

03062 9
26



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES
Y DE POSGRADO DEL C.C.H.

EL CATABOLISMO DE LA ASPARAGINA
EN Rhizobium etli Y SU RELACION CON
LA FIJACION DE NITROGENO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
PRESENTA LA
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
MARIA ALEJANDRA HUERTA ZEPEDA

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
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.

**EI PRESENTE TRABAJO SE LLEVO A CABO EN EL DEPARTAMENTO DE
BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

**Bajo la dirección del
Dr. Jorge F. Calderón Jiménez**

**Durante el desarrollo de este trabajo fui apoyada económicamente por el
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con una beca de Maestría**

AGRADECIMIENTOS

**Al Dr. David Romero, al Dr. Carlos Huitrón, y al Dr. Jorge Calderón
por su participación en mi comité tutorial**

**Al Dr. Jesús Aguirre L., al Dr. Jorge Calderón J., a la Dra. Imelda López V., al Dr. David
Romero C., Dr. Luis Servín G. por las observaciones realizadas a este trabajo**

A mis padres Federico y Juanita y a mis hermanas Gaby, Carmen y Rocio

**A Alejandro, Amaranta, Elia, Gisela, Luis, Rocio y Soconro,
por el apoyo que me brindaron**

A todos aquellos que participaron en mi formación profesional

LA CIENCIA EL SUBLIME
SENTIMIENTO DE LA BUSQUEDA

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
OBJETIVOS.....	16
METODOS.....	17
RESULTADOS.....	37
DISCUSION.....	67
CONCLUSIONES.....	72
REFERENCIAS.....	75

ANEXO

Carta de aceptación del artículo:

Asparagine degradation in <i>Rhizobium etli</i>.....	81
---	-----------

Carta de recepción del artículo:

Isolation and Characterization of a <i>Rhizobium etli</i> mutants altered in the degradation of asparagine.....	82
--	-----------

RESUMEN

Hemos determinado las enzimas que participan en la degradación de la asparagina en *Rhizobium elli* y estudiado la regulación de las siguiente enzimas: asparaginasa, aspartasa y aspartato aminotransferasa. Los estudios sobre la regulación de la asparaginasa muestran que esta enzima es inducida por asparagina y reprimida por la fuente de carbono. Los estudios sobre la regulación de la aspartasa muestran que esta enzima también es inducida por asparagina y reprimida por la fuente de carbono así como por amonio. El aspartato no actúa como inductor de esta enzima. Los niveles de la aspartato aminotransferasa fueron constitutivos.

Hemos encontrado que en bacteroides de *R. elli* se encuentran elevadas las actividades de asparaginasa y aspartasa lo que sugiere que estas enzimas pueden jugar un papel importante en la degradación de la asparagina a esqueletos de carbono durante la simbiosis.

Para conocer el papel fisiológico de la degradación de la asparagina hemos obtenido y caracterizado tres mutantes de *R. elli* que son incapaces de crecer en asparagina como fuente de carbono y nitrógeno y crecen bien en otras fuentes de carbono y nitrógeno. La mutante AHZ1 presenta actividad de asparaginasa, muy baja actividad de aspartasa y tiene pozas altas de aspartato cuando se crece en asparagina con o sin succinato, con respecto a la cepa silvestre. Las mutantes AHZ4 y AHZ7 presentan muy baja actividad de asparaginasa, y aspartasa, y tienen pozas altas de asparagina y aspartato cuando crecen en asparagina con o sin succinato en comparación con la cepa silvestre. Estos resultados nos sugieren que la mutante AHZ1 está alterada en la degradación del aspartato y que las

mutantes AHZ4 y AHZ7 tienen una mutación la cual altera la actividad de la asparaginasa y la aspartasa. La actividad residual de la asparaginasa y las pozas altas de ácido aspártico en las mutantes AHZ4 y AHZ7 nos sugiere la presencia de dos asparaginastas.

Para conocer si la actividad residual de la asparaginasa en la mutante AHZ4 y AHZ7 eran debido a otra isoenzima de la asparaginasa se determinó la termosensibilidad de la asparaginasa en la cepa silvestre y en nuestras mutantes. En la cepa silvestre la asparaginasa que se induce por su sustrato es termolábil mientras que la que se encuentra en las mutantes AHZ7 es termoestable, lo que indica que las mutantes están alteradas en la asparaginasa termolábil y que existe otra asparaginasa que se distingue por ser termoestable.

Hemos clonado un fragmento de DNA que complementa tanto a la mutante AHZ1, como a las mutantes AHZ4 y AHZ7. El hecho de que las mutantes AHZ4 y AHZ7 están alteradas tanto en la actividad de la asparaginasa como en la actividad de la aspartasa, así como el hecho de que el mismo plásmido complementa a todas las mutantes AHZ nos sugiere que la asparaginasa y aspartasa se encuentran formando parte de un operón.

Las mutantes AHZ1, AHZ4 y AHZ7 nodulan y fijan nitrógeno de manera similar a la cepa silvestre, posiblemente la otra asparaginasa encontrada y la aspartato aminotransferasa compensa el bloqueo en la asparaginasa y aspartasa.

INTRODUCCION

En algunos microorganismos la asparagina puede ser utilizada como fuente de carbono y nitrógeno a través de la acción de la asparaginasa y de la aspartasa (Sun & Setlow, 1993). La asparaginasa cataliza la hidrólisis de asparagina a aspartato (asp) y amonio. La aspartasa cataliza la desaminación reversible del aspartato a fumarato (fum) y amonio. En *Rhizobium melioli* se ha encontrado que la aspartato aminotransferasa participa en la degradación de aspartato a esqueletos de carbono. Esta enzima cataliza la transaminación reversible entre aspartato y 2- oxoglutarato a oxalacetato y glutamato. En *Escherichia coli* la síntesis de asparagina puede ser catalizada por dos enzimas: la asparagino sintetasa I, que sintetiza asparagina a partir de aspartato, ATP y amonio y la asparagino sintetasa II que sintetiza asparagina a partir de aspartato, ATP y glutamina (Humbert & Simoni 1980).

Asparaginasa



Aspartasa



Aspartato aminotransferasa



Asparagino sintetasa



Asparagino sintetasa



Asparaginasa

El estudio de la asparaginasa en diferentes microorganismos ha sido motivo de gran atención por su alto potencial clínico. La asparaginasa es utilizada como tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda, (Broome, 1967; Cedar & Schwartz, 1967; Wade, 1980). La actividad antineoplásica resulta de la depleción de los depósitos de asparagina de la circulación sanguínea por la asparaginasa, ya que las células cancerosas requieren de este aminoácido para crecer. Esta enzima inhibe el 98% de la proliferación de linfocitos (Chuang, 1990). A pesar de la amplia distribución de las asparaginasas, solamente las enzimas de tres microorganismos han sido estudiadas para este fin, la de *E. coli*, *Erwinia carotovora* y *Proteus vulgaris*. (Howard, J & Carpenter, F 1972; Sinha *et al.*, 1991; Cedar & Schwartz, 1967). La asparaginasa de *E. carotovora* también es farmacológicamente activa y posee diferente especificidad inmunológica (Bascomb, 1976) por lo que no produce una reacción cruzada con la enzima de *E. coli* y por eso ha sido usada en pacientes que han desarrollado hipersensibilidad a la asparaginasa de *E. coli* (Asselin *et al.*, 1993).

La actividad de la asparaginasa se ha estudiado tanto en microorganismos Gram positivos como Gram negativos. Entre estos últimos se ha encontrado que *E. coli* tiene dos asparaginasas (Cedar & Schwartz, 1967). La asparaginasa I se localiza en el citoplasma, es producida constitutivamente, tiene una baja afinidad por su sustrato, es termosensible y se inhibe con 5 diazo 4 oxo 2 norvaline (DONV) (Del Casale, 1983; Chesney, 1985; Jerlström *et al.*, 1989; Willis & Woolfolk, 1974). La asparaginasa II se encuentra en el periplasma, tiene una alta afinidad por su sustrato, se regula positivamente por anaerobiosis a través del producto del gene *fnr* y es dependiente de la proteína aceptora de cAMP (CAP) (Cedar & Schwartz, 1967; Chesney, 1983; Jerlström *et al.*, 1987; Russell & Yamasaki, 1978; Jennings & Beachman, 1993). Se ha secuenciado el gene *ansA* que codifica para la asparaginasa I y

ha sido purificada esta enzima (Ho, 1970). El gene *ansB*, que codifica para la asparaginasa II ha sido clonado y secuenciado (Bonthonron, 1990). Se ha purificado (Harms *et al.*, 1991), y se ha determinado la estructura cuaternaria de esta última proteína (Swain *et al.*, 1993).

En *Salmonella enterica*, que es un organismo muy relacionado a *E. coli*, la asparaginasa II se regula por la proteína aceptora de cAMP y por anaerobiosis. El gene *ansB* de *S. enterica* fue clonado y la región del promotor secuenciada (Jennings & Beachman, 1993). La comparación de las secuencias de este microorganismo y de *E. coli* reveló que los elementos regulatorios del promotor de *ansB* de *E. coli* están altamente conservados en *S. enterica*. Sin embargo, la expresión del gene *ansB* de *E. coli* y *S. enterica* es fundamentalmente diferente con respecto a los mecanismos de regulación por oxígeno; el gene de *E. coli* es dependiente del activador transcripcional FNR, mientras que en *S. enterica* es esencialmente independiente (Jennings *et al.*, 1993). La comparación de las regiones de los promotores de estos genes mostró un sitio único de inicio de transcripción y dos sitios regulatorios. En *E. coli* se conoce que la proteína FNR se une hacia abajo del sitio FNR para iniciar la transcripción a bajos niveles. Estos niveles se ven aumentados cuando CRP se une al sitio de unión CF (sitio híbrido CRP-FNR) resultando una regulación co-dependiente por CRP y FNR (Jennings & Beachman, 1993; Jennings *et al.*, 1993). Los mecanismos de regulación por oxígeno del gene *ansB* en *S. enterica* todavía no se aclaran totalmente. Una posibilidad podría ser debida a los cambios de super-enrollamiento del DNA (Higgins *et al.*, 1990), tales cambios quizá alteren la estructura del complejo cAMP-CRP que es requerido para la transcripción. Otra posibilidad podrían ser las variaciones en la concentración de cAMP durante el crecimiento anaeróbico (Unden & Duchene, 1987). Aún no se conoce exactamente el papel de la asparaginasa II en *E. coli* y

S. enterica, sin embargo se sugiere que la utilización de la asparagina provee fumarato como último aceptor de electrones durante la respiración anaeróbica (Jennings *et al.*, 1993).

Los estudios sobre la regulación de la asparaginasa en *Erwinia chrysanthemi* indican que la síntesis de esta proteína es reprimida por glucosa y glicerol. Su actividad no es alterada por ninguna fuente de nitrógeno, aún aspartato (Callow *et al.*, 1971; Gilbert *et al.*, 1986); la forma activa de esta enzima es un dímero (Miller *et al.*, 1993).

En *Vibrio proteus* la asparaginasa es inducida por su sustrato y se regula por la presencia de oxígeno y de lactato en el medio de cultivo (Sinha *et al.*, 1991). En *Serratia marcescens* la asparaginasa se induce por su sustrato asparagina (Khan *et al.*, 1970) mientras que *Pseudomonas sp.* requiere de asparagina y aspártico bajo condiciones aeróbicas para que se induzca esta enzima (Nikolaev *et al.*, 1969).

En *Bacillus sp.* que es un microorganismo Gram positivo, la asparaginasa está sujeta a represión catabólica por nitrógeno y tiene baja afinidad por su sustrato (55 mM). En esta bacteria no hay evidencias de un sistema global de regulación de nitrógeno análogo al sistema Ntr que se encuentra en bacterias Gram negativas (Atkinson *et al.*, 1991; Sonenshein, 1989). Se ha encontrado que en *Bacillus subtilis* los genes de la asparaginasa y de la aspartasa se encuentran en un operón; esto no es sorprendente puesto que existe una relación funcional ya que el producto de la asparaginasa es el sustrato de la aspartasa. La transcripción de los genes *ansA* y *ansB* como parte de un operón debe de facilitar la coordinación de las dos actividades y así lograr un balance entre los niveles de aspartato y asparagina en la bacteria para utilizar la asparagina como fuente de carbono (Dongxu & Setlow, 1991). Sin embargo en *E. coli* los genes *ansA*, *ansB* y *aspA* los cuales codifican para asparaginasa I, asparaginasa II y aspartasa respectivamente están localizados en cistrones separados (Jennings *et al.*, 1990, Jertström *et al.*, 1989). Parece que *B. subtilis*

tiene solamente una asparaginasa, ya que no puede detectarse actividad de asparaginasa en cepas con el gene *ansA* interrumpido y estas mutantes no pueden crecer en asparagina como única fuente de nitrógeno (Dongxu & Setlow, 1991). En *Staphylococcus aureus* la asparaginasa se regula por cAMP (Rozalska & Mikucki, 1992; Resnick & Magasanik, 1976; Sobis & Mikucki, 1991).

Aspartasa

La aspartasa es utilizada industrialmente para sintetizar aspartato a partir de fumarato y amonio. El aspartato es ampliamente utilizado en la industria farmacéutica y alimenticia, es utilizado para sintetizar aspartamen el cual es un dipéptido: L-aspartil L-fenilalanina metil ester, con propiedades dulcorantes bajo en calorías. El aspartamen es cerca de 200 veces más dulce que la sacarosa (Cheetham, 1985; Tewari, 1990).

La aspartasa de *E. coli* está compuesta de 4 subunidades idénticas con un peso molecular de 52,224 (Takagi, 1985; Tokushige, 1985), de manera interesante el aspartato actúa no solamente como un sustrato, sino también actúa como un activador de la enzima. La reacción de aminación de fumarato es acelerada por la adición de aspartato (Karsten & Viola, 1991). El aspartato parece tener una alta afinidad por el sitio activador, el cual es diferente del sitio catalítico, y la activación solamente se observa en un pH alcalino (Karsten & Viola, 1991). También se ha demostrado que la actividad de la aspartasa a un pH alto requiere del activador (aspartato) y un co-factor (Mg^{2+}) para que sea plenamente activada y a un pH bajo es insensible a estos efectores (Karsten & Viola, 1991). La aspartasa es regulada por la proteína receptora de cAMP y por anaerobiosis por la vía del producto del gene *fnr* (Jenstrom *et al.*, 1987). El gene *aspA* que codifica a la aspartasa de *E. coli* ha sido clonado y secuenciado, codifica a una proteína de 477 aminoácidos (Takagi *et al.*, 1985).

La aspartasa de *Pseudomonas fluorescens* es nutricionalmente inducida por casaminoácidos y su actividad casi no se ve afectada cuando se crece en glucosa (Miyamoto & Katsuki, 1992). El gene de la aspartasa *aspA* de *P. fluorescens* ha sido clonado y secuenciado (Takagi *et al.*, 1984), esta enzima tiene cuatro subunidades idénticas con un peso molecular de 50,859. La aspartasa de *P. fluorescens* tiene propiedades cinéticas similares a la enzima de *E. coli* y también es activada por el aspartato (Tokushige, 1985). Ambas enzimas tienen un sitio catalítico y mecanismos regulatorios similares, la secuencia de aminoácidos de la aspartasa de este microorganismo presenta un 56.3% de similitud con la enzima de *E. coli* (Takagi *et al.*, 1985). En *P. fluorescens* se sabe que la aspartasa funciona en ambas direcciones dependiendo de las condiciones de las dos glutamato deshidrogenasas (Tokushige *et al.*, 1979).

Aspartato Aminotransferasa

Se ha reportado una mutante de *R. meliloti* alterada en la actividad de la aspartato amino transferasa incapaz de crecer en aspartato y capaz de crecer bien en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. Su mutación como consecuencia causa la incapacidad de fijar nitrógeno en los nódulos formados en alfalfa, lo que nos sugiere que el aspartato es un sustrato esencial para la bacteria durante la simbiosis. Se ha demostrado que en *R. meliloti* el aspartato al igual que el succinato, fumarato y malato requiere del sistema de transporte de los ácidos dicarboxílicos para ser transportados. En esta mutante se encontró que su sistema de transporte era normal y que estaba alterada en la actividad de la aspartato aminotransferasa (Rastogi & Watson, 1991; Watson & Rastogi, 1993).

En *R. meliloti* se han clonado y secuenciado dos genes que codifican para la aspartato aminotransferasa, conocidos como los genes *aatA* y *tatA* (Watson & Rastogi,

1993; Gantt, J., *et al.*, 1992). La secuencia del gene *tatA*, reveló que codifica para una proteína homóloga a una aminotransferasa aromática de *E. coli* y a la mayoría de las aspartato aminotransferasas conocidas. La secuencia del gene *aatA* reveló dos ORF (*Open Reading Frame*, marco de lectura abierta) y ninguno de los cuales codificaba una enzima con homología típica de las aspartato aminotransferasa. Se realizó una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para obtener una secuencia candidata subclonada. El fragmento clonado complementó la alteración del catabolismo del aspartato y la fijación de nitrógeno original de la mutante. Esto demuestra que codifica para una aspartato aminotransferasa con las propiedades esperadas. El análisis de la secuencia muestra que el producto del *aat* tiene homología con la aspartato aminotransferasa para una bacteria termoacidófilica, la *Sulfolobus solfataricus* y para una enzima similar en una especie termofílica de *Bacillus* y de la tirosina aminotransferasa eucariótica. El DNA homólogo al gene *aatA* se ha encontrado presente en *Agrobacterium tumefaciens* y otras *rhizobia* pero no en *Klebsiella pneumoniae* ó *E. coli* (Watson & Rastogi 1993).

