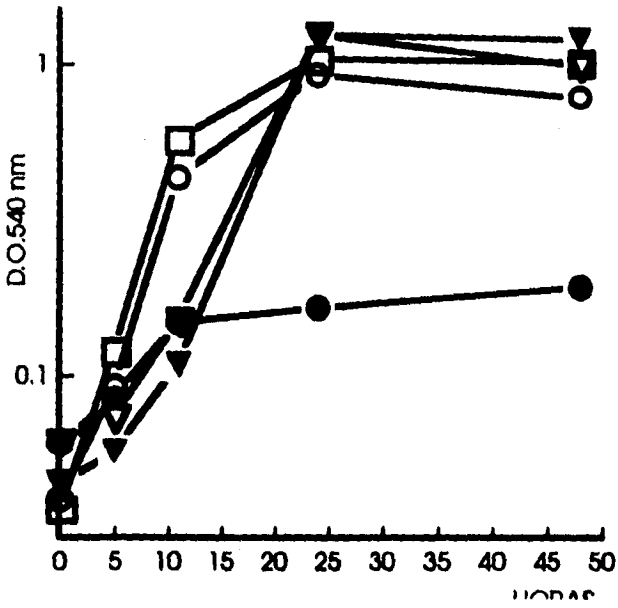


- SP 850 + AMPc
- CA8445-1
- ▽ CA/pJT1013
- ▽ CA/pJT1088
- CA/pJT1096

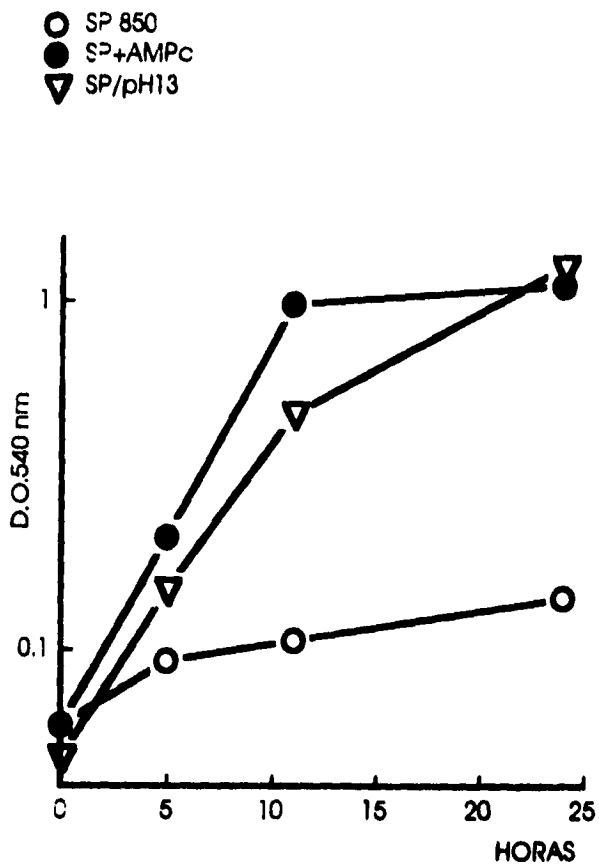


Gráfica 3: Crecimiento de las cepas *cp<sup>-</sup>* complementadas crecidas en medio mínimo M9-lactosa

- SP 850 + AMPc
- CA8445-1
- ▽ CA/pJT1013
- ▽ CA/pJT1088
- CA/pJT1096

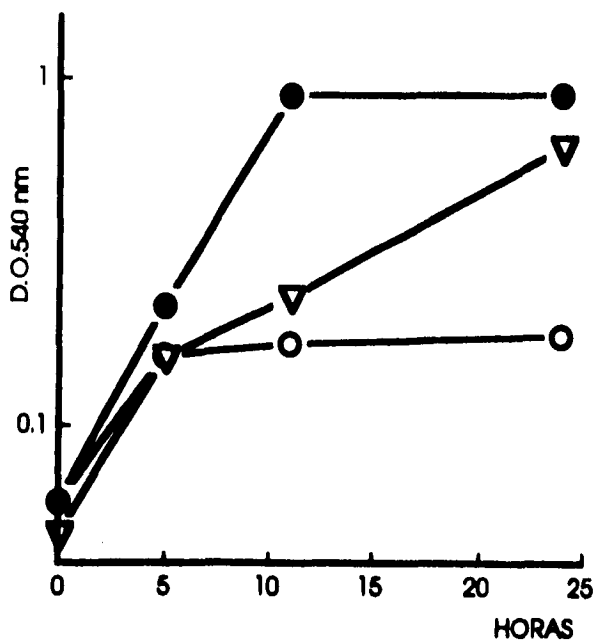


Gráfica 4 : Crecimiento de las cepas *crp*<sup>-</sup> complementadas crecidas en medio mínimo M9-maltosa



