

302
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

REGULACION DEL GEN *asn B*
EN *Escherichia coli*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

J. SERGIO CASAS FLORES



DIRECTOR DE TESIS: DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJIA

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR
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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENMA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Regulación del gen asnB en Escherichia coli"

realizado por Casas Flores J. Sergio

con número de cuenta 8634940-2 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dra. Rosa Laura Camarena Mejía

Propietario Dra. Patricia Ramos Morales

Propietario Dr. Rene Cárdenas Vázquez

Suplente Dr. Jorge Luis Folch Mallol

Suplente Dra. Luisa Alvarado Alba

Facultad de Ciencias
Consejo Departamental de Biología
COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

DEDICATORIA

A mis padres: Fermín y Barbara, por su apoyo incondicional y por ser un ejemplo a seguir en la vida.

A mis hermanos: Verónica, Ma. de los Angeles, Judit y Fermín, por compartir tantas cosas y por aguantar tantas de mis locuras. Los quiero mucho.

A la dueña de mis quincenas: Ariana, mi linda sobrinita.

A mis tíos: Manuel y Miguel, porque con ellos compartí y aprendí muchas cosas que nunca voy a olvidar.

A mi abuelo Manuel, pocos como éste viejo.

A mis tíos: Virginia y Juvenal, por el cariño y apoyo que siempre me han brindado.

A la Dra. Laura Camarena, por tantas enseñanzas y por ser tan linda persona.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Camarena Mejía, por su entera disposición para la dirección de éste trabajo.

A los integrantes de mi comité tutorial: Dra. Patricia Ramos Morales, Dr. René Cárdenas Vázquez, Dra. Luisa Alvarina Alba Lois y al Dr. Jorge Luis Fofelí Mallol, por tan acertadas y sabias sugerencias y aportaciones para la realización de ésta tesis.

A Aurora Osorio, por la asesoría técnica brindada y por tantos consejos y tips durante el desarrollo de éste trabajo.

Al Dr. Jorge Nieto Sotelo, por los consejos y apoyo brindados para la realización de éste tesis.

A mis excompañeros de laboratorio: Norma Isabel García Calderón, Montserrat Sordo, Martha Noll Louzada, Benjamín Alvares y a la señora Julia por sus comentarios y aportaciones.

A Lucía López y Nicolás López, ellos saben porque.

A Claudia Segal por echarle un ojo a este trabajo antes de las revisiones y por ser buena amiga y compañera de laboratorio.

A mis nuevos compañeros de laboratorio: Anita Vega, Luz María Martínez, Kannan, Yoloxochitl Sánchez, Esperanza Benítez, Adriana Garay, "El Chema", Claudia Smith, Oscar Mascorro, Blanca, Magda, Rosy y a "La Nievecitas", porque saben ser buenos cuates y compañeros.

A la banda pesada de la Facultad de Ciencias: "El Tyson", "El Abuelo", "El Loco", "El Globero", "El Cabro", "El Cano", "El Neto", "El Amigo", "El Gume", "El Paco", "El Droopi", "El Nurse", "El Perro", "El Panadero", "El Choco", "El Simón", "El Trompas", "El Chirinos", "El FOY", "El Chabelo", "El Louis", "La Juligan", "La Negra", "La Loca", "La Miriam", "La Eva", "La Liz", Paty, Betza, Eli, "El Vaquero", Caro. Sin duda alguna muchos de ésta banda hacen falta en ésta lista, a todos ellos y a los mencionados muchas gracias por todas las aventuras vividas y por vivir.

A don Javier Apodaca, él también sabe porque.

Este trabajo se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en el Laboratorio de la Dra Laura Camarena.

Este trabajo fué financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el proyecto 4739-N9406.

INDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCION. | 3 |
| OBJETIVOS | 17 |
| MATERIALES Y METODOS. | 18 |
| Cepas bacterianas: | 18 |
| Condiciones de cultivo. | 18 |
| Preparación de lisados P1 <i>virA</i> : | 19 |
| Titulación de P1 <i>virA</i> . | 20 |
| Transducción con P1 <i>virA</i> . | 20 |
| Obtención de lisados de <i>MudXy Mud11734</i> , por inducción con temperatura, y generación de las fusiones transcripcionales del gen <i>asnB</i> con el gen <i>lacZ</i> . | 20 |
| Determinación de la actividad enzimática de Glutamino Sintetasa (GS). | 22 |
| Determinación de la actividad enzimática de GOGAT. | 23 |
| Determinación de proteína por el método de Lowry | 24 |
| Determinación de la actividad específica de β -galactosidasa | 25 |
| Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa. | 25 |
| Extracción de DNA cromosomal de bacteria | 26 |
| Purificación de RNA total | 27 |
| Hibridación tipo Northern (DNA-RNA) | 28 |
| Hibridización DNA-DNA (Southern blot). | 30 |
| Obtención de la sonda del operon <i>glbDF</i> | 32 |
| Obtención de la sonda de <i>asnB</i> : | 32 |
| Marcaje de la sonda de DNA. | 33 |

| | |
|---|----|
| RESULTADOS. | 34 |
| Mutagénesis con el bacteriófago <i>MudX</i> | 34 |
| Mutagénesis con el bacteriófago <i>Mud11734</i> | 36 |
| Determinación de la actividad transcripcional de la fusión realizada con el gen reportero <i>lac Z</i> en función de la actividad específica de β -galactosidasa en la cepa MX4000. | 36 |
| Hibridación tipo Northern para determinar la actividad transcripcional del gen <i>asnB</i> en la cepa silvestre (MX614) en diferentes fuentes nitrogenadas. | 38 |
| Actividades específicas de GS en diferentes condiciones de nitrógeno en las cepas MX4000 y MX614. | 41 |
| Actividad específica de GOGAT en diferentes condiciones de nitrógeno para las cepas MX614 y MX4000. | 43 |
| Hibridación tipo Southern de las cepas MX614, MX4000 y MX4003, con la sonda específica del operon <i>glbBDF</i> . | 43 |
| Hibridación tipo southern de las cepas MX614, MX4000 y la MX4003, con la sonda específica de <i>asnB</i> . | 44 |
| Determinación de la actividad transcripcional del gen <i>asnB</i> en función de la actividad específica de β -galactosidasa. | 44 |
| DISCUSION. | 50 |
| CONCLUSIONES. | 56 |
| BIBLIOGRAFIA. | 57 |

RESUMEN

Las bacterias entéricas como *Escherichia coli* usan amonio y una gran cantidad de compuestos que contienen nitrógeno para sintetizar compuestos nitrogenados esenciales para el crecimiento celular.

Los intermediarios clave en la biosíntesis celular de compuestos nitrogenados son la glutamina y el glutamato. La síntesis de glutamina es llevada a cabo por la glutamino sintetasa (GS) y la síntesis de glutamato por las enzimas glutamato deshidrogenasa (GDH) y glutamato sintasa (GOGAT) (Magasanik, 1982).

En el metabolismo nitrogenado de *Escherichia coli* existen otras enzimas que sintetizan biomoléculas importantes como la asparagina, la cual, es sintetizada por dos enzimas: una asparagina sintetasa dependiente de amonio (*asnA*), y una asparagina sintetasa dependiente de glutamina (*asnB*).

El objetivo principal de este trabajo fue aislar y caracterizar una mutante en el gen *asnB* de *Escherichia coli* para estudiar la regulación transcripcional de este gen, y si ésta regulación es dependiente de la fuente de nitrógeno suministrada en el medio de crecimiento. También se planteó el dilucidar si el gen *asnB* en esta bacteria tiene un vínculo con el los sistemas *Ntr*.

Los resultados de las actividades enzimáticas para GS y GOGAT de la cepa MX4000 y su comparación con los de la cepa silvestre (MX614) permitieron predecir que la inserción de *LacZ* posiblemente se encontraba en el operón *glbBDF*, esto fue confirmado con las hibridaciones tipo southern de ambas cepas, donde la mutante presento un patrón diferente al de la cepa silvestre., estos resultados aunados a los obtenidos para β -galactosidasa permitieron plantear la siguiente hipótesis: la activación de *glbB* en fuentes limitantes de nitrógeno, puede estar mediada por la proteína Lpr. De este modo, la fuente limitante de nitrógeno o de aminoácidos cuya degradación es lenta, puede provocar por algún mecanismo la disminución en los niveles intracelulares de Lrp y con ello disminuir la transcripción del operón *glbBDF*.