En *Saccharomyces cerevisiae* se ha reportado la secuencia de la aspartato aminotransferasa. La secuencia de la enzima de esta levadura y la de *E. coli* han sido determinadas y parecen estar igualmente relacionadas con aquellas enzimas citosólicas y mitocondriales de los eucariotes en un 40 % de similitud, sin embargo estas isoenzimas son muy diferentes a las aspartato aminotransferasas de las bacterias termoacidófilicas (Cronin *et al.*, 1991).

Asparagino Sintetasa

El gene de la asparagino sintetasa ha sido clonado de una gran variedad de organismos: bacterias, plantas, hongos y también la asparagino sintetasa del hombre (Humbert & Simoni, 1980; Ta *et al.*, 1989; Scofield *et al.*, 1990).

En *E. coli* se han encontrado dos asparagino sintetases, en donde los genes que codifican para la asparagino sintetasa (*asnA* dependiente de amonio y *asnB* dependiente de glutamina) están localizados en dos diferentes sitios del cromosoma. El producto del gene *asnA* tiene una alta afinidad por el amonio, y el producto del gene *asnB* es capaz de utilizar glutamina o amonio como un donador de nitrógeno. También se distinguen por que el producto del gene *asnB* la asparagino sintetasa II es más lábil a temperaturas bajas y tiene mayor estabilidad a altas temperaturas y el producto del gene *asnA*, la asparagino sintetasa I es termoestable a 37°C pero a 45°C se inactiva en menos de un minuto. Ambas asparagino sintetases utilizan aspartato y ATP como sustratos (Cedar & Schwartz, 1969 a, b; Humbert & Simoni, 1980).

Se ha estudiado la asparagino sintetasa en los nódulos de alfalfa, la cual se localiza en el citoplasma. La actividad de la asparagino sintetasa aumenta en paralelo con la glutamina sintetasa y la cantidad de nitrógeno orgánico en los nódulos durante su desarrollo. Los máximos niveles de esta enzima se encontraron a las tres semanas siguientes de la inoculación con *R. meliloti* (Ta *et al.*, 1989). En los nódulos de lupinus se ha encontrado que la actividad de asparagino sintetasa de la planta se induce durante el desarrollo del nódulo, en el xilema de lupinus el aminoácido más abundante es la asparagina y este aminoácido aumenta durante la fijación de nitrógeno y en los bacteroides de *Rhizobium lupini* se encuentra elevada la actividad de la asparaginasa (Scott, D.B., 1979).

Simbiosis *Rhizobium*-Leguminosas

El continuo agotamiento de las fuentes de nitrógeno del suelo, y el aumento en la demanda de alimentos ha propiciado el uso creciente de fertilizantes químicos, lo cual presenta varios inconvenientes tanto económicos como ecológicos (Delwiche, 1970; Delwiche, 1981), por lo que existe un gran interés en concentrar la atención en el estudio de la fijación biológica de nitrógeno como una alternativa para el incremento y mejoramiento de la producción agrícola, con menores costos y problemas de contaminación.

Las bacterias del género *Rhizobium* fijan nitrógeno en simbiosis con las leguminosas. Durante la simbiosis, la planta sufre de productos fotosintéticos a los bacteroides, que son utilizados para obtener energía y reducir el nitrógeno atmosférico. El amonio producido es liberado por los bacteroides y utilizado por la planta. La fijación de nitrógeno por *Rhizobium* se lleva a cabo en los nódulos que se forman en la raíz de la leguminosa. En este proceso *Rhizobium* es quimiotácticamente atraído hacia las raíces de la planta, debido probablemente a compuestos específicos producidos por la planta. La planta libera ciertas sustancias llamadas flavonoides que inducen a que el producto de los genes *nod* participan en la síntesis de un compuesto que provoca que los pelos de la raíz se enrollen (Bergman *et al.*, 1988; Caetano-Anolles, 1988). Al interactuar con la superficie de la raíz, la bacteria altera el crecimiento de las raíces, de tal manera que éstas crecen deformes e incluso en espiral (Yao *et al.* 1969; Dazzo & Gardiol, 1984); mientras esto pasa, las células de la corteza de la raíz bajo la epidermis empiezan a dividirse (Libbenga & Harkes, 1973; Newcomb, 1981). Las bacterias atrapadas en el espiral de los pelos de la raíz o entre los pelos de la raíz y otra célula, proliferan y empiezan a infectar las células superficiales de la planta, (Libbenga & Harkes, 1973; Newcomb, 1981; Callahan & Torrey, 1981). Mientras tanto, las células de la planta invadida son estimuladas a producir una envoltura de pared celular

llamada hilo de infección." La división de las células de la raíz establecen el cuerpo del nódulo, los hilos de infección se ramifican y penetran algunas células del nódulo. Las bacterias son liberadas al citoplasma de las células de la raíz y envueltas en la membrana plasmática de la planta (Robertson *et al.*, 1978), las bacterias se diferencian a bacteroides y empieza la fijación de nitrógeno y el intercambio metabólico (Sutton *et al.*, 1981; Verma & Long, 1983). La planta supe de productos fotosintéticos a los bacteroides que los utilizan para obtener energía y reducir el nitrógeno. El amonio producido por los bacteroides es liberado y utilizado por la planta.

La nitrógenasa es el complejo enzimático que cataliza la reducción de nitrógeno atmosférico a amonio. Para que la fijación de nitrógeno se lleve a cabo es necesaria la expresión de los genes de fijación de nitrógeno *nif* y *fix* (Schetgens *et al.*, 1987; Earl *et al.*, 1987).

El producto final de la fijación de nitrógeno es amonio, existen varias evidencias que indican que la asimilación de amonio se lleva a cabo principalmente por la planta. Así, las actividades de las enzimas de asimilación de amonio son bajas en el bacteroide, mientras que en el citoplasma de la planta estas actividades son muy altas (Brown & Dilworth 1975).

Durante la interacción rhizobium-leguminosa se establece una cooperación metabólica, en la cual el bacteroide reduce nitrógeno molecular a amonio y lo exporta a la planta mientras que la planta provee de compuestos de carbono al bacteroide.

La naturaleza de la fuente de carbono que proporciona la planta a los bacteroides durante la simbiosis ha sido una de las mayores preguntas en la investigación en este campo, debido a que el abastecimiento de la fuente de carbono limita la fijación de nitrógeno. Originalmente se propuso que estos compuestos eran azúcares, pero éstos no son transportados ni oxidados por los bacteroides (Dilworth & Glenn, 1984). Los ácidos dicarboxílicos succinato, fumarato y malato han sido considerados la fuente principal de

carbono y energía que le proporciona la planta a los bacteroides (Dilworth & Glenn, 1984; Stowers, M., 1985). Así, las enzimas requeridas para la función del ciclo de los ácidos tricarbóxicos son necesarias para el metabolismo de los bacteroides que fijan nitrógeno (Gardiol *et al.*, 1982).

Las mutantes en el gene *dctA*, que codifica la proteína estructural para el transporte de los ácidos dicarbóxicos encontrada en la membrana, causa la formación de nódulos que son incapaces de fijar nitrógeno, demostrando que los ácidos dicarbóxicos son un sustrato esencial para la bacteria durante la simbiosis (Ronson, C.W., *et al* 1984). Cepas mutadas en *dctB* y *dctD*, que son genes regulatorios que controlan la inducción del gene *dctA*, tienen una capacidad parcial de fijar nitrógeno, a pesar de su incapacidad para transportar los ácidos dicarbóxicos en vida libre. Esto todavía no está claro aunque es posible que otros genes diferentes de *dctB* y *dctD* puedan servir para inducir *dctA* en el estado simbiótico (Watson, 1990; Yarosh *et al.*, 1989; Arwas *et al.*, 1985; Finan *et al.*, 1983; Ronson *et al.*, 1984; Ronson *et al.*, 1981).

Existen evidencias de que los aminoácidos puede tener un papel importante como fuente de carbono y energía para la fijación de nitrógeno (Kahn *et al.*, 1983; O'Gara, 1976; Tubb, 1976; Salminen & Streeter, 1987). Como ya se mencionó anteriormente se ha aislado una mutante en *R. meliloti* incapaz de crecer en aspartato como fuente de carbono y nitrógeno que presenta una disminución en la actividad de aspartato aminotransferasa y no fija nitrógeno. La concentración de aspartato aminotransferasa se encuentra alta tanto en la planta como en el nódulo, en relación con aquellas enzimas necesarias para la asimilación de amonio. Aunque la aspartato aminotransferasa se considera generalmente importante en la conversión del amonio producido por la fijación de nitrógeno a asparagina para ser transportado al resto de la planta (Vance & Heichel, 1991), se ha propuesto que uno de los

papeles de esta enzima en los nódulos de la planta podría ser producir aspartato para el catabolismo de la bacteria (Alfano & Kahn, 1993). Este catabolismo podría ser por una vía directa o por una vía más compleja como el intercambio entre malato-aspartato encontrado en las mitocondrias (Appels & Haaker, 1991; Kahn *et al.*, 1983).

Se ha encontrado que la asparagina aporta el 30% y 70% del nitrógeno orgánico soluble total en la raíz y en el tejido de los nódulos respectivamente; Es uno de los compuestos utilizados por la planta para transportar el nitrógeno de las raíces a las hojas. Se ha mostrado que en los nódulos de lupinus, la actividad de asparagino sintetasa de la planta se induce durante el desarrollo del nódulo mientras que la actividad de la asparaginasa de la planta disminuye (Scott, 1979). En el xilema el aminoácido más abundante es la asparagina y aumenta durante la fijación de nitrógeno.

Nosotros estamos interesados en conocer como se regula la concentración intracelular de los aminoácidos. En *R. etli* se ha demostrado que la concentración de la glutamina intracelular es el resultado de su síntesis y degradación (Durán & Calderón 1995). Estamos interesados en estudiar en *R. etli* la degradación de la asparagina. Si la concentración intracelular de este aminoácido es regulada tanto por su síntesis como por su degradación. También estamos interesados en conocer el papel de la degradación de la asparagina en *R. etli* durante la simbiosis ya que estudios previos realizados con esta bacteria muestran que la actividad de la asparaginasa se encuentra elevada en los bacteroides y que *R. etli* crece optimamente en asparagina como fuente de carbono y nitrógeno y no crece en aspartato como fuente de carbono y nitrógeno.

Para conocer el papel de la degradación de la asparagina en *R. etli* hemos determinado las enzimas que pueden participar en su degradación y estudiado su

regulación. Además hemos aislado y caracterizado mutantes de *Rhizobium elli* alteradas en la degradación de la asparagina.

OBJETIVO GENERAL

Conocer las vías que participan en la degradación de la asparagina, su regulación y su función en *Rhizobium etli* en vida libre y en simbiosis con *Phaseolus vulgaris*, así como su relación con la fijación de nitrógeno.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar las enzimas que participan en la degradación de la asparagina en *Rhizobium etli*.
2. Conocer la regulación de las enzimas que participan en la degradación de la asparagina en *Rhizobium etli*.
3. Obtener y caracterizar mutantes alteradas en el catabolismo de la asparagina.
4. Clonar el gene de la asparaginasa y aspartasa.

METODOS

CEPAS Y PLASMIDOS

Se utilizó la cepa silvestre de *Rhizobium etli*, cepa CE-3 derivada de CFN42 previamente clasificada como *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, (Segovia *et al.*, 1993), resistente a ácido nalidíxico (nal) y estreptomina (sm).

La cepa de *Escherichia coli* S-17 que lleva la región de los genes *tra* del plásmido RP4 integrado en el cromosoma y el vector suicida pSUP5011 que lleva el Tn5-mob y da resistencia a estreptomina y kanamicina (Km) (Simon, R. *et al.* 1986).

Se utilizó el plásmido pRK2073 que lleva la región de los genes *tra* y da resistencia a espectinomicina (sp) (Figurski & Heiinski 1979; Ditta G, *et al.*, 1980).

CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Los medios de cultivo se inocularon con la cepa silvestre a 0.05 D.O., previamente crecida durante 16 h en medio rico líquido de PY (Extracto de levadura 0.3%, peptona de caseína 0.5%, cloruro de calcio 7 mM) a 200 revoluciones por minuto (rpm) y a 30°C. Los medios mínimos (MM) contienen fosfato de potasio dibásico 1.2 mM, sulfato de magnesio 0.4mM, CaCl₂ a 1.5 mM, FeCl₃ 0.003 mM y se suplementaron con las diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno a una concentración de 10 mM, excepto en el caso del glicerol, el cual se utilizó al 2%. El crecimiento se determinó por la densidad óptica a 540 nm y por proteína, la cual se determinó por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

Para los experimentos de limitación de oxígeno, en matraces de 500 ml, con 250 ml de medio de cultivo se inocula con la cepa se desplaza el oxígeno del medio de cultivo con

nitrógeno, burbujeando directamente el medio por 2 minutos, posteriormente se desplaza el oxígeno de la atmosfera del matraz durante 10 minutos, y se inyecta 14.3 ml de aire para dejar una atmosfera de 1% de oxígeno. Se tapa con un tapón de hule y se dejaron crecer durante 18 hr.

PREPARACION DE LOS EXTRACTOS CELULARES

Los extractos celulares se prepararon a partir de 250 ml de medio los cuales se centrifugaron 10 minutos a 10 Krpm, el sobrenadante se decantó y la pastilla celular se lavó con 200 ml de agua fría y se centrifugó nuevamente a 10 Krpm durante 10 minutos a 4°C. La pastilla se resuspendió en 800 µl de amortiguador de extracción en el caso de la actividad de la asparaginasa y cuando se determinaron las actividades de aspartasa, fumarasa y aspartato aminotransferasa en 2 ml. El amortiguador utilizado depende de la actividad enzimática a determinar. El amortiguador de extracción y de reacción para determinar la actividad de la asparaginasa, aspartato aminotransferasa y fumarasa fue KH_2PO_4 0.1 M a pH 7.6. El amortiguador de extracción para determinar la aspartasa fue KH_2PO_4 0.05 M, KCl 0.1M, EDTA 1 mM, Mercapto etanol 5 mM, a pH 8.0 y el amortiguador de reacción de la aspartasa fue Tris HCl a 0.5M, e pH 8.8. Las células se rompieron sonicando la suspensión de células durante 4 minutos, en un sonicador ultrasónico (Soniprep 150). Posteriormente se centrifugaron 2 minutos en microcentrifuga, el sobrenadante se decantó y se dejó en hielo, para determinar la actividad enzimática correspondiente.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ASPARAGINASA

La actividad de la asparaginasa se determinó a través de medir los productos de reacción.

El amonio se determinó coloriméricamente. La determinación de amonio se realizó con 50µl de extracto más 200µl de la mezcla (125 µl de asparagina 20 mM a pH 7.0, 75 µl de amortiguador KH_2PO_4 0.1M a pH 7.6), incubándose a 37°C por 0, 15, 30, 60 y 120 minutos, parando la reacción con 250 µl de una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 1.5%, se centrifugó 2 minutos en microfuga a 12 Krpm y se decantó. Se tomaron 20µl del sobrenadante, al cual se le adicionaron 180µl de agua, más un ml de la solución I (Fenol al 0.10 M y nitroprusiato de Sodio 0.05 M) y 1 ml de solución II (hidróxido de sodio 0.12 M e hipoclorito de sodio 0.42 g/l), se agitó, se dejó reposar por una hora y se leyó la densidad óptica a 625nm (Chaney *et al.*, 1962; Osorio *et al.*, 1993).

El aspartato se determinó por cromatografía líquida de alta presión en un Gold Liquid Chromatographic system Beckman y usando como detector un fluorómetro Gilson (modelo 121). Una vez obtenido el extracto para medir la actividad de la asparaginasa la reacción se efectúa con 200 µl de extracto celular y 800 µl de la mezcla (500 µl de asparagina a 20 mM pH 7.0, más 300 µl de KH_2PO_4 0.1M a pH 7.6) incubando a 37°C a los tiempos 0, 30, 60 y 120 minutos, la reacción se detuvo la reacción con 5 ml de etanol al 80%. Para la determinación de aspartato se calentó a 90°C durante 10 minutos. Los extractos celulares se centrifugaron 10 minutos a 10 Krpm, el sobrenadante fue liofilizado y resuspendido en 500 µl de agua destilada.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ASPARTASA

La actividad de la aspartasa se determinó a través de medir los productos de la reacción.

La producción de fumarato se determinó espectrofotométricamente a 240 nm.

La mezcla de reacción fue preparada con 200 μ l de amortiguador de reacción Tris.HCl 0.5M a pH 8.8, 20 μ l de $MgCl_2$ 0.1 M, 200 μ l de aspartato 0.5M a pH 7.0, se aforó a 1 ml con agua y se agregaron 25 μ l del extracto celular. La cinética es iniciada a temperatura ambiente por la adición del extracto celular (Tokushige, 1985).