Gráfica 5 : Crecimiento de la cepa *cya*<sup>-</sup> complementada con la clona pH1.3 crecida en medio mínimo M9-lactosa

- SP 850
- SP+AMPc
- ▽ SP/pH1.3



Gráfica 6 : Crecimiento de la cepa *cya<sup>-</sup>* complementada con la clona pH1.3 crecida en medio mínimo M9-levadura

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El AMPc es una importante molécula que participa conjuntamente con CRP en la regulación transcripcional de numerosos genes involucrados en distintos procesos celulares en *E. coli* y otras bacterias Gram negativas. El AMPc se ha detectado e implicado en el control de distintos fenómenos en *Rhizobium*. Pese a que se ha clonado el gen que codifica para la adenilato ciclasa de *Rhizobium meliloti* (Kiely y O'Gara, 1983) y *Bradyrhizobium japonicum* (Guerinot y Chelm, 1984), no se han logrado obtener cepas mutantes *cya*<sup>-</sup> o *crp*<sup>-</sup>, que permitan establecer en forma precisa el papel del AMPc en *Rhizobium*.

En el presente trabajo se describió el aislamiento e identificación de fragmentos de ADN que probablemente contienen los genes que codifican para la adenilato ciclasa y CRP de *R. etli*, por complementación de cepas mutantes de *E. coli* *cya*<sup>-</sup> y *crp*<sup>-</sup> con cósmidos provenientes de un banco genómico de la cepa CE3 de *R. etli*. Se aislaron clonas del banco de genes que complementan parcialmente a ambas cepas mutantes. En el caso de la cepa mutante *crp*<sup>-</sup>, se identificaron tres clonas cuyos patrones de restricción, aun cuando son distintos, presentan fragmentos de ADN en común. Para el caso de la cepa mutante *cya*<sup>-</sup>, se aislaron cuatro clonas del banco que presentan diferentes patrones de restricción, pero que tienen fragmentos comunes. Lo anterior indica que el grupo de clonas que complementan a cada una de las cepas mutantes, comparten la misma zona del genoma de *R. etli*. A partir de uno de los cósmidos que complementan a la cepa *cya*<sup>-</sup> de *E. coli*, se clonó un fragmento Hind III de 1.3 Kb que posiblemente contiene el gen *cya* de *R. etli*. La evidencia que fundamenta los planteamientos anteriores es que el efecto pleiotrópico, asociado con mutaciones en los genes *cya* y *crp* de *E. coli*, se revirtió con clonas y con el fragmento Hind III de 1.3 Kb de *R. etli*, aunque en este último caso la complementación de la cepa *cya*<sup>-</sup> fue únicamente parcial.

Se examinó la capacidad de las cepas mutantes *crp*<sup>-</sup> complementadas con los distintos cósmidos, para revertir ciertos fenotipos propios de una cepa *crp*<sup>-</sup>. Los resultados obtenidos demuestran que solo algunos de los fenotipos examinados fueron revertidos, es decir, la complementación fue parcial. A diferencia de la cepa *crp*<sup>-</sup>, las cepas complementantes fueron sensibles a la fosfomicina y al efecto de la inhibición por serina; además fueron capaces de utilizar lactosa y maltosa como fuentes de carbono, pero no crecieron en xilosa, ni arabinosa. Cabe mencionar que