La determinación de amonio de la actividad de la aspartasa se realizó con 50 μ l de extracto celular más 200 μ l de la mezcla (125 μ l de aspartato 0.5M a pH 7 más 75 μ l de amortiguador fosfato de potasio monobásico a pH 8.8). En la segunda reacción, en la formación de color se diluyó 10 veces el extracto de la primera reacción.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ASPARTATO AMINOTRANSFERASA

Los extractos celulares se prepararon como se mencionó anteriormente, se centrifugaron dos minutos en microcentrifuga y se dializaron durante 24 h en amortiguador de extracción más 0.01mM de 5' fosfato de piridoxal a 4°C. La formación de oxalacetato fue determinada espectrofotométricamente a 340 nm. La mezcla de reacción se lleva a cabo en un volumen total de 1 ml conteniendo 100 μ l de Tris-HCl 1.0 M a pH 7.6, 500 μ l de Asp 0.5 M a pH 7, 100 μ l de NADH 3.0 mM, 50 μ l de 5'fosfato de piridoxal 2 mM, 50 μ l 2 oxoglutarato 0.2 M, 10u/50 μ l de malato deshidrogenasa (MDH). La reacción inicia en cuanto se le

adiciona 10 μ l del extracto y la MDH. La reacción es monitoreada durante 20 minutos (Rej, R. & Horder, M. 1987)

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA FUMARASA

Los extractos celulares fueron preparados como se mencionó anteriormente y el homogenado se centrifugó 2 minutos en microcentrifugii. La determinación de fumarato se realizó con 70 μ l de extracto celular, 35 μ l de L-malato 0.8M a pH 7.5, 500 μ l de amortiguador de reacción. La reacción se inicia en cuanto se le adiciona el extracto. La formación de fumarato fue determinada espectrofotometricamente a 240 nm (Slitt, 1984).

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTAMINO SINTETASA

Se determinó la actividad de la glutamino sintetasa como control negativo fue ensayada con extractos preparados como se describió anteriormente con amortiguador de extracción de hidrocloreuro de imidazol 10 mM, más EDTA 0.05 mM a pH 7 como se describió anteriormente. La glutamino sintetasa se determinó como la describe Bender *et al.*, 1977.

DETERMINACION DE LAS POZAS DE AMINOACIDOS DE *R. etli*

En matraces con 250 ml de medio mínimo suplementados con asparagina, asparagina más succinato o amonio más succinato, se inocularon con la cepa silvestre a una densidad óptica de 0.1 a 540 nm y se agitaron a 200 rpm a 30°C durante 5 h. Las mutantes se inocularon a 0.5 de D.O. a 540nm en la condición de asparagina como fuente de carbono y nitrógeno.

A las 5 h de crecimiento se tomó una muestra para leer la densidad óptica y determinar proteína. Se centrifugó a 10 Krpm durante 10 minutos a 4°C. Se lavó la pastilla con agua fría, después se centrifugó 10 minutos a 10 Krpm, se decantó, y se resuspendió la pastilla en 5 ml de etanol al 80%, se calentó por 10 minutos a 90°C, se centrifugó 10 minutos a 10 Krpm y el sobrenadante se liofilizó. Los aminoácidos se determinaron por cromatografía líquida.

MUTAGENESIS CON EL TRANSPOSON Tn5

Los transposones (Tn) son herramientas muy útiles para obtener mutantes en microorganismos. Su utilidad está basada en una serie de características: a) Los transposones usualmente inactivan el gene donde se insertaron. b) Los Tn llevan marcadores genéticos, tales como resistencia a antibióticos, los cuales generalmente facilitan el mapeo genético, así como la transducción o la clonación de las regiones mutadas. c) Las mutaciones que producen son generalmente polares y reversiones a muy baja frecuencia (De Bruijn & Lupski, 1984)

Nosotros utilizamos el Tn5-mob que es particularmente útil para la mutagénesis en *Rhizobium* ya que se inserta al azar, tiene el sitio mob por lo cual es movilizable y confiere resistencia a los antibióticos Kanamicina (Km), Neomicina (Neo) y Estreptomina (Sm).

Para realizar la mutagénesis se utilizó la cepa S-17 de *E. coli* y la cepa de *R. etli* CE-3. Se mezclaron la cepa de *R. etli* previamente lavada con agua para eliminar el exceso de exopolisacáridos y la cepa S-17 de *E. coli*, se agitaron perfectamente en el vortex, y se centrifugaron por un minuto, se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 µl de medio rico. Se siembra en una caja de PY sólido y se dejó crecer durante 24 h a 30°C. De la cruz, se hizo una suspensión y se platearon en cajas con PY nalidíxico 20 µg/ml y

kanamicina 30 $\mu\text{g/ml}$ para obtener colonias aisladas, estas se recolectaron en medio de PY para obtener un almacén de mutantes de *R. elli* que se guardó en alícuotas de 1 ml con 88 μl de DMSO a -70°C .

ENRIQUECIMIENTO DE LAS MUTANTES CON AMPICILINA

En un cultivo de crecimiento de bacterias el cual ha sido previamente mutagenizado con Tn5. Se crece a las células en un medio sintético el cual no permite que las células mutadas crezcan, la adición de ampicilina mata selectivamente a las células no mutadas interfiriendo en la síntesis de la pared celular.

Del almacén de mutantes se crece a las células en un medio mínimo suplementado con asparagina y con 200 $\mu\text{g/ml}$ ampicilina. En matraces con 100 ml de medio mínimo suplementados con asparagina, con y sin biotina, se inoculó a 0.3 D.O. la cepa silvestre con el Tn5 insertado; el medio debe contener los antibióticos correspondientes (nalidíxico 20 $\mu\text{g/ml}$, kanamicina 30 $\mu\text{g/ml}$ y ampicilina 200 $\mu\text{g/ml}$). El cultivo se dejó crecer 48 h resuspendiendo en medio fresco cada 12 h. Se cosecharon las células por centrifugación, se resuspendieron en 5 ml de PY, se almacenaron en alícuotas con DMSO a -70°C .

DETERMINACION DEL FENOTIPO SIMBIOTICO

Para observar el comportamiento de las cepas de *R. elli* durante la simbiosis con *Phaseolus vulgaris*, se realizaron experimentos en macetas con vermiculita, donde se sembraron semillas de frijol previamente germinadas y se inocularon con las diferentes cepas de *R. elli* (Bravo *et al.*, 1988).

- Cultivo de Plantas

Germinación de las semillas de frijol:

- Se lavaron las semillas de frijol con agua.
- Se colocaron en etanol al 80% durante 5 minutos.
- Se lavaron con agua estéril
- Se colocaron en hipoclorito de sodio al 7.5% durante 15 minutos.
- Se escurieron y se dejaron reposando en hipoclorito de sodio al 2.6 % durante 20 minutos. A partir de este momento se trabajó en condiciones de esterilidad.
- Se lavó con agua estéril hasta eliminar el olor a cloro.
- Se remojaron en agua estéril por 2 horas. Es conveniente cambiarles el agua continuamente.
- En charolas con una base gruesa de papel absorbente estéril perfectamente humedo se sembraron los frijoles a una distancia de 3 cm. Se sellaron con papel aluminio. Se incubaron a 29°C durante tres días para que germinen las semillas de frijol.

Una vez que han germinado se sembraron 6 plantas en cada maceta con vermiculta estéril, se taparon con un plato que tenía 6 orificios para que salgan las plantas. Se regaron con 800 ml de sales (Medio Fahraeus, Elementos trazas, CaCl_2 88 mM, FeCl_3 30 mM, utilizando soluciones 1000 X). Después de tres días de sembradas las semillas germinadas del frijol se inocularon con 1 ml de una suspensión de células a 1.0 de D.O. a 540 nm de la capa de *R. elli* deseada.

Se sembraron dos macetas como control sin inculo, una con nitrógeno la cual se riega con 5 ml de KNO_3 50 mM por planta cada semana y un control negativo sin nitrógeno.

A los 26 días de crecimiento se sacaron las raíces y se determinó el número de nódulos y se siguió el procedimiento para la determinación de la actividad de la nitrogenasa.

MEDIO FAHRAEUS	1 LITRO	Sol. Stock 1000 X
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0.15 g	150 g
KH ₂ PO ₄	0.10 g	100 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.12 g	120 g

ELEMENTOS TRAZAS (Gibson)	1 LITRO	Sol Stock 1000 X
H ₃ BO ₃	0.0028 g	2.86 g
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.0020 g	2.03 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.00022 g	0.22 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.00008 g	0.08 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.00010 g	0.10 g

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA NITROGENASA EN BACTEROIDES DE LAS MUTANTES DE *R. etli*

La actividad de la nitrogenasa se determina por cromatografía de gases (Chromatograph Gas. Varian 3700) midiendo la producción de etileno a partir de acetileno (Szeto *et al* 1987; Bravo *et al.*, 1990).

A las plantas de 28 días de crecimiento inoculadas con la cepa silvestre y con las mutantes AHZ1, AHZ4, AHZ7 se les sacaron las raíces y se introdujeron dos raíces en un frasco de vidrio de 200 ml, se taparon con tapón vacutainer. Se inyectaron 3 ml de acetileno tomando 1 ml por cada muestra; la primera muestra se toma cuando ha transcurrido una hora y la segunda muestra a las 2 horas, se introdujeron en un tubo vacutainer. Una vez tomadas las dos muestras, la raíz se desnodula y se secaron los nódulos a 55°C durante 72 h para determinar el peso seco del nódulo por planta.

El etileno producido por la nitrogenasa se cuantificó inyectando 500 µl de la muestra deseada en el cromatógrafo de gases.

PURIFICACION DE LOS BACTEROIDES

Los bacteroides de los nódulos de las raíces de *Phaseolus vulgaris* se aislaron utilizando un gradiente de Percoll (Reibach *et al.*, 1981).

Se maceraron aproximadamente 3 g de nódulos de los frijoles infectados con *R. etli*, con amortiguador de fosfatos, (KH_2PO_4 50 mM, NaCl 0.15 M a pH 7.6), se centrifugaron 5 minutos a 3 Krpm, el sobrenadante se volvió a centrifugar 15 minutos a 15 Krpm, la pastilla se resuspendió en 1 ml de amortiguador de fosfatos. Se colocó 1 ml de la suspensión en un gradiente discontinuo de percoll (24.5 ml percoll, 3.5 ml de amortiguador fosfato de potasio monobásico 0.5M, NaCl 1.5 M a pH 7.6, se adicionan 7 ml de agua), se centrifugó 50 minutos a 20 Krpm, se recolectó la fracción de los bacteroides por succión con pipeta pasteur. Para eliminar el percoll se diluyó 1:10 con amortiguador de extracción, se centrifugaron 20 minutos a 15 Krpm, se succionaron el sobrenadante y la pastilla se volvió a centrifugar en microcentrifuga por 2 minutos y se resuspendió en amortiguador de extracción, dependiendo de la actividad que se va a determinar, o se resuspendió en 5 ml de etanol al 80% para determinar pozas de aminoácidos. Se siguió el mismo procedimiento para pozas de aminoácidos en vida libre.

DETERMINACION DEL FENOTIPO DE LOS BACTEROIDES DEL NODULO

Se tomaron algunos nódulos al azar de cada una de las cepas inoculadas y se pusieron en agua durante 5 minutos. Se decantaron y se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2.6%, y se dejaron reposar durante 5 minutos. Se lavaron con agua estéril un mínimo de 5 veces. Se exprime el nódulo en una caja con medio rico de PY conteniendo los antibióticos correspondientes. Se trabajó en área estéril. Las cajas se

incubaron a 30°C durante 72 h. De las colonias aisladas, se picaron en caja petri con diferentes medios para determinar el fenotipo de las bacterias contenidas en el nódulo.

CLONACION CON EL BANCO GENOMICO DE *R. etli*

Se realizó tres cruza triparentales con las mutantes, AHZ1, AHZ4, AHZ7 la cepa de *E. coli* HB101 tc⁺ que contiene el banco genómico de *R. etli* y la cepa de *E. coli* que tiene el plásmido pRK2073. Las transconjugantes se seleccionaron en un medio mínimo con asparagina como fuente de carbono y nitrógeno, con los antibióticos kanamicina y tetraciclina

EXTRACCION DEL PLASMIDO

Esta técnica se utiliza para extraer DNA total de algunas bacterias (Maniatis, T; *et.al.*;1989). Cada una de las mutantes complementadas se inoculó en un tubo con 6 ml de PY, incubandose durante 16 h. Se centrifugaron 4.5 ml durante 2 minutos en microfuga, se aspiró el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de agua estéril.

Se resuspendió la pastilla con 100 µl de solución A, se agitó en vortex.

Se adicionó 200 µl de sol. B y se agitó nuevamente.

Se reposó 10 minutos en hielo, se adicionaron 150 µl de la sol. C y se agitó.

Se dejó reposar 30 minutos en hielo.

Se centrifugó 3 minutos en microcentrifuga.

Se vació el sobrenadante en otro tubo, y se adicionó un ml de etanol frío.

Se dejó reposar 30 minutos a -20°C

Se centrifugó 5 minutos en microcentrifuga y se aspiró el sobrenadante.

Se disolvió la pastilla en 100 µl de agua y se agitó en vortex.

Se adicionó 50 µl de solución C más 300 µl de etanol frío.

Se dejó reposar 10 minutos a -20 °C.

Se centrifugó 5 minutos, aspirar el sobrenadante y se secó la pastilla al vacío

Se disolvió la pastilla en 20 µl de agua destilada y se agitó en vortex.

Se guardó a -20 °C.

Si el DNA está muy sucio se realiza una extracción con fenol-cloroformo.

Extracción con Fenol-cloroformo

A la muestra se le adicionaron 400 µl de TE (10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA), se agitó con vortex.

Se adicionaron 400 µl de solución fenol-cloroformo

Se centrifugó 5 minutos. El sobrenadante se pasó a otro tubo.

Se agregó 400 µl de cloroformo, se agitó con vortex.

Se centrifugó 5 minutos. Se tomó el sobrenadante.

El DNA se precipitó con etanol. (Dos volúmenes de etanol y 1/10 de acetato de sodio).

Se agitó en vortex.

Se dejó reposar durante 10 minutos a -20 °C.

Se centrifugó 10 minutos, se aspiró el sobrenadante y la pastilla se seca al vacío

Se resuspendió con 15 µl de TE.

Soluciones

A: 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl a pH 8

B: 0.2 N NaOH, 1% SDS

C: 7.5 M Acetato de amonio.

- Digestion de DNA con enzimas de restricción

5 μ l de DNA

2 μ l amortiguador para EcoR1

13 μ l de agua

Se utilizó la enzima EcoR1.

Se incubó a 37 °C durante 60 minutos con la enzima.

- Gel de Agarosa

Se utilizaron geles de agarosa al 0.8%. La agarosa se disolvió en la solución amortiguadora TBE 1X (Tris Base 44 mM, ácido bórico 27 mM y EDTA 0.5M a pH 8). Se le agregó 10 μ l de una solución de 5 μ g/ml de bromuro de etidio por cada 100 ml de agarosa. Se adiciona en cada pozo 5 μ l de la digestión más 2 μ l de colorante y se deja correr a 100 volts durante 60 minutos.

- Preparación de las células competentes de *E. coli*

En un matraz de 250 ml con 25 ml de medio luria (LB) se inoculó *E.coli* HB 101 a 0.05 de D.O., se dejó crecer hasta 0.5 D.O. a 540 nm.

Se centrifugó 5 minutos a 7 000 rpm.

Se resuspendió en 10 ml de CaCl₂ 0.1 M. Se agitó manualmente.

Se dejó en hielo con agua durante 20 minutos.

Se centrifugó 5 minutos a 7 000 rpm.

Se resuspendió la pastilla en 2.5 ml de 0.1 M CaCl₂ (1/10 del volumen total). Se deja en hielo y en refrigerador toda la noche.

- Transformación de *E. coli*

En un tubo eppendorf se adicionan 100 μ l de células competentes más 4 μ l de DNA del plásmido que se aisló. Se agitó en vortex.

Se dejó reposar 20 minutos en hielo. Posteriormente se incubó 3 minutos a 42 °C, no se debe agitar.

Se dejó en hielo, se le adicionó 1 ml de medio luria.

Se dejó reposar 60 minutos a 37 °C.

Se centrifugó 1 minuto en microfuga

Se retiró el sobrenadante y se dejó en 100 μ l de LB y se agitó en vortex.

Se plateó en caja con LB Tc

Se Incubó a 37 °C durante 24 h.

TRANSFERENCIA DE DNA TIPO SOUTHERN.

Para transferir el DNA de un gel de agarosa a una membrana de nitrocelulosa o nylon se utilizó un procedimiento modificado de la transferencia por el método de Southern (Maniatis, T. *et al.*, 1989, Southern, E. M. 1975) para obtener dos copias de un mismo gel, el procedimiento es el siguiente:

- Digerir el DNA deseado con la enzima de restricción requerida y correr el gel de agarosa poniendo en un camil, de preferencia en el primero, un marcador de peso como DNA de fago lambda digerido con la enzima de restricción Hind III o Ladder de 1 Kb.

- Retirar el gel de la cámara, usando guantes, una vez que terminó la electroforesis, marcar el gel de un extremo haciendo un corte en una de las esquinas inferiores.

- Se observó el gel con luz ultravioleta

- Se puso el gel en una charola y se hace el siguiente procedimiento:

1) Se agrega una solución de HCl 0.25 N a que cubra el gel agitando suavemente durante 15 minutos para que suceda una depurinación ácida.

2) Se retira la solución y se enjuagó con agua.

3) Se agregó una solución de NaOH 0.5 M + NaCl 1.0 M a que cubra el gel agitando suavemente durante 45 minutos para que ocurra una desnaturalización alcalina.

4) Se retiró la solución anterior y se agregó una solución de tris 0.5 M pH 7.5 + NaCl 1.5 M a que cubra el gel agitando suavemente aproximadamente durante 45 minutos para neutralizar. Se enjuagó con agua.

- Se hirvió 5 minutos los filtros de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell de 0.45 mm) para eliminar la capa de detergente que tienen en la superficie.