hubo diferencias en el patrón de complementación que presentaron las distintas clonas, es decir, mientras que la cepa que porta el cósmido pJT1096 creció en galactosa, el resto de las cepas complementantes no lo hicieron. Se presentó también una clara diferencia en las curvas de crecimiento de las cepas complementantes. Nuevamente la cepa que porta el pJT1096 creció mejor que las cepas complementadas con los otros cósmidos. Existe una diferencia notoria en los patrones de complementación de las cepas mutantes complementadas con los distintos cósmidos, es decir, el cósmido pJT1096 complementa a la cepa mutante más efectivamente que los cósmidos pJT1013 y pJT1088. Por un lado, es posible que los distintos patrones de complementación observados sean el resultado de una expresión diferencial del *crp* de *R. etli* presente en los cósmidos que complementan a la mutante de *E. coli*. Lo anterior podría deberse a que el cósmido pJT1096, a diferencia del pJT1013 y pJT1088, posea una secuencia que potencie la expresión del *crp* de *R. etli* en *E. coli*. Una hipótesis alternativa para explicar las diferencias en el patrón de complementación que presentan las cepas complementantes sería que, los fenotipos revertidos en la cepa mutante *crp*<sup>-</sup> de *E. coli* se complementaron con más de una proteína de *R. etli*. Lo que indicaría que los cósmidos en realidad poseen distintos genes, cuyos productos son funcionalmente similares a CRP en *E. coli*. El fenómeno llamado "cross talk" describe como en condiciones particulares es posible que proteínas reguladoras de la misma familia interactúen de forma cruzada con operones cuya regulación depende en condiciones normales de otra proteína. Crecy-Lagard y colaboradores (1990) reportan una proteína de *Xanthomonas campestris*, que complementa parcialmente una cepa doble mutante de *E. coli* *cya*<sup>-</sup> *crp*<sup>-</sup>. La cepa complementada con la proteína llamada CLP, recobró la capacidad de fermentar distintas fuentes de carbono como lactosa, maltosa, arabinosa, gluconato y ribosa. La secuencia de *clp* de *X. campestris* reveló un elevado porcentaje de identidad (45%) con el *crp* de *E. coli*. Cabe resaltar que una cepa mutante de *X. campestris* *clp*<sup>-</sup> no se ve afectada en la utilización de distintas fuentes de carbono, pero sí reduce su fitopatogenicidad. Finalmente consideramos que el cósmido pJT1096 es el mejor candidato para portar el gen *crp* de *R. etli*.

La complementación parcial de la cepa *crp*<sup>-</sup> de *E. coli* con ADN de *R. etli* probablemente es el resultado de un reducido nivel de expresión del gen *crp* de *R. etli* en un "background" distinto. Lo anterior es posible, dado que la regulación de la expresión de *crp* en *E. coli*, puede ser distinta a la regulación de *crp* en *R. etli*.

De esta manera, aun cuando en la cepa *cya*<sup>-</sup> de *E. coli* los niveles de AMPc son mayores que los presentes en la cepa "wild type", se producen reducidos niveles del complejo AMPc-CRP. Y dado que la expresión de los distintos operones en *E. coli* depende de los niveles del complejo AMPc-CRP, preferentemente se activaran aquellos operones cuyos sitios de unión por CRP tengan mayor afinidad.

Al igual que en la complementación de la cepa mutante *crp*<sup>-</sup>, se examinó la capacidad de las cepas de *E. coli cya*<sup>-</sup> complementadas con los distintos cósmidos de *R. etli*, para revertir algunos fenotipos de una cepa *cya*<sup>-</sup>. Nuevamente la complementación fue parcial, es decir, los distintos cósmidos lograron complementar solo algunos de los fenotipos examinados. Las cepas *cya*<sup>-</sup> complementadas con los distintos cósmidos recobraron la capacidad para utilizar lactosa, maltosa y galactosa, no así arabinosa, ni xilosa; fueron sensibles hacia la fosfomicina y a la inhibición por serina. Aparentemente no hubo diferencias en los patrones de complementación de las cepas complementantes.

Como se ha mencionado anteriormente, los cósmidos de *R. etli* complementaron solo parcialmente la cepa *cya*<sup>-</sup> de *E. coli*, quizás como resultado de un reducido nivel de expresión de el gen *cya* de *R. etli* en *E. coli*; dado probablemente por diferencias en los mecanismos de regulación en ambos organismos. Por otra parte, se han clonado los genes que codifican para la adenilato ciclasa de *R. meliloti* y *B. japonicum*. En ambos casos mediante complementación de cepas mutantes de *E. coli cya*<sup>-</sup>. El gen *cya* de *R. meliloti* complemento parcialmente a la cepa mutante de *E. coli*. La cepa complementada recobró la capacidad para utilizar lactosa, maltosa, y manitol; no así arabinosa, xilosa, ni ribosa. Por su parte el gen *cya* de *B. japonicum* expresado en una mutante *cya*<sup>-</sup> de *E. coli*, complemento un mayor número de fenotipos de la cepa mutante. Le permitió crecer en maltosa, arabinosa, ribosa, xilosa, y manitol, y también fue sensible a la fosfomicina e incluso recobro parcialmente la motilidad. Mientras que los genes *cya* de *R. meliloti* y de *R. etli* complementan parcialmente cepas mutantes *cya*<sup>-</sup> de *E. coli*, el gen *cya* de *B. japonicum* complementa aparentemente mejor. Quizás esta diferencia en los patrones de complementación que presentan las distintas cepas complementadas, se ha debido a que los vectores en que se ubican los genes *cya* de *R. meliloti* y de *R. etli* (pRK290 y pLARF1, respectivamente), son mantenidos en *E. coli* a un bajo número de copias; mientras que el gen *cya* de *B. japonicum* se encuentra clonado en un vector de alto número

de copias (pBR322).

A partir del cósmido pTS934 que complementa la cepa *cya*<sup>-</sup> de *E. coli*, se clonó un fragmento Hind III de 1.3 Kb que continúa complementando a la cepa mutante. Lo que indica que tal fragmento posiblemente contiene el gen *cya* de *R. etli*. El tamaño del fragmento clonado es adecuado para contener al gen *cya* de *R. etli*, ya que el tamaño reportado del gen *cya* de *R. meliloti* es de 0.8 Kb (Lathigra et al., 1986). Los resultados muestran que la clona Hind III de 1.3 Kb le confirió a la cepa *cya*<sup>-</sup> de *E. coli*, la capacidad para utilizar lactosa y maltosa como fuentes de carbono. El resto de los fenotipos examinados en las cepas complementadas con los cósmidos enteros, no fueron complementados con el fragmento de 1.3 Kb. Esta última observación puede deberse a que posiblemente los cósmidos enteros poseen alguna secuencia que potencia la expresión del gen *cya* de *R. etli* en *E. coli* y que tal secuencia no se encuentra en el fragmento de 1.3 Kb. Cuando se clonaron los genes *cya* de *R. meliloti* y de *B. japonicum*, ambos genes se ubicaron en fragmentos de ADN mayores de 5 Kb. En ninguno de los dos casos se redujo a menos de 5 kb el tamaño del fragmento, que contenía al gen *cya*, con el que complementaron la cepa *cya*<sup>-</sup> de *E. coli*. Es posible que de haber continuado reduciendo el tamaño del fragmento, como en nuestro caso, hubieran tenido quizás resultados similares. Una hipótesis alternativa para explicar la complementación parcial de la cepa *cya*<sup>-</sup> con el fragmento Hind III de 1.3 Kb, podría ser que dado que el vehículo pBluescriptII SK(+) en que se clonó tal fragmento, se mantienen en alto número de copias en *E. coli*, incluso en mayor número de copias que el pBR322. La expresión de la adenil ciclasa de *R. etli* en *E. coli* aumenta considerablemente, al igual que la síntesis del AMPc. Originando inicialmente un desvalance en las pozas del AMPc, que conduce a una reducción en la expresión o actividad de la adenil ciclasa de *R. etli*. Por otra parte, cabe mencionar que el gen *crp* de *E. coli* es regulado negativamente por el complejo AMPc-CRP cuando los niveles del complejo son elevados. Si consideramos que los niveles del AMPc son elevados, como consecuencia de la expresión del gen *cya* de *R. etli* clonado en un vehículo de elevado número de copias. La expresión del gen *crp* de *E. coli* vera reprimida. De cualquier manera es probable que las pozas de AMPc al igual que la formación de complejos AMPc-CRP disminuyan en forma tal que preferentemente se activaran aquellos operones cuyos sitios de unión por CRP tengan mayor afinidad.



ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

### PERSPECTIVAS

El presente trabajo forma parte del proyecto de investigación que estoy desarrollando para obtener el grado de Maestro en Investigación Biológica Básica con sede en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrogeno (CIFN-UNAM), bajo el asesoramiento del Dr. Miguel Angel Carlos Cevallos Gaos.