- Se pusieron los filtros en una solución salina de citratos 6 X (SSC) por un momento.

- Se tomó el gel con guantes y se colocó sobre un vidrio, se tomó un filtro de nitrocelulosa y se puso sobre el gel en un solo movimiento, cuidando que no queden burbujas entre ellos.

- Se pusieron 3 capas de papel absorbente sobre el filtro y después 8-10 cm de servitoallas dobladas a la mitad y un vidrio.

- Se invierte todo el paquete, se retiró el vidrio que está en contacto con el gel y se puso un filtro de nitrocelulosa. Repetir el procedimiento del inciso anterior.

- Al final se puso un matraz con 1 litro de agua sobre el vidrio superior.

- Al día siguiente se retiró las servitoallas y el papel absorbente, se tomó los filtros con guantes y se marcaron los canales con bolígrafo antes de separarlos del gel, también se puede marcar el número del gel, la fecha, etc.. Se retiró los filtros con cuidado y se pusieron entre servitoallas para secar en el horno de vacío a 80°C durante 2 horas. Se guardó en una bolsa de plástico hasta el momento de usarse.

SOLUCION SALINA DE CITRATOS 20 X (SSC).

H ₂ O aforar a	1000 ml
NaCl	175.3 g
Citrato de sodio	88.2 g

MARCAJE RADIOACTIVO DE DNA.

El DNA se marcó con ³²P por un procedimiento de corte y reparación de DNA (*Nick Translation*) (Rigby, P., *et al.*, 1977), para esto se usa un estuche comercial y aCTP-³²P. La reacción se hace en un tubo eppendorf nuevo esterilizado.

- Reacción:

DNA	10-50 ng
H ₂ O	aforar a 50 ml
Sol.1 estuche	10 ml
Sol.2 estuche	10 ml
³² P-CTP	10 mci

- Se agitó el tubo y se centrifugó 30 segundos en la microcentrifuga.
- Se puso el tubo en un baño de agua a 12-14°C por 2 horas.
- Se preparó una columna en una jeringa de 1 ml con un poco de fibra de vidrio en el fondo, se empacó hasta la marca de 1 ml con resina hidratada Sephadex G-75.
- Se equilibró la resina con 5 ml de solución amortiguadora para la reacción de corte y reparación.
- Al término de la reacción se agregó a la muestra 250 ml de solución amortiguadora para la reacción de corte y reparación, se mezcló y se colocó en la columna todo el volumen, y se sacó todo el líquido. Se agregó 600 ml de solución amortiguadora para la reacción de corte y reparación a la columna y se recolectó todo el líquido, en esta fracción se recupera el DNA marcado.

- Se almacenó el DNA marcado a -20°C dentro de una caja de acrílico especial para compuestos radiactivos.

SOLUCIONES DEL ESTUCHE DE CORTE Y REPARACION DE DNA.

1) Solución 1.

Solución amortiguadora: tris pH 7.8, MgCl₂, 2-mercaptoetanol.

Nucleótidos: d ATP 100 mM, d GTP 100 mM, d TTP 100 mM.

2) Solución 2.

Solución amortiguadora: tris pH 7.5, MgCl₂, glicerol, albúmina sérica bovina.

Enzimas: 5 unidades/10 ml de DNA polimerasa 1.

SOLUCION AMORTIGUADORA PARA LA REACCION DE CORTE Y REPARACION.

Tris	10 mM pH 8
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM pH 8
SDS	0.01 %

HIBRIDACION.

Para detectar secuencias en el DNA genómico homólogas al DNA usado como detector, se puede hacer una hibridación. Este procedimiento se lleva a cabo en dos etapas, una etapa preparativa llamada prehibridación y la otra etapa llamada hibridación en donde se pone en contacto el DNA marcado radiactivamente usado como detector o probador con el DNA adherido al filtro de nitrocelulosa (Maniatis, T., *et.al.*, 1989). Los componentes de la solución, así como la temperatura de incubación, se modifican de acuerdo al grado de homología entre el problema y el detector, de manera que existen condiciones de hibridación relajadas, intermedias y estrictas.

En este trabajo las condiciones de hibridación son estrictas pues los detectores son homólogos a los problemas.

- **PREHIBRIDACION.**

- Se humedeció los filtros de nitrocelulosa con una solución 6 X SSC y se pusieron en una bolsa de polietileno.

- Se agregó 1 ml por carril de una solución que contiene:

SSC	6 X
Denhardt's	10 X
Tris HCl pH 7.5	10 mM
DNA tino de temera	50 mg/ml

NOTA: Hervir el DNA de tino de temera 5 minutos en baño María y enfriar rápidamente en hielo por 5 minutos antes de agregar a la solución.

- Se secaron todas las burbujas de la bolsa y se selló con calor.

- Se incubó la bolsa a 65°C por lo menos 2 horas, se puede incubar toda la noche asegurándose que la bolsa esté perfectamente sellada para evitar que se evapore el líquido.

- **HIBRIDACION.**

- Trabajar con las mismas protecciones que para el marcaje del DNA.

- Se sacó de la bolsa toda la solución de prehibridación por un pequeño corte hecho en una esquina de la bolsa.

- Se puso la bolsa tras la mampara de acrílico y se agregó 0.5 ml por carril de la siguiente solución:

SSC	6 X
Denhart's	10 X
Tris HCl pH 7.5	10 mM
DNA tino de temera	50 mg/ml
DNA ³² P	1.5x10 ⁶ c.p.m.

NOTA: Hervir el DNA de timo de temera y del probador marcado, durante 5 minutos a baño María, enfriar rápidamente en hielo por 5 minutos antes de agregar a la solución.

- Se incubaron los filtros, dentro de una caja de acrílico, a 65°C por toda la noche.

- Se pusieron la bolsa y un contenedor para líquidos radiactivos tras la mampara de acrílico. Se secó toda la solución de hibridación haciendo un pequeño corte en la bolsa (desechar en el contenedor), por el mismo corte agregar 10 ml de solución SSC 0.1 X a temperatura ambiente, enjuagar desechando la solución en el contenedor.

- Se cortó la bolsa en tres de sus lados, usando guantes, se sacó el filtro, y se colocó en un recipiente con solución 0.1 X SSC + 0.1 % SDS a 55°C por 30 minutos.

- Se monitoreó el filtro con el contador Geiger para determinar la cantidad de radiactividad presente después del lavado. Se lavó hasta que los filtros queden limpios, esto se determina monitoreando las esquinas del filtro.

- Se lavó el filtro con una solución 0.1 X SSC por 15 minutos a temperatura ambiente.

- Se secó el filtro entre servilloallas a temperatura ambiente o a 65°C por 5 minutos.

- Se colocó el filtro seco sobre una cartulina o un papel grueso y se cubrió con un protector plástico (Kleen pack), cuidar que no queden amugas.

- Se colocó el cartón con el filtro en un cassette para radiografía. En un cuarto oscuro poner 2 placas de radiografía sobre el cartón, cerrar perfectamente el cassette, conservarlo en un congelador a -70°C por lo menos durante 1 día.

- Se reveló una de las placas de radiografía. Volver a congelar el cassette en caso necesario.

- **SOLUCIONES NECESARIAS PARA LA HIBRIDACION.**

- 1) Solución salina de citratos 20 X.

2) Denhardt's 50 X.

H ₂ O aforar a	500 ml
Ficoll tipo 400	5 g
Polivinilpirrolidona	5 g
Albúmina sérica bovina fracción V	5 g

Filtrar por filtro de 1.2 m. Alicuotar y almacenar a -20°C.

3) DNA de timo de temera.

DNA timo de temera	10 mg/ml
--------------------	----------

Disolver el DNA agitando por 2 a 4 horas en un agitador magnético a temperatura ambiente. Pasar la solución de DNA varias veces por una jeringa desechable. Hervir la solución en baño María por 10 minutos. Leer la densidad óptica en el espectrofotómetro a 260 nm contra un blanco de agua para conocer la concentración exacta. Alicuotar y almacenar a -20°C.

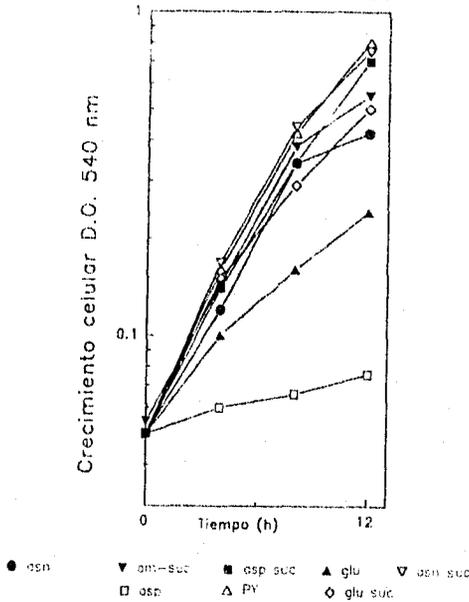
4) Revelador y fijador Kodak (cat. 190-1859).

RESULTADOS

CRECIMIENTO DE *Rhizobium etli*

R. etli casi no crece en aspartato como única fuente de carbono y nitrógeno, mientras que en aspartato como fuente de nitrógeno, más otra fuente de carbono como succinato crece tan bien como en la condición amonio más succinato (Fig. 1). En contraste con asparagina como única fuente de carbono y nitrógeno *R. etli* crece muy bien de manera similar a como crece en asparagina más succinato (Fig. 1) En glutamato como fuente de carbono y nitrógeno crece aproximadamente la mitad que en glutamato más succinato (Fig 1).

Fig. 1. Curva de Crecimiento de *R. etli* en diferentes nutrientes



Estos resultados nos indican que *R. etli* puede utilizar la asparagina y el glutamato como fuentes de nitrógeno, que el aspartato es una fuente mala de carbono y que la asparagina es una fuente buena de carbono a pesar de que la asparagina para ser utilizada como fuente de carbono debe degradarse primero a aspartato

ESTEQUIOMETRIA DE LA ASPARAGINASA

Se determinó la estequiometría de la asparaginasa (Tabla 1). En este ensayo se creció a *R. etli* en medio mínimo suplementado con asparagina. A los extractos se les determinó la producción de amonio y aspartato. Se encontró que la cantidad de aspartato (1.05 μmol) y de amonio (1.16 μmol) formados fueron similares y la reacción fue dependiente del sustrato asparagina y del extracto celular, la actividad de la asparaginasa no requiere de magnesio como co-factor para tener una actividad óptima.

Tabla 1. ESTEQUIOMETRIA DE LA ASPARAGINASA DE *R. elli*

Condición	Concentración. (μmol) [*]		
	Activ. Específica [†]	Aspartato	Amonio
Extracto completo	31.0	1.05	1.16
Sin asparagina	<1.3	<0.05	<0.05
Sin extracto	<1.3	<0.05	<0.05
Con MgCl ₂	25.5	1.07	0.95

* La producción de aspartato y amonio se determinó a los 30 minutos. La mezcla de reacción contenía 1.24 mg de proteína. La estequiometría se determinó en extractos celulares de *R. elli* crecidos durante 18 h en Medio Mínimo suplementado con asparagina.

† La actividad de la asparaginasa se expresó en nanomoles de amonio/mg proteína/min.

REGULACION DE LA ASPARAGINASA

La regulación de la asparaginasa de *R. elli* fue estudiada a través de determinar la actividad de esta enzima en diferentes condiciones nutricionales. Se encontró que la actividad más alta se obtuvo al crecer a *R. elli* en asparagina como única fuente de carbono y nitrógeno (Tabla 2). Esta actividad disminuyó cuando el medio mínimo contenía asparagina más otra fuente de carbono como succinato, glicerol o glucosa (Tabla 2). La actividad de la asparaginasa fue similar cuando se creció en asparagina más succinato con o sin amonio y esta actividad fue baja cuando se creció a *R. elli* en una buena fuente de nitrógeno y carbono como amonio y succinato, o cuando se creció a esta bacteria en una mala fuente de nitrógeno como nitrato más succinato (Tabla 2). La actividad de la asparaginasa en aspartato que es uno de los productos de la degradación de la asparagina,

con o sin succinato fué baja como en la condición de amonio-succinato. La actividad de la asparaginasa en amonio succinato fué baja, aproximadamente 10 veces menos que en la condición de asparagina como única fuente de carbono y nitrógeno, cuando se creció a *R. etli* en diferentes aminoácidos como glutamina y glutamato con o sin succinato, o en medio rico.

En *R. etli* encontramos que la cantidad de oxígeno disuelto en el medio fue irrelevante para la actividad de esta enzima. Los resultados de esta actividad se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2. ACTIVIDAD DE LA ASPARAGINASA DE *R. etli* EN DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

<i>Condiciones de Crecimiento*</i>	<i>Actividad Específica*</i>	<i>Actividad Relativa Porcentaje</i>
asn	34.6 (6)	100
asn + glic	14.0 (2)	40.5
asn + gluc	12.2 (2)	35.3
asn + suc	16.0 (3)	46.2
asn + suc + amonio	13.7 (3)	39.6
amonio + glicerol	3.7 (1)	10.7
amonio + glucosa	6.0 (1)	17.3
amonio + suc	4.5 (1)	13.0
nitrato + suc	5.5 (1)	15.9
aspartato + suc	4.1 (1)	11.8
gln + suc	2.5 (1)	7.2
glu + suc	3.5 (1)	10.1
asp	4.7 (1)	13.6
gln	3.7 (1)	10.7
glu	3.4 (1)	9.8
PY	2.9 (1)	8.4
asn, O ₂ 1%	36.0 (6)	104.3
asn + suc, O ₂ 1%	15.3 (2)	44.2
amonio + suc, O ₂ 1%	4.7 (1)	13.6

* La actividad se determinó a las 18 h de crecimiento. El número entre paréntesis representa la desviación estándar.

† La actividad de la asparaginasa está expresada en nmol de amonio/mg de proteína/min

ESTEQUIOMETRIA DE LA ASPARTASA

Para la determinación de la estequiometría de la aspartasa se utilizó el amortiguador de reacción KH_2PO_4 30 mM pH 8.8, en lugar de Tris.HCl 100 mM, pH 8.8, debido a que este último amortiguador interfiere en la determinación de amonio. Encontramos que la actividad de aspartasa ensayada con amortiguador fosfato bajaba aproximadamente el 45% que con el amortiguador Tris.HCl. (No se muestran los datos) La cantidad de fumarato (1.07 μmol) y amonio (1.14 μmol) formado fueron similares (Tabla 3). La reacción fue dependiente de su sustrato aspartato y del extracto celular. Para obtener la actividad óptima de la aspartasa se requiere de magnesio como cofactor (Tabla 3).

TABLA 3. ESTEQUIOMETRIA DE LA ASPARTASA DE *R. etl*

Condición	Activ. Especifica *	Concentración (μmol)	
		Amonio*	Fumarato*
Extracto completo	178.3	1.14	1.07
Sin Aspartato	<8.3	<0.05	<0.05
Sin Extracto	<8.3	<0.05	<0.05
Sin MgCl_2	61.6	0.36	0.37

*La producción de amonio y fumarato se determinó a los 30 minutos. El extracto contenía 0.20 mg/ml de proteína. Los extractos celulares de *R. etl* fueron obtenidos de células crecidas en MM suplementados con asparagina durante 18 h.

*La actividad específica de la aspartasa está expresado en nmols de fumarato/mg proteína/min

REGULACION DE LA ASPARTASA

La actividad más alta de la aspartasa en *R. elli* fue encontrada cuando se utilizó asparagina como fuente de carbono y nitrógeno (Tabla 4) y su actividad disminuyó cuando se creció a la bacteria en asparagina más otra fuente de carbono como succinato, glucosa o glicerol. Cuando *R. elli* se creció en asparagina más amonio-succinato la actividad de la aspartasa disminuyó cerca de cuatro veces y disminuyó cerca de 25 veces cuando se creció en una buena fuente de nitrógeno como amonio. Esta actividad también se encuentra baja cuando se crece a *R. elli* en su sustrato aspartato con o sin succinato, de manera similar cuando se creció en diferentes aminoácidos como glutamato y glutamina con o sin fuente de carbono, o en un medio rico como PY (Tabla 4). La cantidad de oxígeno disuelto en el medio fue irrelevante para la actividad de la aspartasa.

TABLA 4. ACTIVIDAD DE LA ASPARTASA DE *R. etII* EN DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO

<i>Condiciones de crecimiento</i>	<i>Actividad Especifica*</i>	<i>Actividad Relativa Porcentaje</i>
asn	390.3 (50)	100
asn + glic	32.3 (6)	8.7
asn + gluc	26.8 (4)	6.9
asn + suc	261.0 (30)	60.4
asn + suc + amonio	92.4 (15)	23.7
amonio + glicerol	8.4 (2)	2.15
amonio + glucosa	1.5 (1)	0.4
amonio + suc	16.2 (3)	4.15
Nitrato + suc	10.0 (2)	2.6
aspartato + suc	8.1 (2)	2.1
gln + suc	12.0 (2)	3.1
glu + suc	7.8 (2)	2.0
asp	30.4 (7)	7.8
gln	12.1 (2)	3.1
glu	16.3 (3)	4.2
PY	3.2 (1)	0.8
asn, O ₂ 1%	389.0 (20)	99.6
asn + suc, O ₂ 1%	220.8 (20)	56.61
amonio + suc, O ₂ 1%	15.2 (3)	3.9

* La actividad se determinó a las 18 h de crecimiento. El número entre parentesis representa la desviación estandard.