Continuando con el desarrollo del proyecto los experimentos a realizar son los siguientes:

En lo referente a la clonación del gen *crp* de *R. etli*

- Subclonar el gen *crp* de *R. etli* a partir del cósmido pJT1096 que complementa a la cepa mutante de *E. coli crp*. Para emplearlo en la generación de una cepa de *R. etli crp*.

En lo referente a la complementación de la mutante *cya*

- Secuenciar el fragmento H1.3 y analizar la secuencia obtenida.
- Mutagenizar el fragmento H1.3.
- Homogenizar en una cepa silvestre de *R. etli* la clona pH1.3 mutagenizada para la generación de una cepa mutante.
- Medir las pozas de AMPc en las cepa de *E. coli* complementadas y en la cepa mutante de *R. etli*.

## REFERENCIAS

- Adhya, S., Gargos, S. (1982). How the Cyclic AMP and its Receptor Protein Act in *Escherichia coli*. *Cell* 29: 287-289.
- Aiba, H., S. Fujimoto, and N. Ozaki. (1982). Molecular cloning and sequencing of the gene for *E. coli* cAMP receptor protein. *Nucleic Acids Res* 10: 1345-1361.
- Aiba, H. (1983). Autoregulation of the *Escherichia coli* *crp* gene: CRP is a transcriptional repressor of its own gene. *Cell* 32: 141-149.
- Alper, M. D., and B. N. Ames. (1978). Transport of antibiotics and metabolites analogs by systems under AMPc control: positive selection of *Salmonella typhimurium* *cya* and *crp* mutants. *J. Bacteriol.* 133: 149-157.
- Anderson, W.B., A.B. Schnoider, M. Emmer, R. L. Perlman and I. Pastan. (1971). Purification of and properties of the cyclic AMP receptor protein which mediates cyclic AMP dependent gene transcription in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 246: 5929-5937.
- Arias, A., Gardiol, A. and Martinez-Drets, G. (1982). Transport and catabolism of D-manosa in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 151:1069-1072.
- Berg, O.G., and P.H. von Hippel. (1988). Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. II. The binding specificity of cAMP receptor protein to recognition sites. *J. Mol. Biol.* 200: 709-723.
- Boesten, B., Kieley, B., O'Reagan, M., Danchin, A. and O'Gara, F. (1988). Genetic analysis of an adenylate cyclase gene from *Rhizobium meliloti* F34, in *Proceedings of the 7th International Congress on Nitrogen Fixation* (Bothe, H., de Bruijn, F. J. and Newton, W. E., eds.). p. 554, Gustav Fisher, Stuttgart, New York.
- Botsford, J. L. (1981). Cyclic nucleotides in procaryotes. *Microbiol. Rev.* 45: 620-642.
- Botsford, J. L., and Harman, J. (1992). Cyclic AMPc in Prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 56: 100-122.
- Boyer, H. W. and Roulland-Dustux, D. (1969) A complementation analysis of restriction and modification in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472
- Catenese, C. A., D. W. Emerich, and V. L. Zahler. (1989). Adenylate cyclase and cAMP phosphodiesterase in *Bradyrhizobium japonicum* bacterioids. *J. Bacteriol.* 171: 4531-4536.

- Chandler, M. S. (1992). The gene encoding cAMP receptor protein is required for competence development in *Haemophilus influenzae* Rd. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1626-1630.
- Collado-Vides, J., Magasanik, B., and J. D. Gralla. (1991). Control site location transcriptional regulation in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 55: 371-394.
- Cossart, P., and B. Gicquel-Sanzey. (1982). Cloning and sequencing of the *cya* gene *Escherichia coli* K12. Nucleic Acids Res. 10: 1363-1378.
- Crothers, D. M., and Steiz, T. A. (1992). Transcriptional activation *Echerichia coli* CAP protein. In Transcriptional Regulation. Mcknight, S. L. and Yakamoto, K. R. (eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 504-534.
- Chamberlin, M. J. (1974). The selectivity of transcription. Annu. Rev. Chem. 43: 721-745.
- Curtis, R., III, and S. M. Kelley. (1987). *Salmonella typhimurium* deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor are avirulent and immunogenic. Infect. Immun. 55: 3035-3043.
- Daniel, J., and A. Danchin. (1979). Involment of Cyclic AMP and Its Receptor Protein in the Sensivity of *Escherichia coli* K12 towards Serine. Molec. Gen. Genet. 176: 343-350.
- Dilworth, M. J., I. McKay, M. Franklin, and A. R. Glenn. (1983). Catabolite effects on enzyme induction and substrate utilization in *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. 129: 359-366.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. and Helinski, D. R. (1980) Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7347-7351.
- Dripps, D., and R. M. Wartell. (1987). DNA bending induced by the catabolite activator protein allows ring formation of a 144 bp DNA. J. Biomol. Struct. Dyn. 5: 1-13.
- Dunlap, V. (1989). Regulation of luminiscence by Cyclic AMP in *cya*-like and *crp*-like Mutants of *Vibrio fischeri*. J. Bactriol. 171: 1199-1202.
- Emmer, M., B. deCrombugghe, I. Pastan and R. Perlam. (1970). Cyclic AMP receptor protein of *E. coli*: its role in the syntesis of inducible enzymes Proc. Natl. Acad. Sci. 66: 480-487.
- Fisher, H. M., (1994). Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia. Microb. Rev. 58: 352-386.
- Friedman M. N., Sharon, R. L., Brown, S. E., Bukelma J. W., and F. M. Ausubel. (1982). Gene 18: 289-296.

- Gottesman, S. (1984). Bacterial regulation: global regulatory networks. *Annu Rev Genet* 18: 415-441.
- Guerinot, M. L., and Chelm, B. K. (1984). Insolation and expression of the *Bradyrhizobium japonicum* adenylate cyclase gene (*cya*) in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 159: 1068-1071.
- Guerinot, M. L., and Chelm, B. K. (1985) Bacterial cAMP and heme in the *Bradyrhizobium japonicum*/soybean symbiosis. in *Nitrogen Fixation Reserch Progres* (Evans, H. J., Bottmley, P. J. and Newton, W. E., eds.), p220. Martinus Nijhoff, Dordrecht.
- Hanamura, A., Aiba, H. (1991). *Nucleic Acids Res.* 19: 4413-4419.
- Hengge-Aronis, R. (1993). Survival of hunger and Stress: The role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell* 72: 165-168.
- Heyduk, T. and J. C. Lee. (1989). *Escherichia coli* cAMP receptor protein: Evidence for three protein conformational states with diferent promoter affinities. *Biochemistry* 28: 6914-6924.
- Holtje, J. V., and N. Nanninga. (1994). The intracellular concentration of cyclic adenosin 3',5'-monophosphate is constant throughout the cell cycle of *Escherichia coli*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 22: 189-192.
- Hughes, P., Landoulsi, A., Kohtyama, M. (1988). *Cell* 55: 343-350.
- Kiely, B., and O'Gara, F. (1983). Cyclic 3'-5' adenosin monophosphate synthesis in *Rhizobium*: indentification of a cloned sequence from *Rhizobium meliloti* coding for adenyl cyclase. *Mol Gen Genet* 192: 230-234.
- Koch, J. P., S. Hayashi, and E. C. C. Lin. (1964) The control of dissimilation of glycerol and L  $\alpha$ -glycerophosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 125: 545-555.
- Kypr, J., and J. Mrazek. (1985). Possible mechanism of the allosteric activation of cAMP receptor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131: 780-785.
- Kutsukake, K., Y. Ohya, and T. Lino. (1990). Transcriptional analysis of flagelar region of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 172: 741-747.
- Lim, S.T., and K. T. Shanmugam. (1979). Regulation of hydrogen utilization in *Rhizobium japonicum* by cyclic AMP. *Biochim. Biophys. Acta* 584 479-492.
- Magazanik, B., and Neidhard, F. (1987). Regulation of carbono and nitrogen utilization. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, Neidhardt, F. (ed). Washington, D.C.: American Society for Microbiology. pp. 1318-1325.