* La actividad de la aspartasa está expresada en nmol de fumarato/mg de proteína/min

ACTIVIDAD DE LA ASPARTATO AMINOTRANSFERASA

Para conocer el papel que juega la aspartato amino transferasa en *R. etli* se determinó la actividad de esta enzima en diferentes fuentes nutricionales. Se encontró que la actividad de la aspartato aminotransferasa es similar cuando *R. etli* es crecida en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, como amonio más succinato, en PY y en asparagina o aspartato con o sin succinato (Tabla 5).

TABLA 5. ACTIVIDAD DE LA ASPARTATO AMINOTRANSFERASA DE *R. etli* EN DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Condición*	Actividad Específica*
Amonio Succinato	308.6
Medio Rico (PY)	309.7
Asparagina	357.6
Asparagina-succinato	322.1
Aspartato	318.4
Aspartato Succinato	382.3

*La actividad de la aspartato amino transferasa se determinó a las 18 h de crecimiento

+La actividad está expresada en nmol de NADH/mg proteína/min

ACTIVIDAD DE LA FUMARASA

La fumarasa es una enzima del ciclo de Krebs que cataliza la conversión reversible de fumarato a malato. Se determinó la actividad de esta enzima y su regulación en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. La actividad más alta de fumarasa en *R. etli* fue

encontrada cuando se creció a este microorganismo en malato como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno y su actividad disminuyó cuando este medio además contenía fumarato (Tabla 6). La actividad de fumarasa fué intermedia cuando se creció a *R. etli* en succinato, con diferentes fuentes de nitrógeno como amonio o nitrato o diferentes aminoácidos y esta actividad fué menor cuando se creció a *R. etli* en glucosa o glicerol como fuente de carbono o cuando se utiliza un aminoácido como fuente de carbono y nitrógeno (Tabla 6).

TABLA 6. ACTIVIDAD DE LA FUMARASA DE *R. etli* EN DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Condiciones de* Crecimiento	Actividad* Específica	Actividad Relativa Porcentaje
asn	271.40	13.46
asn + glic	630.38	31.27
asn + gluc	390.67	19.38
asn + suc	754.83	37.45
asn + suc + amonio	767.34	38.07
amonio + glicerol	183.26	9.09
amonio + gluc	337.55	16.74
amonio + suc	899.14	44.61
nitrato + suc	833.19	41.33
aspartato + suc	547.40	27.15
gln + suc	830.62	41.21
glu + suc	705.51	35.00
asp	420.64	20.87
gln	453.15	22.48
glu	413.90	20.53
PY	473.15	23.47
amonio + malato	2 015.50	100.00
amonio + malato + fumarato	518.25	25.71
amonio + fumarato	479.47	23.78

*La actividad se determinó a las 18 h de crecimiento.

* La actividad está expresada en nanomol de fumarato/mg proteína/min

ACTIVIDAD DE LA GLUTAMINO SINTETASA

Se determinó la actividad de la glutamino sintetasa que es una de las enzimas que participa en la asimilación de amonio ya que cataliza la síntesis de glutamina a partir de amonio y glutamato. La actividad de esta enzima cuando se creció *R. etli* en asparagina más succinato fue similar a la condición de amonio succinato; en la condición de aspartato más succinato la actividad de la glutamino sintetasa fue tres veces más alta que la condición de amonio-succinato. Los niveles de esta enzima en asparagina o aspartato como fuente de carbono y nitrógeno fueron aproximadamente 7 veces más bajos que en amonio succinato (Tabla 7).

TABLA 7. ACTIVIDAD DE LA GLUTAMINO SINTETASA DE *R. etli*

Condición*	Actividad Especifica *
Amonio Succinato	22.7
Medio Rico (PY)	10.8
Asparagina	3.2
Asparagina-succinato	17.7
Aspartato	3.7
Aspartato Succinato	66.2

*La actividad se determinó a las 18 h de crecimiento.

*La actividad de la glutamino sintetasa está expresada en nmol y glutamil hidroxamato/mg proteína/mín.

ACTIVIDAD DE LA ASPARAGINASA Y ASPARTASA EN BACTEROIDES DE *R. elli*

Se analizó el papel de la degradación de la asparagina en bacteroides de *R. elli* a través de determinar la actividad de las enzimas asparaginasa y aspartasa. Los bacteroides se aislaron mediante un gradiente de Percoll. La actividad de la asparaginasa se encontró alta (38 nmol/mgp/min), tan alta como la que se encontró en *R. elli* en vida libre cuando se creció en asparagina como fuente de carbono y nitrógeno (35 nmol/mgp/min). La actividad de la aspartasa también se encontró elevada (164 nmoles/mgp/min).

OBTENCION DE MUTANTES DE *R. elli* ALTERADAS EN EL CATABOLISMO DE LA ASPARAGINA

Para conocer el papel de la degradación de la asparagina en *R. elli* en vida libre y en simbiosis, se obtuvieron y caracterizaron mutantes alteradas en el catabolismo de la asparagina. Por mutagénesis con transposón Tn5.

Las mutantes de *R. elli* con transposón Tn5-mob se obtuvieron por conjugación de la cepa *E. coli* S-17 como se mencionó en métodos.

Se obtuvieron aproximadamente 20 000 colonias independientes con el transposón las cuales se juntaron para así tener nuestro almacén de mutantes.

SELECCION DE LAS MUTANTES ALTERADAS EN EL CATABOLISMO DE ASPARAGINA

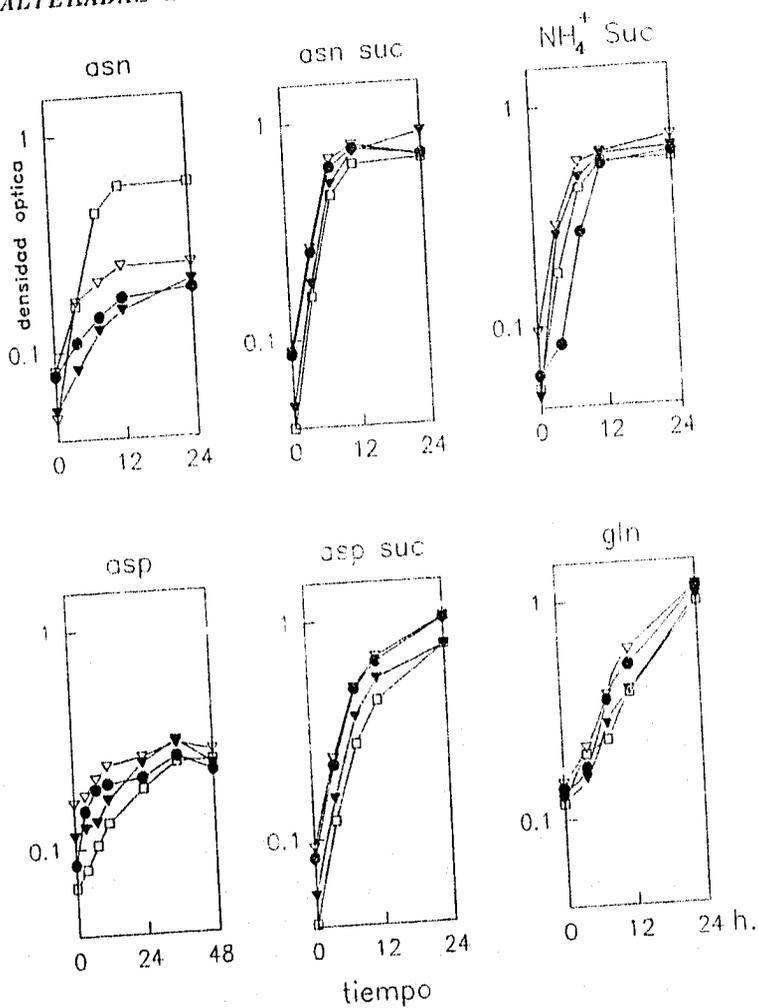
El Beta-Aspartil-hidroxamato es un aminoácido análogo a la asparagina el cual tiene un grupo hidroxilamino en lugar del grupo amido de la asparagina. Este compuesto ha sido utilizado para obtener mutantes en el catabolismo de la asparagina en varios organismos, ya

que al degradarse produce hidroxilamina la cual es tóxica. Por lo tanto las mutantes que son resistentes a este compuesto generalmente están alteradas en la degradación de asparagina (Spring *et al.*, 1986; Jones, 1985).

Se probaron diferentes concentraciones de beta-aspartil-hidroxiato y se encontró que una concentración de 5 mM inhibe el crecimiento de *R. etli*. Se obtuvieron 98 posibles mutantes resistentes a este agente tóxico. Estas mutantes perdían el fenotipo al crecerlas en medio líquido. Estos falsos positivos se deben probablemente a que *Rhizobium* produce exopolisacáridos que enmascaran el fenotipo dándonos como resultado falsos positivos. Por tanto, se decidió obtener las mutantes por un método de selección negativo, seleccionando las mutantes que no crecieran en asparagina como fuente de carbono y nitrógeno. La selección se realizó por enriquecimiento con ampicilina como está descrito en métodos. Se analizó el fenotipo de 3000 colonias en cajas de medio mínimo más asparagina, con o sin biotina, asparagina succinato y amonio succinato. Inicialmente se obtuvieron aproximadamente 200 colonias que no crecían en asparagina como fuente de carbono y nitrógeno, a estas colonias se verificó nuevamente su fenotipo en caja y quedaron 26 mutantes posiblemente alteradas en el catabolismo de la asparagina. A estas colonias se les analizó el fenotipo en medio mínimo líquido con asparagina como única fuente de carbono y nitrógeno, asparagina succinato y amonio succinato. Se obtuvieron 5 colonias con el fenotipo característico, esto es que no crecían en medio mínimo suplementado con asparagina, y sí crecían en otros medios de cultivo. Se purificaron estas colonias y se volvió a revisar el fenotipo en caja en las condiciones antes mencionadas más las mismas condiciones suplementadas con biotina, que es una vitamina que interfiere en el metabolismo. A estas cinco colonias se les probó el fenotipo en líquido en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno como: asparagina, asparagina succinato, amonio succinato, nitrato succinato, aspartato, aspartato más succinato, glutamina, glutamina succinato, prolina,

prolina succinato y en un medio rico PY, de las cuales solo 3 colonias no crecieron en asparagina como única fuente de carbono y nitrógeno (no se muestran los datos) a estas tres colonias se les denominaron AHZ1, AHZ4, AHZ7. Estas tres mutantes se siguieron caracterizando. En la Fig. 2. se muestra que las mutantes AHZ crecen bien en las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, excepto en la condición de asparagina lo que nos indica que estas mutantes están alteradas únicamente en la utilización de la asparagina como fuente de carbono y nitrógeno.

Fig. 2. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE MUTANTES DE *R. etli*
ALTERADAS EN EL CATABOLISMO DE LA ASPARAGINA



□ Ceba Silvestre ● AHZ1 ▼ AHZ4 ▼ AHZ7

ACTIVIDAD DE LA ASPARAGINASA EN LAS MUTANTES DE *R. etli* ALTERADAS EN EL CATABOLISMO DE LA ASPARAGINA

La mutante AHZ1 presenta una actividad de asparaginasa similar a la cepa silvestre (Tabla 8). Las mutantes AHZ4 y AHZ7 presentan muy baja actividad de la asparaginasa cuando se creció en asparagina y asparagina-succinato con respecto a la cepa silvestre (Tabla 8).

TABLA 8. ACTIVIDAD DE LA ASPARAGINASA EN LAS MUTANTES DE *R. etli* ALTERADAS EN EL CATABOLISMO DE LA ASPARAGINA

Condición*	Cepa Silvestre	AHZ1	AHZ4	AHZ7
asn	28.37*	36.66	8.23	7.13
asn-suc	21.38	33.40	6.06	4.91
amonio-suc	9.35	6.06	5.94	5.76

* La actividad de la asparaginasa se determinó a las 18 h de crecimiento

* La actividad de la asparaginasa está expresada en nmol de amonio /mg proteína/min

ACTIVIDAD DE LA ASPARTASA EN LAS MUTANTES DE *R. etli* ALTERADAS EN EL CATABOLISMO DE LA ASPARAGINA

Se determinó la actividad de la aspartasa en estas mutantes en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno como asparagina, asparagina succinato y amonio succinato, se encontró que tanto la mutante AHZ1 como las mutantes AHZ4 y AHZ7 tienen muy baja actividad de aspartasa en las tres diferentes condiciones en las que fueron crecidas con respecto a la cepa silvestre. Sólo se encuentra una pequeña actividad residual en la condición amonio succinato, misma que se encuentra en las tres mutantes (Tabla 9).

TABLA 9. ACTIVIDAD DE LA ASPARTASA EN LAS MUTANTES DE *R. etli* ALTERADAS EN EL CATABOLISMO DE LA ASPARAGINA

<i>Condición*</i>	<i>Cepa-Silvestre</i>	<i>AHZ1</i>	<i>AHZ4</i>	<i>AHZ7</i>
asn	316*	4	1	1
asn-suc	248	6	6	16
amonio-suc	6	9	14	11

*La actividad se determinó a las 18 h de crecimiento.

*La actividad de la aspartasa está expresada en nmol de amonio/mg proteína/min.

POZAS DE AMINOACIDOS DE LAS MUTANTES DE *R. etli* ALTERADAS EN EL CATABOLISMO DE LA ASPARAGINA.

Se determinaron las pozas de aminoácidos en las mutantes AHZ1, AHZ4, AHZ7. La mutante AHZ1, en la condición de asparagina como única fuente de carbono y nitrógeno y en asparagina más succinato, presenta pozas altas de aspartato, mientras que las mutantes AHZ4 y AHZ7 en estas condiciones presentan pozas altas de asparagina y aspartato comparado a la cepa silvestre (Tabla10). En la condición de amonio-succinato las tres mutantes se comportan de manera similar a la cepa silvestre (Tabla10).

Tabla 10. POZAS DE AMINOACIDOS DE LAS MUTANTES DE *R. etl* CRECIDOS EN DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO

<u>nanomoles/mg de proteina</u>					
Cepa	Medio de Cultivo	Asn	asp	gln	glu
CE-3	Asparagina	1.3	15.9	0.5	32.5
	Asparagina más suc	0.5	4.5	0.5	25.4
	Amonio más suc.	0.2	1.5	0.7	29.6
AHZ1	Asparagina	2.9	380.1	0.2	30.4
	Asparagina más suc.	2.8	592.7	2.2	166.7
	Amonio más suc.	0.3	1.2	1.1	52.2
AHZ4	Asparagina	16.6	158.9	0.4	45.9
	Asparagina más suc	13.7	46.7	1.3	26.6
	Amonio más suc.	0.1	1.2	0.4	19.0
AHZ7	Asparagina	36.6	217.1	0.3	40.8
	Asparagina más suc.	13.4	66.5	0.4	27.1
	Amonio más suc.	0.1	1.0	1.0	29.9

Los aminoácidos se determinaron a las 5 h de crecimiento

FENOTIPO SIMBIOTICO DE LAS MUTANTES AHZ1, AHZ4, AHZ7 DE *R. etli* CON *Phaseolus vulgaris*.

Para conocer el papel del catabolismo de la asparagina durante la simbiosis, se determinó el fenotipo simbiótico de las mutantes AHZ1, AHZ4 y AHZ7. En estos experimentos se determinaron la nodulación, pozas de aminoácidos y la actividad enzimática de la nitrogenasa.

Por cada enzima que se determinó se utilizaron 5 macetas, cada una contenía 6 plantas.

Estas mutantes nodulan de manera similar a la cepa silvestre y no se ve un efecto significativo en relación a la actividad de nitrogenasa (Tabla 11).

TABLA 11. DETERMINACION DE LA NODULACION Y ACTIVIDAD DE NITROGENASA DE LAS MUTANTES AHZ1, AHZ4, AHZ7

<i>Cepa</i>	<i>Peso de nódulos por planta</i> (gr.)	<i>Act. Nitrogenasa</i> % etileno/h/gr.nod.	<i>Act. de Nit.</i> Porcentaje
CE-3	0.065	9.560 (2.4)	100
AHZ1	0.060	6.503 (1.5)	68.03
AHZ4	0.100	6.744 (1.4)	70.54
AHZ7	0.085	5.278 (2.3)	55.21

Los números entre parentesis significa la desviación estándar

Para demostrar que la cepa que infectó a la planta fue la misma con la que se inoculó inicialmente, se determinó el fenotipo de los bacteroides contenidos en los nódulos.

El fenotipo de las bacterias aisladas de los nódulos correspondió al fenotipo de la cepa con la que fueron infectadas.

POZAS DE AMINOACIDOS EN BACTEROIDES

Se determinaron las pozas de aminoácidos en los bacteroides de las mutantes alteradas en el catabolismo de la asparagina para conocer la participación de la asparaginasa y aspartasa durante la simbiosis (Tabla 12). La mutante AHZ1 acumula el doble de asparagina, aspartato y glutamato y la mutante AHZ4 acumula ligeramente más aspartato que la cepa silvestre.