- Mandal, N. C., and Chakrabartty, P. K. (1993). Succinate mediated catabolite repression of enzymes of gluconate. Metabolism in root nodule bacteria. *Current Microbiol.* 26: 247-25.
- Mandal, N. C., and Chakrabartty, P. K. (1993). Regulation of enzymes of glyoxylate pathway in root nodule bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 38: 417-427.
- Manian, S. S., Gumbleton, R. and O'Gara, F. (1982). The role of formate metabolism in nitrogen fixation in *Rhizobium* spp. *Arch. Microbiol.* 133: 312-317.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. Sambrook, J. (1989). : Molecular Cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Magazanik, B. (1961). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26: 249-256.
- Matin, A., (1991). The molecular basis of carbon-starvation-induced general resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5: 3-10.
- McKay, D.B. , I. T. Weber, and T.A. Steltz. (1982). Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution: incorporation of amino acid sequence and interactions with cAMP. *J. Biol. Chem.* 257: 9518-9524.
- McGetrick, A. M., C. F. Goulding, S. M. Sudaram, and F. O'Gara. (1985 A). Catabolite repression and role of cyclic AMP in CO<sub>2</sub> fixation and H<sub>2</sub> metabolism in *Rhizobium* spp. *J. Bacteriol.* 163: 1282-1284.
- McGetrick, A. M., O'Regan, M., and O'Gara, F. (1985 B). Expression and regulation of lactose transposon Tn951 in *Rhizobium* spp. *FEMS Microbiol Letts* 29: 27-33.
- Musso, R., Dilauro, R., Adhya, S., de Combrugghe, B. (1977). *Cell* 12: 847-854.
- Neidhardt, F. C., J. L. Ingraham, and M. Schaechter. (1990). Regulation of gene expression: Multigene Systems and Global Regulation. In *Physiology of the Bacterial cell.* (ed) SINAUER, pp. 351-385.
- O'Regan, M., Kiely, B. and O'Gara F. (1989). Expression of the adenyl cyclase encoding gene *cya* of *Rhizobium meliloti* F43: existence of two *cya* genes? *Gene* 83: 243-249.
- Peterkofsky, A., Retzer, A., Retzer, J., Gollop, N. and N. Amin. (1993). Bacterial Adenyl Cyclases. *Prog. Nuc. Ac. Res. Mol. Biol.* 44: 31-65.
- Pinkey, M., and J. G. Hogget. (1988). Binding of the cyclic AMP receptor protein in *Escherichia coli* to RNA polymerase. *Biochem. J.* 250: 897-902.
- Richert, E., Vidal-Ingilardi, D., Raibaud, O (1991). *Cell* 66: 1185-1195.

- Rohm, M. and Wernwr, D. (1985). Regulation of the  $\beta$ -ketoacid pathway in *Rhizobium japonicum* and bacterios by succinate. Arch. Microbiol. 140: 375-379.
- Roy, A., C. Haziza, and A. Danchin. (1983). Regulation of adenylate cyclase synthesis in *Escherichia coli*; nucleotide sequence of the control region. EMBO J. 2: 791-797.
- Roy, A., and A. Danchin. (1982). The *cya* locus of *Escherichia coli* K12 organization and gene products. Mol. Gen. Genet. 188: 465-471.
- Russell, L., and H. Yamazaki. (1978). The dependence of *Escherichia coli* asparaginase II on cyclic AMP and CRP. Can. J. Microbiol. 24: 629-631.
- Saier, M. H., jr. (1989). Protein phosphorylation and allosteric control of inducer exclusion and catabolite repression by the bacteria phosphoenol pyruvate: sugar phosphotransferase system. Microbiol. Rev. 53: 109-1
- Saier, M. H., jr. (1991). A multiplicity of potential carbon catabolite repression mechanisms in prokaryotic and eukaryotic microorganisms. The News Biologist. 12: 1137-1147.
- Sauborin, D., and J. Beckwith. (1975) Deletion of *Escherichia coli* *crp* Gene. J. Bacteriol. 122: 338-340.
- Simpson, F. B., Maier, R. J. and Evans, H. J. (1979). Hydrogen stimulated CO<sub>2</sub> fixation and coordinate induction of hydrogenase and ribulose biphosphate carboxylase in a H<sub>2</sub> uptake positive strain of *Rhizobium japonicum*. Arch. Microbiol. 123: 1-8.
- Schultz, E. J., G. I. Latter, and A. Matin. (1988). Differential Regulation by Cyclic AMP of Starvation Protein Synthesis in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 170: 3903-3909.
- Schultz, S.C., G.C. Shields, and T. A. Steitz. (1990). Crystallization of *E. coli* catabolite gene activator protein with its DNA binding site. J. Mol. Biol. 213: 159-166.
- Schwartz, M. (1987). The Maltose regulon. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology (Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magazanik, B., Schaechter, M. and Umberger, H. E., eds), pp. 1482-1502, American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Shah, S., and A. Peterkofsky. (1991). Characterization and Generation of *Escherichia coli* Adenylate Cyclase Deletion Mutants. J. Bacteriol. 173: 3238-3242.