TABLA 12. POZAS DE AMINOACIDOS EN BACTEROIDES*

	CE-3	AHZ1	AHZ4	AHZ7
asn	4.12	8.12	2.76	1.26
asp	3.52	7.61	5.04	1.90
gln	0.74	0.18	0.89	0.43
glu	122.10	206.65	85.44	48.21

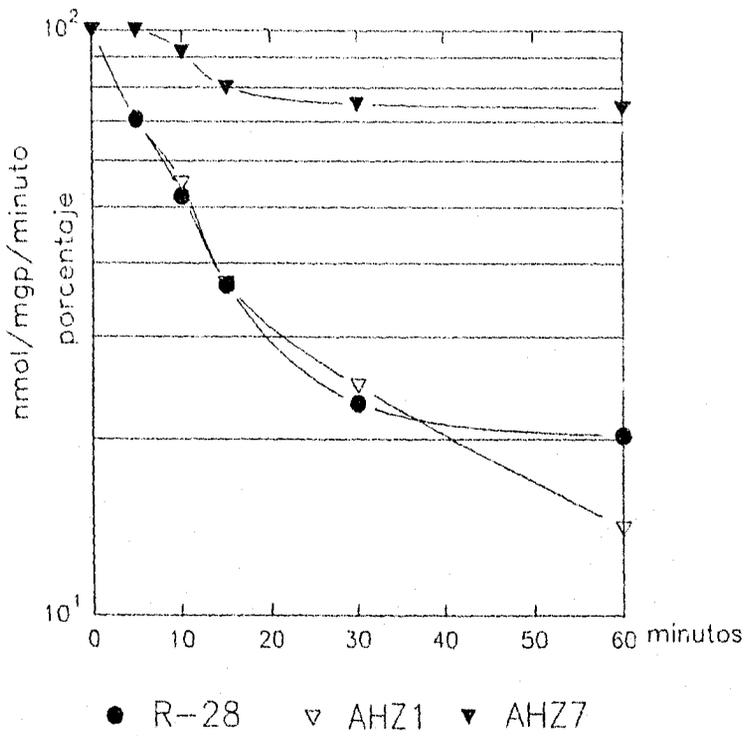
*La concentración de los aminoácidos está expresada nmol/gr de nódulo

TERMOESTABILIDAD DE LA ASPARAGINASA DE *R. etli* Y DE LAS MUTANTES ALTERADAS EN EL CATABOLISMO DE LA ASPARAGINA

En las mutantes AHZ4, AHZ7 hay una actividad residual de asparaginasa, así como pozas altas de asparagina y aspartato nos sugiere la presencia de dos asparaginasas. Debido a esto se determinó la termosensibilidad de la asparaginasa en *R. etli* y en las mutantes AHZ1 y AHZ7.

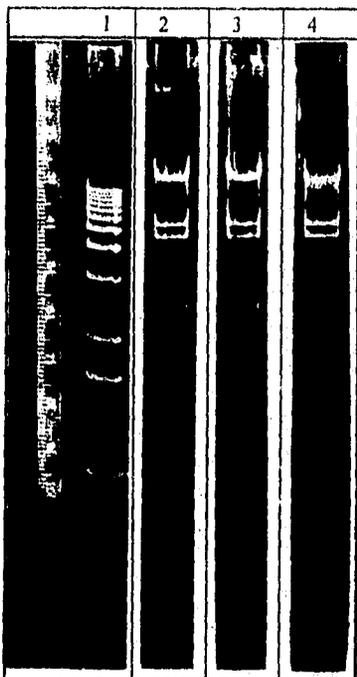
En la cepa silvestre y la mutante AHZ1 se pierde aproximadamente un 80% de la actividad de la asparaginasa después de calentar el extracto 60 minutos a 50°C, mientras que en la mutante AHZ7 sólo se pierde un 10% de la actividad de la asparaginasa al calentar 60 minutos a 50°C. Lo anterior sugiere la presencia de dos asparaginases, una que es la asparaginasa que ha sido mutada en la cepa silvestre que es termolábil y otra que presenta la mutante AHZ7 que es termoestable (Fig. 3).

Fig. 3 Termoestabilidad de la asparaginasa de *R. etli* y de mutantes alteradas en el Catabolismo de la Asparagina



CLONACION DE LOS GENES QUE COMPLEMENTAN A LAS MUTANTES AHZ1, AHZ4 Y AHZ7

Para clonar el fragmento de DNA que complementa a las mutantes AHZ1, AHZ4 y AHZ7 se realizaron tres cruza triparentales; con el banco genómico de *R. elli* que se encuentra en la cepa HB101 de *E. coli*, el plásmido *helper* pRK2073 y con cada una de las mutantes. De cada una de las cruza se purificaron 10 transconjugantes capaces de crecer en asparagina como única fuente de carbono y nitrógeno, de éstas se seleccionaron 2 transconjugantes de cada una de las mutantes, se les extrajo el plásmido para transformar *E. coli*. A las transformantes obtenidas se realizó un patrón de restricción con la enzima *Eco R1*, se observó que todos los plásmidos que complementaban a las mutantes AHZ compartían bandas por lo menos dos fragmentos de 2.6 kb y 2.3kb. Para demostrar que los plásmidos complementaron a las mutantes AHZ y no se trataba de una revertante de la mutación, los plásmidos en la cepa HB101 llamados pAHZ se conjugaron nuevamente con la respectiva mutante, observandose que todos los plásmidos complementaron a las mutantes AHZ nuevamente. Dado que el patrón de restricción con *Eco R1* de los plásmidos que complementaban a las mutantes AHZ eran muy similares se decidió probar si el plásmido que complementaba a cada una de las mutantes AHZ era capaz de complementar a las demás mutantes, se realizó una cruza con los diversos plásmidos; todos los plásmidos complementaron a las tres mutantes. De todos los plásmidos se eligió el pAHZ11 para seguir trabajando. Para determinar el grado de similitud entre los plásmidos pAHZ4 y pAHZ7 se realizó un Southern de estos plásmidos contra el plásmido pAHZ11 se observó que las bandas que comparten hibridan con este plásmido Fig. 4.



**Figura 4. ELECTROFORESIS DE DNA
CON EcoR1.**
1. ladder. 2. pAHZ3, 3. pAHZ11, 4. pAHZ13



Southern
pAHZ11 vs 1. pAHZ1. 2. pAHZ11
pAHZ13

Con objeto de determinar la presencia del transposón: si se trata de una sola inserción del Tn5-mob, así como conocer la localización del Tn5 en las mutantes se realizó una hibridación

con el DNA total de las mutantes contra el plásmido pSUP5011 que contiene el Tn5-mob, se digirió con *Eco-R1* y con *HindIII*. Cuando se digirió con la enzima *EcoR1* el DNA de las mutantes AHZ y se hibridó con el pSUP5011 pudimos observar una sola banda de hibridación lo que indica que las mutantes tienen una sola copia del Tn5-mob, Fig. 5. La hibridación contra el DNA de las mutantes AHZ digerido con *HindIII* mostró fragmentos que fueron diferentes en las tres mutantes, indicando que el Tn5 mob fue insertado en tres lugares diferentes de esas mutantes.

Para conocer si el fragmento de DNA clonado corresponde al fragmento del DNA en donde se insertó el Tn5-mob se realizó otra hibridación con el pAHZ11 digeridos con *Eco-R1* observamos que en la mutante AHZ1 el Tn5-mob desapareció el fragmento de 2.6 kb, mientras que en las mutantes AHZ4 y AHZ7 desapareció el fragmento de 2.3 kb, y en todas ellas aparece un nuevo fragmento del mismo tamaño donde el Tn5-mob había hibridado, Fig. 5. Estos resultados indican que el pAHZ11 contiene el fragmento donde el Tn5-mob fue insertado y que las mutantes fueron el resultado de la inserción del Tn5-mob.

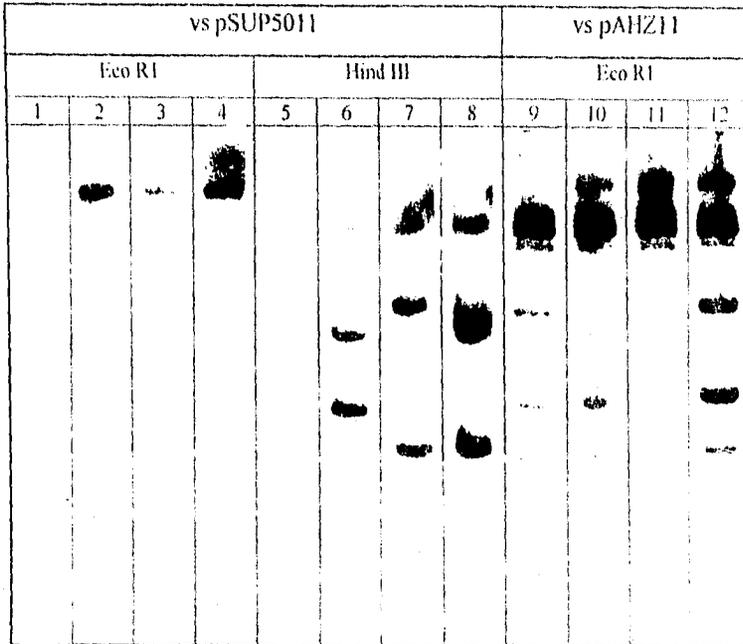


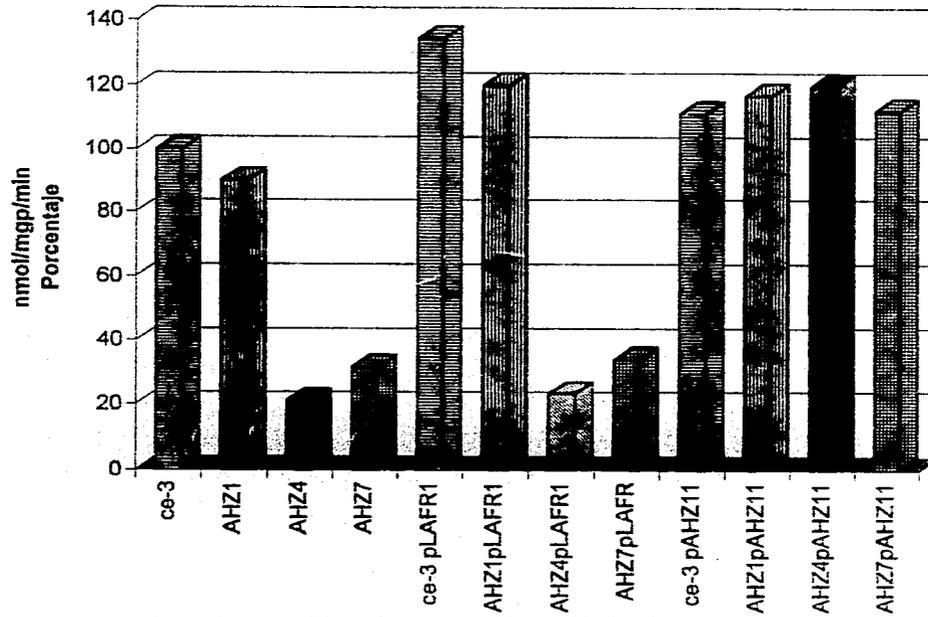
FIGURA 5.
HIBRIDACIONES vs Tn5.

- | | |
|---|---|
| 1) CE-3 digerido con <i>EcoRI</i> . | 7) AHZ4 vs pSUP5011 digerido con <i>HindIII</i> |
| 2) AHZ1 digerido con <i>EcoRI</i> . | 8) AHZ7 vs pSUP5011 digerido con <i>HindIII</i> |
| 3) AHZ4 digerido con <i>EcoRI</i> . | 9) CE-3 vs pAHZ11 digerido con <i>EcoRI</i> |
| 4) AHZ7 digerido con <i>EcoRI</i> . | 10) AHZ1 vs pAHZ11 digerido con <i>EcoRI</i> . |
| 5) CE-3 vs pSUP5011 digerido con <i>HindIII</i> . | 11) AHZ4 vs pAHZ11 digerido con <i>EcoRI</i> |
| 6) AHZ1 vs pSUP5011 digerido con <i>HindIII</i> | 12) AHZ7 vs pAHZ11 digerido con <i>EcoRI</i> . |

Para analizar si el plásmido pAHZ11 lleva clonado el gene que codifica para la asparaginasa y la aspartasa, se determinaron las actividades de dichas enzimas en las

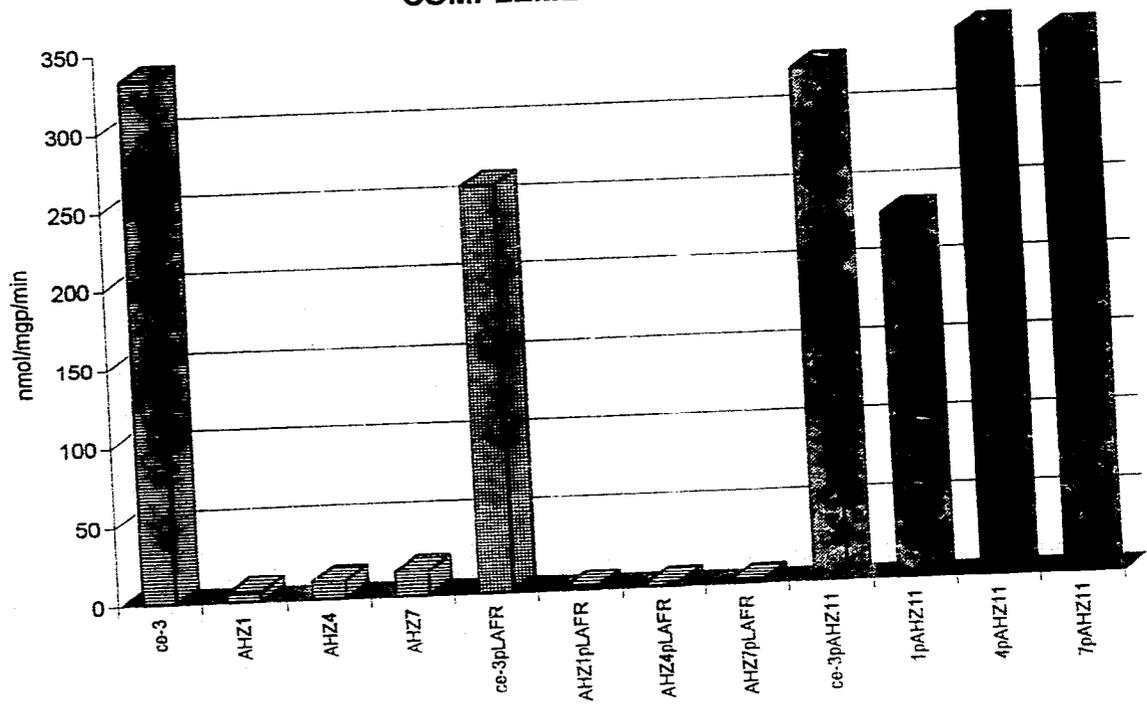
cepas AHZpAHZ11. Los resultados muestran que estas cepas recuperan la actividad de la asparaginasa y aspartasa, de manera similar que la cepa silvestre (Fig. 6 y Fig. 7)

Fig. 6. ACTIVIDAD DE LA ASPARAGINASA DE *R. etli* EN MUTANTES COMPLEMENTADAS



Los extractos celulares fueron obtenidos en Medio Mínimos suplementados con asparagina

Fig. 7. ACTIVIDAD DE LA ASPARTASA DE *R. etli* en MUTANTES COMPLEMENTADAS



DISCUSION

En este estudio hemos demostrado la presencia de la actividad de la asparaginasa y aspartasa de *Rhizobium etli*, enzimas que participan en la degradación de la asparagina. La actividad de la asparaginasa se regula positivamente por su sustrato asparagina (Tabla 2) como en *Bacillus subtilis* (Sun & Setlow, 1991) y *Vibrio proteus* (Sinha *et al.*, 1991) y se regula negativamente por la fuente de carbono como lo muestra la disminución de la actividad de la asparaginasa en medios de cultivo suplementados con asparagina y una fuente de carbono como glicerol o glucosa o succinato (Tabla 2, Fig. 2). Resultados similares se han reportado en *Escherichia coli* (Jennings & Beachman 1993), en *Salmonella enterica* (Jennings *et al.*, 1993) y *Staphylococcus aureus* (Rozalska & Mikucki, 1992). La asparaginasa no está sujeta a represión catabólica por nitrógeno como se muestra en la incapacidad del amonio de reducir la actividad de la asparaginasa (Tabla 2). Cuando se crece a *R. etli* en una fuente mala de nitrógeno se encuentra una actividad baja de asparaginasa, en contraste con lo que se ha reportado de *B. subtilis* (Sun & Setlow, 1991), *Bacillus licheniformis* (Golden & Bemlohr, 1985) y *Saccharomyces cerevisiae* (Roon *et al.* 1982). Los experimentos de microerofilia nos mostraron que la actividad de asparaginasa no fue regulada por la cantidad de oxígeno disuelto en el medio de crecimiento (Tabla 2) en contraste con otras bacterias como *E. coli*, que se induce cuando se limita de oxígeno, en donde se ha propuesto que el papel de ésta enzima en *E. coli* es de proveer de carbono y nitrógeno de la asparagina exógena y principalmente de proveer fumarato como último aceptor de electrones (Jennings & Beachman, 1993); en condiciones de anaerobiosis. En *S. enterica* (Jennings *et al.*, 1993) y *V. proteus* (Sinha *et al.*, 1991) también se regula por oxígeno. La asparaginasa de *R. etli* no se regula en las diferentes fases de crecimiento (no se muestran los datos).

Estos resultados sugieren que la asparaginasa de *R. etli* juega un papel catabólico en la degradación de asparagina a esqueletos de carbono y en la utilización de la asparagina como fuente de nitrógeno, cuando éste aminoácido está presente en el medio de cultivo.