- Siegele, D. A., and R. Kolter. (1992). Life After Long. *J. Bacteriol.* 174: 345-348.
- Sogard-Andersen, L., Martinussen, J., Mollegaard, N. E., Douth-Waite, S. R., Valentin-Hensen, P. K., (1990). *J. Bacteriol.* 173: 5706-5713.
- Steitz, T. A., D. H. Ohlendorf, D. B. McKay, W. F. Anderson, and B. W. Mathews. (1982). Structural similarity in the DNA binding domains of catabolite gene activator and Cro repressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 3097-3100.
- Stowers, M. D. and Elkan, G. H. (1985). Regulation of hexose catabolism in *Rhizobium* sp.32H1. *FEMS Microbiol. Lett.* 26: 45-48.
- Stratage. (1990) Stratage cloning systems: Product Catalog . 208 pp.
- Ucker, D. S., and E. R. Singer. (1978). Catabolite repression like phenomena in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 126: 1197-1200.
- Uden, G., Guest, J. R. (1984) *FEBS Lett.* 170: 321-325.
- Upchurch, R. G., and G. H. Elkan. (1978). The role of ammonia, L-glutamate, and cAMP in the regulation of ammonia assimilation in *Rhizobium japonicum*. *Biochem. Biophys. Acta* 538: 244-249
- Uzan, M., Danchin, A. (1976). A rapid test for the *relA*<sup>-</sup> mutation in *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69: 751-758.
- Wang, Y. P., Giblin, L., Boesten, B., and O'Gara, F. (1993). The *Escherichia coli* cAMP receptor protein (CRP) represses the *Rhizobium meliloti* *dctA* promoter in a cAMP dependent fashion. *Mol. Microbiology* 8: 253-259
- Weber, I. T., K. Tokio, K. Titani and T. A. Steitz. (1987). Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 198: 311-327.
- Winkler, H. H., (1970). Compartmentation in the induction of the hexosa-6-phosphate transport system *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 101: 470-475.
- Woodcock, D. M. et al. (1989), *Nucleic Acids Res.* 16: 1563-1575.
- Zinkel, S.S. and D.M. Crothers.(1991). Catabolite activator protein-induced DNA bending in transcription initiation. *J. Mol. Biol.* 209: 201-215.
- Zubay, G., D. Schwartz, and J. Beckwith. (1970). Mechanism of activation of catabolite sensitive genes: a positive control system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 66: 104-110.

## APÉNDICES

### Apéndice 1 LB

Peptona de Caseína	10 gr
Extracto de Levadura	5 gr
NaCl	10 gr
Agua c.b.p.	1000 ml
(Sólido: Agar bacteriológico 15 gr)	

### Apéndice 2 M9

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 gr
NaCl	0.5 gr
NH <sub>4</sub> Cl	1 gr
Agar	15 gr
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (1M)	1 ml
*Glucosa 20% (w/v)	10 ml
Agua c.b.p.	1000 ml
** Tiamina 1 mg/ml	1ml

(Sólido: Agar bacteriológico 15 gr)

\* La glucosa puede ser sustituida por la fuente de carbono deseada en la misma concentración.

\*\* la tiamina (estéril por filtración ) se adiciona después de autoclavar.

### Apéndice 3 Agar MacConkey

Peptona de Caseína	17 gr
Sales Biliares	1.5 gr
NaCl	5 gr
Rojo Neutro	0.03 gr
Cristal Violeta	0.001 gr
Agar Bacteriológico	13..5 gr
Agua c.b.p.	1000 ml



**Apéndice 3 Buffer TE (50:20)**

Tris-HCl (pH 8)	2 M	2.5 ml
EDTA	0.5 M	4 ml
Agua		93.5 ml

**Apéndice 4 Solución I**

Glucosa	0.5 M	10 ml
EDTA	0.5 M	2 ml
Tris- HCl (pH 8)	2 M	1.2 ml
Agua		86.7 ml

**Apéndice 5 Solución II**

-NaOH	10 N	2 ml
SDS	20 % (w/v)	5 ml
Agua		93 ml

**Apéndice 6 Solución III**

Ac. de Potasio	5 M	60 ml
Agua		40 ml