La actividad de la aspartasa fue inducida por la asparagina (Tabla 4) como en *B. subtilis* (Sun & Setlow, 1991) y reprimida por una fuente alterna de carbono, (Tabla 4) como se ha encontrado en *E. coli* (Jennings & Beachman 1990). La actividad de la aspartasa de *R. etli* está sujeta a represión por amonio como lo muestra en la capacidad del amonio de reducir la actividad de la aspartasa cuando se crece a esta bacteria en asparagina más succinato. La actividad de la aspartasa de *R. etli* no está regulada por la cantidad de oxígeno disuelto en el medio de cultivo, en contraste con *E. coli* (Jerlström *et al.*, 1987).

El hecho de que *R. etli* no crece en aspartato como fuente de carbono y nitrógeno a pesar de contener aspartasa, podría explicarse la baja actividad de esta enzima encontrada bajo estas condiciones. El pobre crecimiento de *R. etli* en aspartato no es debido a que carece de fumarasa o glutamino sintetasa ya que la actividad de estas enzimas son similares cuando se crece a *R. etli* en asparagina o aspartato como fuente de carbono y nitrógeno. La actividad más alta de la glutamino sintetasa se obtuvo cuando se creció en aspartato más succinato, en comparación a asparagina succinato lo que indica que el aspartato es una mala fuente de nitrógeno ya que esta enzima se induce bajo condiciones de limitación de nitrógeno (Bravo & Mora, 1988). El pobre crecimiento en aspartato como fuente de nitrógeno y carbono indica la incapacidad de otras enzimas capaces de degradar aspartato bajo estas condiciones tales como la aspartato aminotransferasa, que es la enzima responsable del crecimiento de *Rhizobium meliloti* bajo las mismas condiciones (Rastogi & Watson, 1991, Watson & Rastogi 1993). La baja actividad de aspartasa

encontrada en la condición de glutamato como fuente de nitrógeno y carbono (Tabla 4) indica que la aspartasa no participa en la degradación de glutamato a esqueletos de carbono y que el glutamato debe ser degradado a esqueletos de carbono por otra enzima. Es interesante el papel fisiológico de la aspartasa en *R. etli* ya que se induce por la asparagina permitiendo a *R. etli* utilizar este aminoácido como fuente de carbono y nitrógeno y que no es el de utilizar el aspartato o el glutamato como fuente de nitrógeno y carbono. Esto contrasta con lo que se ha reportado de *B. subtilis* donde la aspartasa es inducida por aspartato y permite a *B. subtilis* crecer en este aminoácido como fuente de carbono y nitrógeno y con lo que se ha encontrado en *E. coli* donde la aspartasa participa en dos procesos metabólicos: en la regeneración de oxalacetato como aceptor de un grupo amino para permitir el crecimiento en glutamato y la formación de fumarato y succinato durante el crecimiento anaeróbico en glucosa (Marcus & Halpern, 1969, Courtright & Henning, 1970).

Para conocer el papel de la degradación de la asparagina en *R. etli* en vida libre y en simbiosis, se obtuvieron y se caracterizaron tres mutantes alteradas en el catabolismo de la asparagina. Estas mutantes crecen pobremente en asparagina como única fuente de carbono y nitrógeno, creciendo en otras fuentes de nitrógeno y carbono.

La mutante AHZ1 presenta actividad de asparaginasa, similar a la cepa silvestre muy baja actividad de aspartasa, presenta pozas altas de aspartato y los niveles de asparagina son similares a los de la cepa silvestre, esto nos sugiere que la mutación se encuentra en el gene de la aspartasa. Las mutantes AHZ4 y AHZ7 tienen una actividad residual de la asparaginasa, y no presentan actividad de aspartasa; estos mutantes presentan pozas altas de asparagina y aspartato. Estos resultados nos indican que se trata de mutaciones que alteran la actividad de la asparaginasa y de la aspartasa y que posiblemente el gene de la asparaginasa se encuentre en un operón como en *B. subtilis* (Dongxu & Setlow 1991),

aunque también es posible que se trate de una doble mutación, o bien que se trate de una mutación en un gene regulador.

La actividad residual de la asparaginasa encontrada en las mutantes AHZ4 y AHZ7 nos sugieren la presencia de otra asparaginasa, esto es: una inducida por su sustrato y otra constitutiva. En *E. coli* se han reportado dos asparaginasas: la asparaginasa I citoplasmática, la cual es producida constitutivamente y la asparaginasa II periplásmica que en el caso de *E. coli* es inducida por anaerobiosis (Chesney 1983).

La diferente termosensibilidad encontrada entre la asparaginasa residual de la mutante AHZ7 y la de la cepa silvestre y la mutante AHZ1, es otra evidencia más que *R. etli* pueda tener dos asparaginasas. La actividad de la asparaginasa de la mutante AHZ7 que es termoestable y que aparentemente es constitutiva la podríamos llamar asparaginasa I, la posible función de ésta enzima puede ser la de mantener el balance de asparagina y aspartato, y la asparaginasa encontrada en la mutante AHZ1 que es termolábil, y que es la enzima que se induce por su sustrato la podríamos llamar asparaginasa II y su principal papel es el de utilizar la asparagina como fuente de carbono y nitrógeno (Fig. 3). Para confirmar la presencia de las dos asparaginasas se podría determinar en un gel nativo, determinando la actividad "in situ".

Se clonó un fragmento de DNA de *R. etli* que complementa a las mutantes AHZ; este fragmento parece contener los genes que codifican para la asparaginasa y la aspartasa ya que la mutante AHZ1 está alterada en la actividad de la aspartasa y las mutantes AHZ4 y AHZ7 alteradas en la actividad de la asparaginasa y aspartasa recuperan su actividad en presencia del plásmido pAHZ11 (Fig. 6 y 7).

El hecho de que con un mismo fragmento de DNA se recuperan tanto la actividad de la asparaginasa como de la aspartasa, así como el hecho de que las mutantes AHZ4 y AHZ7 están alteradas tanto en la actividad de la asparaginasa como en la aspartasa nos

sugiere que la asparaginasa y la aspartasa se encuentran formando un operón. Esto nos indicaría una relación funcional ya que el producto de la asparaginasa es el sustrato de la aspartasa y una co-transcripción de los genes de la asparaginasa y aspartasa como parte de un operón, permitiría degradar la asparagina para ser utilizada como fuente de carbono y nitrógeno.

En bacteroides de *R. etli* hemos encontrado elevadas las actividades de asparaginasa y aspartasa, esto nos sugiere que estas enzimas podrían jugar un papel importante en la degradación de la asparagina durante la simbiosis entre *R. etli* y *Phaseolus vulgaris*. La degradación de la asparagina por la asparaginasa y aspartasa en bacteroides también son importantes en otras especies de *Rhizobium*, como en *R. lupini*, donde estas enzimas se encuentran elevadas (Kretovich *et al.*, 1985), sin embargo encontramos que el fenotipo simbiótico de las mutantes AHZ muestran que la degradación de la asparagina no tiene un papel relevante en la nodulación en la fijación de nitrógeno. Esto puede ser debido a que otras vías puedan compensar la degradación de la asparagina a esqueletos de carbono, así la asparaginasa I podría compensar la falta de la actividad de la asparaginasa II y la aspartasa aminotransferasa podría compensar la falta de actividad de la aspartasa de las mutantes.

CONCLUSIONES

Hemos estudiado las enzimas que participan en la degradación de la asparagina de *Rhizobium elli* y encontramos que para esta bacteria el aspartato no es buena fuente de carbono y nitrógeno a diferencia de la asparagina que es buena fuente de carbono y nitrógeno. Se demostró la presencia de la asparaginasa y de la aspartasa en *R. elli*.

REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ASPARAGINASA:

Se induce por su sustrato.

Se regula negativamente por la fuente de carbono.

No está sujeta a represión calabólica por nitrógeno

No se regula por oxígeno.

REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ASPARTASA:

La actividad de la aspartasa se induce por asparagina.

Se regula negativamente por la fuente de carbono.

Está sujeta a represión por amonio.

No se regula por oxígeno.

Se regula de manera similar que la asparaginasa.

El pobre crecimiento en aspartato no es debido a que carece de otras enzimas como fumarasa y glutamino sintetasa ya que las actividades de estas enzimas son similares cuando se crece en asparagina o aspartato con o sin succinato.

MUTANTES OBTENIDAS

Con la obtención y caracterización de las mutantes pudimos comprobar que la asparagina para ser utilizada como fuente de carbono y nitrógeno primero es degradada por una asparaginasa a aspartato y amonio y después el aspartato es degradado por una aspartasa a fumarato y amonio.

La mutante AHZ1 está alterada en la actividad de la aspartasa.

Las mutantes AHZ4 y AHZ7 están alteradas en la actividad de la asparaginasa y de la aspartasa.

Las mutantes AHZ4 y AHZ7 presentan una actividad residual de la actividad de la asparaginasa.

La diferente termoestabilidad de la asparaginasa de la mutante AHZ7 con respecto a la cepa silvestre y la mutante AHZ1 sugieren que *R. etli* tiene dos asparaginases.

CLONACION DE LOS GENES DE LA ASPARAGINASA Y ASPARTASA

Hemos clonado un fragmento de DNA que complementa a las mutantes AHZ1, AHZ4 y AHZ7. El mismo plásmido complementa a las tres mutantes.

La evidencia de que las mutantes AHZ4 y AHZ7 están alteradas tanto en la actividad de la asparaginasa como en la actividad de la aspartasa, así como el hecho que el mismo plásmido que complementa a la mutante AHZ1 también complementa a las mutantes AHZ4 y AHZ7 nos sugiere que la asparaginasa y la aspartasa se encuentran formando parte de un operón.

LA ACTIVIDAD DE LA ASPARAGINASA Y SU RELACION CON LA FIJACION DE NITROGENO.

Los resultados obtenidos muestran que la degradación de la asparagina en *R. etli* no juega un papel importante durante la simbiosis ya que las mutantes AHZ nodulan y fijan de manera similar a la cepa silvestre. Sin embargo esto puede ser debido a que otras vías pueden compensar la degradación de la asparagina a esqueletos de carbono, así la asparaginasa podría compensar la falta de actividad de la asparaginasa II y la aspartato amino transferasa podría compensar la falta de actividad de la aspartasa de las mutantes.

REFERENCIAS

1. Alfano, J. R., & Kahn, M. L. 1993. Isolation and Characterization of a Gene Coding for a Novel Aspartate Aminotransferase from *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 175 (13): 4186-4196.
2. Appels, M.A., and Haaker, H. 1991. Glutamate oxaloacetate transaminase in pea root nodules: participation in a malate-aspartate shuttle between plant and bacteroid. *Plant Physiol.* 95: 740-747.
3. Arwas, R., McKay, I.A., Rowney, F.R.P., Dilworth, M.J. y Glenn, A.R. 1985. Properties of organic acid utilization mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 300. *J. Gen. Microbiol.* 1313: 2059-2066.
4. Asselin, B., Whitin, J., Coppola, D. Rupp, I. Sallan, S., Cohen, H. 1993. Comparative Pharmacokinetic Studies of Three Asparaginase Preparations. *J. of Clinical Oncology.* 11 (9): 1789-1786.
5. Atkinson, M.R., Fisher, S. H. 1991. Identification of genes and gene products whose Expression is activated during Nitrogen-Limited growth in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 173: 23-37.
6. Bascomb, S. and Betteilhelm, K. A. 1976. *J. Gen. Microbiol.* 92: 175
7. Bender, R.A., Janssen, K. S., Resnick, A.D., Blumenberg, M., Foor, F. / Magasanik, B. 1977. Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* 129: 1001-1009.
8. Bergman, K., Gualash-hofte, M., Huestadt, R.E., Larosiere, R. C., Ronco, P.G. and Su, L. 1988. Physiology of behavioral mutants for *Rhizobium meliloti*: evidence for a dual chemotaxis pathway. *J. Bacteriol.* 170: 3249-3254.
9. Bonthron, D. T. 1990. L-Asparaginase II of *Escherichia coli* K-12: Cloning, mapping and sequencing of the *ansB* gene. *Gene.* 91: 101-105.
10. Bravo, A. Becmil B., Mora, J. 1988. Introduction of the *Escherichia coli* *gdhA* Gene into *Rhizobium phaseoli*: Effect on Nitrogen Fixation. *J. Bacteriol.* 170.(2): 985-988
11. Bravo, A., Martinez, L. M., Mora, Y., Du Pont G., Calderón J. and Mora, J. 1990. A *Rhizobium phaseoli* mutant pleiotropically affects succinate utilization GSII activity and N₂ fixation. In Nitrogen fixation: Achievements and Objectives. De. P. M. Gresshoff, L. Evans Roth, G. Stacey y W. E. Newton. Chapman and Hall, New York, USA. London, UK. 516.
12. Broome, J. D. 1967. Studies on the mechanism of tumor inhibition by L-asparaginase. Effects of the enzyme in asparagine levels in the blood, normal tissue and 6C3HED lymphomas of mice: Differences in asparagine formation and utilization in asparaginase-sensitive and resistant lymphoma cells. *J. Exp. Med.* 127: 1055-1072.
13. Brown, C. & Dilworth, M. 1975. Ammonia Assimilation by *Rhizobium* Cultures and Bacteroids. *Journal of General Microbiol.* 86: 39-48
14. Caetano-Anollés, G., Cris-Estes, D.K. and Bavar, W.D. 1988. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *J. Bacteriol.* 170: 3164-3169.
15. Callahan, D. A. and Torrey, J. G. 1981. The structural basis for infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can. J. Bot.* 59: 1647-1664.
16. Callow, D. S. Capell, B. J. & Evans, C. G. 1971. Experimental continuous culture production of the enzyme L-asparaginase by *Erwinia carotovora*. *J. of Gen. Microbiol.* 65: ii.
17. Cedar, H., and Schwartz, J. H. 1969. a). The asparagine synthetase of *Escherichia coli* II. Studies on mechanism. *J. Biol. Chem.* 244: 4122-4127.
18. Cedar, H., and Schwartz, J. H. 1969. b). The asparagine synthetase of *Escherichia coli* I. Biosynthetic role of the enzyme, purification and characterization of the reaction products. *J. Biol. Chem.* 244: 4112-4121.
19. Cedar, H., and Schwartz, J. H. 1967. Localization of the two L-Asparaginases in anaerobically grown *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 242: 3753-375.
20. Courtright, J. B. & Henning, U. 1970. Malate dehydrogenase mutants of

- Escherichia coli* K-12, J. Bacteriol 102: 722-728.
21. Cronin, V. B., B. Maras, D. Barra, and Doonan S. 1991. The amino acid sequence of the aspartate aminotransferase from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Biochem. J. 277: 335-340.
 22. Chaney, A.L. and Marbach, E.P. 1962. Modified reagents for the determination of urea and ammonio. Clin. Chem. 8: 130-132.
 23. Cheetham, P.S. 1985. Handbook of Enzyme Biotechnology, chapter 3, Wiseman A., ed., Ellis Horwood Limited, Chichester, UK. 275.
 24. Chesney, R. H., Sollitt, P. and Vickery, D. R. 1985. Identification of a New locus in the *Escherichia coli* Cotransduction Gap that represents a New genetic Component of the L-Asparagine Utilization System. 131: 2079-2085.
 25. Chesney, R. H. 1983. *E. coli* L-asparaginase II production in the presence and absence of catabolite activator protein. FEMS Microbiol. Letters 17: 161-162.
 26. Chuang, J. J., Yu, C. L., Wang, S. R., 1990. Modulation of Lymphocyte proliferation by enzymes that degrade amino acids. Clin. Exp. Immunol. 82: 469-472.
 27. Dazzo, F. and Gardiol, A. 1984. Host specificity in *Rhizobium-legume* interactions. In: Genes involved in microbe plant interactions. New York Springer Publisher. De. D. P. S. Verma. 3-31.
 28. De Bruijn, F. J., and J. R. Lupski 1984. The use of transposon Tn5 mutagenesis in the rapid generation of correlated physical and genetic maps of DNA segments cloned into multicopy plasmids - a review. Gene 27: 131-149.
 29. Dei Casale, T., Sollitt, P. & Chesney, R. 1983. Cytoplasmic L-asparaginase: isolation of a defective strain and mapping of *ansA*. J. Bacteriol. 154: 513-515
 30. Delwiche, C. C. 1970. The Nitrogen cycle. Scient Amer. 223: 136-146.
 31. Delwiche, C.C. 1981. The cycle of nitrogen and nitrous oxide. John Wiley and Sons, Inc: 1-15
 32. Dilworth, M. and Glenn 1984. How does a legume nodule work? Trends Biochem. Sci. 9: 519-523.
 33. 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 or *Rhizobium meliloti*. Proc Natl Acad. Sci. USA. 77: 77347-7351
 34. Dongxu, S., Setlow, P. 1991. Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression of the *Bacillus subtilis* *ans* Operon, which Codes for L-Asparaginase and L-Aspartase. J. Bacteriology, 173: 3831-3845.
 35. Durán S. and Calderón J. 1995. Role of the glutamine transaminase- ω amidase pathway and glutaminase in glutamine degradation in *Rhizobium etli*. Microbiol. 141: 589-595.
 36. Earl, C. D., Ronson, C. W. and Ausubel, F. M. 1987. Genetic and structural analysis of the *Rhizobium meliloti* *fix A*, *fix B*, *fixC* and *FixS* genes. J. Bacteriol. 169: 1127-1136.
 37. Figurski D. H. and Hellinski D. R. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK12 dependent of a plasmid function provided in trans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 1648-1652.
 38. Finan, T.M., Wood, J.M. y Jordan, D.C. 1963. Symbiotic properties of C₄-dicarboxylic acid transport mutants of *Rhizobium leguminosarum*. J. Bacteriol. 154: 1403-1413.
 39. Gantt, J. S., Larsom, R. J., Farnham, M.H., Palhtrana, S.M. Miller, S.S. and Vance C.P. 1992. Aspartate aminotransferase in effective and ineffective alfafa nodules: cloning of a cDNA and determination of enzyme activity, protein, and mRNA levels. Plant Physiol. 98: 868-878.
 40. Gardiol, A. E., Truchel, G. L. and Dazzo, F. B. 1987. Requirement of Succinate Dehydrogenase Activity for Symbiotic Bacteroid Differentiation of *Rhizobium*

- melioti* in Alfafa Nodules. *App. and Env. Microbiol.* 53 (8): 1947-1950.
41. Gardiol, M. J., Arias, A., Cervansky, C., Martinez-Dreis, G. 1982. Succinate dehydrogenase mutant of *Rhizobium melioli*. *J. Bacteriol.* 151: 1821-1823.
 42. Gilbert, H. J., Blazek, R., Buliman, H. M., Minton, N. P. 1988. Cloning and Expression of the *Erwinia clytranthemi* Asparaginase Gene in *Escherichia coli* and *Erwinia carotovora*. *J. of Gen. microbiol.* 132: 151-160.
 43. Glenn, A.R. and Dilworth, M.J. 1981. Oxidation substrates by isolated bacteroids and free-living cells of *Rhizobium leguminosarum* 3841. *J. Gen. Microbiol.* 126: 243-247.
 44. Glenn, A.R., McKay, I.A., Arwas, R. y Dilworth, M.J. 1984. Sugar metabolism and symbiotic properties of carbohydrate mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 130: 239-245.
 45. Golden, K. J. & Bemlohr, R. W. 1985. Nitrogen catabolite repression of the L-asparaginase of *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* 164, 938-940.
 46. Hanns, E., Wehner, A., Jennings, M., Pugh, K., Beacham, I., Röhm, K. 1991. Construction of Expression Systems for *Escherichia coli* Asparaginase II and two Step Purification of the Recombinant Enzyme from Periplasmic Extracts. *Protein Expression and Purification* 2, 144-150.
 47. Higgins, C., Dorman, C., and Bhrain, N. 1990. Environmental influences on DNA supercoiling: a novel mechanisms for the regulation of gene expression. In the Bacterial chromosome. Drlica, K., and Riley, M. (eds). Washington: American Society for Microbiol. 421-431.
 48. Ho, P.P.K, Millkin, E. B. Bobbit Jesse, E. Grinnan, E. L. Burck, P. J., Frank, B. H., Boeck La V. Squires R. W. 1970. Crystalline L-Asparaginase from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 245. (14): 3708-3715.
 49. Howard, J. B. and Carpenter, F.H. 1972. L-Asparaginase from *Erwinia carotovora*: Substrate specificity and enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* 247: 1020-1030.
 50. Humbert, R., and Simoni, R. 1980. Genetic and Biochemical Studies Demonstrating a second gene coding for asparagine synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 142: 212-220.
 51. Jennings M.P. and Beachman I. R. 1993. Co-dependent positive regulation of the *asnB* promoter of *Escherichia coli* by CRP and the FNR protein: a molecular analysis. *Molecular Microbiol.* 9 (1): 155-164.
 52. Jennings, M.P. and Beachman I.R. 1990. Analysis of the *Escherichia coli* gene encoding L-asparaginase II *asnB* and its regulation by cyclic AMP receptor and FNR proteins. *J. Bacteriol.* 172: 1491-1498.
 53. Jennings, M.P. Scott, S.P. & Beachman I. R. 1993. Regulation of the *asnB* gene of *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol* 9 (1): 165-172.
 54. Jerström, P.G. Ljul J., & Beachman I. R, 1987. Regulation of *Escherichia coli* L asparaginase II and L-aspartase by the *fnr* gene product. *FEMS Microbiol. Letters* 41: 127-130.
 55. Jerström, P.G. Bozjak, D.A., Jennings, M.P. and Beachman I.R. 1989. Structure and expression in *Escherichia coli* K-12 of the L- asparaginase I-encoding *ansA* gene and its flanking region. *Gene* 78: 37-46.
 56. Jones. G. E. 1985. *Saccharomyces cerevisiae* Mutants Resistant to B-L-Aspartylhydroxamate. *J. of General Microbiology.* 131: 2253-2261.
 57. Kahn, D.H., Kraus, J. y Somerville, J.E. 1983. A model for nutrient exchange in the *Rhizobium-leguma* symbiosis. In: Nitrogen fixation Research Progress. H.J. Evans, P.J. Bottomley y W.J. Newton, eds. Martinus Nijhoff, Dordrecht. 193-199.
 58. Karsten. W. E & Viola R. E. 1991. Kinetic Studies of L-Aspartase from *Escherichia coli*: pH-dependent Activity Changes. *Archives of Biochemistry and Biophys.* 287 (1): 80-87.
 59. Khan, A.A., Pal, S.P., Roughavan, S.R. and Bhattacharya, P.K. 1970. Studies on *Serratia marcescens* L-asparaginases.

- Biochim Biophys. Res. Commun 41: 525-528.
60. Kretovich V, Sidel'Nikova L, Ivanushkin A., Karyakina T., 1985 Localization of Aspartase, Asparaginase and Glutaminase in intact bacteroids of *Rhizobium lupini*. Prikl. Biokhim Mikrobiol. 20 (4): 445-447
61. Lee S, Wroble M., Ross J., 1989. L-Asparaginase from *Erwinia carotovora*. Applied Biochem. and Biotechnol. 22: 1-11.
62. Libbenga, KJ, Harkes, P. 1973. Initial Proliferation of cortical cells in the formation of root nodules in *Pisum sativum*. Planta. 114: 17-28
63. Lowry O.H. Rosebrough N. J. Farr A. L. Randall R. J. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biological Chem. 193: 265-275.
64. Maniatis, T., Sambrook, M. and Fritsch E.F. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor laboratory Press. Vol. 1, 2, 3. 1.9, 9.49
65. Marcus, M. & Halpem, Y. S. 1969. The metabolic pathway of glutamate in *Escherichia coli* K-12 Biochim. Biophys. Acta 177: 314-320.
66. Miller M, Mohana Rao J. K., Wlodawer A. Gribskoc M. R. 1993. A left-handed crossover involved in amidohydrolase catalysis. 328: 275-279.
67. Miyamoto K., & Katsuki Hirohiko. 1992 Possible Physiological Roles of Aspartase, NAD- and NADP-Requiring glutamate Deshydrogenases of *Pseudomonas fluorescens*. J. Biochem. 112: 52-26.
68. Newcomb W. 1981. Nodule morphogenesis. International review of cytology. Supplement 13, G.H: Boume y J. Danlelli, eds. New York: Academic Press. 245-298.
69. Nikolaev A. Y. Evseev, L. P. Tyulpanova E.S. and Abdumalikov, A. Kh. 1969. Isoenzymes of asparaginase in *Pseudomonas sp.* Biokhimiya 34: 352
70. O'Gara, F. y Shanmugan, K.T. 1976. Regulation of nitrogen fixation by *Rhizobia*: export of fixed N₂ as NH₄. Biochim. Biophys. Acta., 437, 313-321.
71. Osorio, A., Camarena L., Salazar, G., Noll-Louzada, Martha, Bastarrachea, F. 1993. Nitrogen Regulation in an *Escherichia coli* strain with a temperature sensitive glutamyl-tRNA synthetase. Mol. Gen. Genet. 239: 400-408.
72. Rastogi, V.K. y Watson R.J. 1991. Aspartate aminotransferase activity is required for aspartate catabolism and nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 173: 2879-2887.
73. Reibach P., Mask P., Streeter J. 1981, A rapid one step method for the isolation of bacteroids from root nodules of soybean plants, utilizing self-generating Percoll gradients. Can. J. Microbiol. 27: 491-495
74. Rej, R. & Harder, M. 1987. Aspartate aminotransferase. In Methods of enzymatic analysis. Edited by Bergmeyer Federal Republic of Germany: VCH. 3: 418-444
75. Resnick A.D., Magasanik B., 1976: L-asparaginase of *Klebsiella aerogenes* activation of this synthesis by glutamine synthetase. J. Biol. Chem. 251: 2722-2728.
76. Rigby, P. W., Dieckmann, C. R. Berg, P., 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113: 237-251.
77. Robertson, J. G., Lyttleton, P., Bullivant, S., and Graystone, G. 1978. Membranes in lupin root nodules. I. The role of Golgi bodies in the biogenesis of infection threads and peribacteroid membranes. J. cell. Sci. 30: 129-149.
78. Ronson, C.W., Astwood, P.M. y Downie, J.A. 1984. Molecular cloning and genetic organization of C₄-dicarboxylate transport genes from *Rhizobium leguminosarum*. J. Bacteriol. 160: 903-909.
79. Ronson, C.W., Lyttleton, P.L. y Robertson, J.G. 1981. C₄-dicarboxylate transport mutants of *Rhizobium trifolii* form ineffective nodules on *Trifolium repens*. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78: 4284-4288.

80. Roon, R.J., Murdoch, M., Kunze, B., Dunlop, P. 1982. Derepression of Asparaginase II during Exponential Growth of *Saccharomyces cerevisiae* on Ammonium Ion. Arch. Biochem. and Biophys. 219: 101-109.
81. Rózsalska M & Mikucki J. 1992. Staphylococcal L-Asparaginase: Catabolic Repression of Synthesis. Acta microbiologica Polonica. 41: 145-150.
82. Russell L. & Yamasaki 1978. The dependence of *Escherichia coli* asparaginase II formation on cyclic AMP and cyclic AMP receptor protein. Can J. Microbiol. 24: 629-631.
83. Salminen, S.O. y Streeter, J.G. 1987. Involvement of glutamate in respiratory metabolism of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. J. Bacteriol. 169: 495-499.
84. Scofield, M., Lewis, W., Shuster, S. 1990. Nucleotide Sequence of *Escherichia coli* *asnB* and Deduced Amino acid Sequence of Asparagine Synthetase B. The J. of Biol. Chem. 265 (22): 12895-12902.
85. Scott D. B., Farnham K.J.F. y Robertson J.G. 1979. ammonia assimilation in lupin nodules. Nat. 283: 703-705.
86. Schetgens, R. M.P., Hontelez, J. G. J., Van den Bos, R. C., and Van Cammen, A. 1987. Identification and phenotypical characterization of a cluster of fix genes, including a *nif* regulatory gene, from *Rhizobium leguminosarum*. Mod. Gen. Genet. 200: 366-374.
87. Segovia, L., Young, P.W. & Martínez Romero, E. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I as *Rhizobium etli* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 43: 374-377.
88. Shwartz J., Broome J. 1967. Differences in the production of L-asparagine in asparaginase sensitive and resistant lymphoma cells. Biochim Biophys. Acta 136: 837-839.
89. Simon, R., O'Connell M., Labes M., and Pühler. Plasmid Vectors for the Genetic Analysis and Manipulation of Rhizobia and other Gram Negative Bacteria. 1988. Plant Molecular Biology. Edit Arthur Weissbach. Herber Weissbach. Academic Press. Inc. 640-659.
90. Sinha, A., Manna, S., Roy, S., Chakrabarty, S. 1991. Induction of L-asparaginase synthesis in *Vibrio proteus*. Indian J. Med. Res. 93: 289-292.
91. Sobis M & Mikucki J. 1991. Staphylococcal L-asparaginase: Enzyme Kinetics. Acta Microbiologica Polonica. 40: 143-152.
92. Sonenshein, A.L. 1980. Metabolic regulation of sporulation and the other stationary phase phenomena.. In I. Smith R.A. Slepecky, and Sellow (ed.), Regulation of prokaryotic development. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 109-130.
93. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-518.
94. Spring K. J., Jerstrom, P. G. Burns, D. M. and Beacham I. R. 1986. L-Asparaginase Genes in *Escherichia coli*: Isolation of Mutants and Characterization of the *ansA* Gene and Its Protein Product. J. Bacteriol. 168 (1): 135-142
95. Sliit Mark. 1984. Fumarase. In methods of enzymatic analysis, Edited by Bergmeyer. Weinheim Deerfield Beach. Florida. 3rd. De. 4, 359-362.
96. Slowers, M. D. 1985. Carbon metabolism in *Rhizobium* species. Ann. Rev. Microbiol. 39: 89-81.
97. Sun. D. Sellow P. 1991. Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression of the *Bacillus Subtilis ans* Operon, with codes for L-Asparaginase and L-Aspartase. J. Bacteriol. 173. (12): 3831-3845.
98. Sutton, W. D., Pankurst, C. E. and Craig, A. S. 1981. The *Rhizobium* bacteroid state. In International review of cytology, Supplement 13. De. G. H. Boume and J. F. Danielli, New York Academic Press, 149-177.
99. Swain, A., Jaskólski, M., Housset, D., Mohana Rao, J., Wlodawer, A. 1993. Crystal Structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer Therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 1474-1478.

100. Szeto W., Nixon T., Ronson C., Ausubel F. 1987. Identification and Characterization of the *Rhizobium meliloti* ntrC Gene: *R. meliloti* has separate Regulatory Pathways for Activation of Nitrogen Fixation Genes in Free Living and Symbiotic Cells. *J. Bacteriol.* 169: 1423-1432.
101. Ta, T.A., Macdonald, F.D. H., and Faris M.A. 1989. Asparagine synthetase from root nodules of alfalfa. *Biochem. Cell Biol.* 67: 455-459.
102. Takagi, J. S., Tokushige, M., Sakamoto, H., & Shimura, Y., 1985. Cloning and nucleotide sequence of the aspartase gene of *Escherichia coli* W. *Nucleic Acids Res.* 13: 2063-2074.
103. Takagi, J., Fukunaga, R., Tokushige, M., and Katsuki, H. 1984. Purification, Crystallization, and molecular properties of aspartase from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biochem.* 96: 545-552.
104. Tewari Y. B. 1990. Thermodynamics of Industrially- Important, Enzyme-Catalyzed Reactions. *App. Biochem. and Biotec.* 23: 187-203.
105. Tokushige, M., 1985. *Methods Enzymol.* 113: 618-627.
106. Tokushige, M., Miyamoto, K., & Katsuki, H. 1979. *J. Biochem.* 85: 1415-1420.
107. Tubb, R.S. 1976. Regulation of nitrogen fixation in *Rhizobium sp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 483-488.
108. Uden, G., & Duchene, A. 1987. On the role of cyclic AMP and the FNR protein in *Escherichia coli* growing anaerobically. *Arch. Microbiol.* 147: 195-200.
109. Vance, C. P. and G. H. Helcho 1991. Carbon in N₂ Fixation: limitation or exquisite adaption. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 42: 373-392.
110. Verma, D., and Long, S. 1982. The molecular biology of *Rhizobium*-plant symbiosis. In: *Inter. Symbiosis. De. K. Jeon.* New York: Academic Press. 211-245.
111. Wade H. 1980. Synthesis and Functions of Microbial Asparaginases and Glutaminases. *Microorganisms and Nitrogen Sources.* Edited by. J. W. Payne. 563-575.
112. Watson, R. J. & Rastogi, V, K. 1993. Cloning and nucleotide sequencing of *Rhizobium meliloti* aminotransferase genes: an aspartate aminotransferase required for symbiotic nitrogen fixation is atypical. *J. Bacteriol.* 175: 1910-1928.
113. Watson, R., 1990. Analysis of the C4-dicarboxylate transport genes of *Rhizobium meliloti*: nucleotide sequence and deduced products of dctA, dctB and dctD. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 3: 174-181
114. Willis, R.C. and Woolfolk, C.A. 1974. Asparagine utilization in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 118: 231-241
115. Yao, P. Y. and Vincent, J. M. 1969. Host specificity in the root hair curling factor of *Rhizobium sp.* *Aust. J. Biol. Sci.* 22: 413-423.
116. Yarosh, O. K., Charles, T. C. and Finan, T.M. 1989. Analysis of C4-dicarboxylate transport genes in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* 3: 813-823.

Paper No. 20479

Editorial Office

Marlborough House, Basingstoke Road
Spencers Wood, Reading RG7 1AE
United Kingdom

Telephone: (01734) 885577
Fax: (01734) 885656

Dr J Calderón
Inst. de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma
de México
Apdo Postal 70228
México D.F. C.P. 04510

22 December 1995

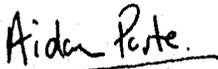
Dear Dr Calderón

Asparagine degradation in *Rhizobium etli*

I am pleased to tell you that your paper has been accepted for publication.

When the paper is sent to press, I will let you know when you can expect to receive the proofs.

Yours sincerely



Dr Aidan C Parte
Staff Editor

ACP/SLJ

microbiology

Paper No. 20665

Editorial Office

Marlborough House, Basingstoke Road
Spencers Wood, Reading RG7 1AE
United Kingdom
Telephone: (01734) 885577
Fax: (01734) 885656

Dr J Calderón
Depto de Biotecnología
Instituto de Investigaciones
Biomédicas
Unviersidad Nacional Autónoma
de México
Apdo Postal 70228
México DF CP 04510

17 January 1996

Dear Dr Calderón

Isolation and characterization of *Rhizobium elli* mutants altered in the degradation of asparagine

I acknowledge receipt of the above paper. It will be considered for publication as quickly as possible.

The paper has been assigned the reference number shown above. Please quote this number in any correspondence.

A copyright transfer form for your paper is enclosed; please complete and return this form now. Note that the copyright transfer is effective only if the paper is accepted for publication.

Your attention is drawn to the enclosed guidelines on the submission of manuscripts on disk.

Yours sincerely

Aide-Éte.

(on behalf of the Editors)