Sin embargo, se observaron valores elevados de β -galactosidasa en glutamina, esto puede explicarse por el hecho de que la glutamina asimilada es convertida a glutamato y esta conversión es llevada a cabo principalmente por la GOGAT. De esta manera, si Lrp fuera el único regulador de GOGAT,

sería necesario que en ciertas condiciones de limitación de nitrógeno (como glutamina) la poza de Lrp no disminuyera, o bien, considerar un mecanismo de control alternativo sobre la síntesis de GOGAT en estas condiciones nitrogenadas.

Los análisis tipo southern (hibridación DNA-DNA) realizados para la cepa mutante MX4003 permitieron demostrar que la inserción del gen reportero *LacZ* en esta mutante se encuentra en el gen *asnB*, puesto que presentó un patrón de hibridación DNA-DNA diferente al de la cepa silvestre (MX614), usando como sonda específica el producto de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) del gen *asnB*.

A diferencia de los resultados reportados para mutantes *asnB* de *K. aerogenes*, la cepa MX4003 sí crece en arginina como única fuente de nitrógeno en el medio de crecimiento, y por lo tanto, no presenta fenotipo *Ntr*.

Los valores de β -galactosidasa que se obtuvieron para la cepa MX4003 son más elevados en alto amonio (15 mM) en relación a los obtenidos en bajo amonio (0.5 mM) en tanto que los valores más altos se obtuvieron cuando las células se crecieron en glutamina como fuente de nitrógeno, estos valores concuerdan con los experimentos de hibridación DNA-RNA usando como sonda específica al gen *asnB*. Cuando las células se crecieron en asparagina como fuente de nitrógeno se obtiene una actividad muy parecida a la que se obtuvo en amonio 0.5 mM, probablemente este resultado se deba a la falta de un gen *asnB* funcional para lograr una represión total como fue observado para GOGAT (Castaño, *et al*, 1988).

Las diferencias observadas en la cantidad de mensajero y de β -galactosidasa posiblemente reflejan la existencia de algún mecanismo que permita la represión de *asnB* en limitación de nitrógeno para proteger la poza de glutamina.

INTRODUCCION

En todos los sistemas biológicos la asimilación de nitrógeno en macromoléculas es esencial para el crecimiento. Las rutas metabólicas del metabolismo nitrogenado pueden ser divididas en dos clases: a) las rutas necesarias para la asimilación y la utilización del nitrógeno de compuestos aprovechables en el medio; y b) las rutas biosintéticas dirigidas hacia la producción de compuestos nitrogenados de la célula. Los pasos específicos en estas rutas varían con el organismo, pero generalmente todas las células utilizan a la glutamina y al glutamato como donadores de grupos amino y amido.

Cuando se crecen bacterias entéricas en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono, éstas prefieren el amonio como fuente de nitrógeno. Todo el nitrógeno intracelular para la síntesis de macromoléculas en las bacterias entéricas, es derivado del grupo amido de la glutamina y del grupo amino del glutamato, o de la incorporación directa del amonio (Tyler, 1978). El glutamato provee de nitrógeno para la síntesis de muchos aminoácidos, en cambio, la glutamina dona nitrógeno para la síntesis de purinas, pirimidinas, aminoazúcares, histidina, triptofano, asparagina, NAD y p-aminobenzoato (Fig. 1) (Wohlheuter, *et al*, 1973).

Cuando la concentración del ión amonio en el medio de cultivo es lo suficientemente alta (mayor de 1 mM), el amonio es incorporado directamente a glutamato y glutamina, vía GDH y GS (ver más adelante) así como a asparagina, vía *asnA*. Sin embargo, cuando la concentración del ión amonio en el medio de cultivo es baja (0.1 mM), el amonio es incorporado directamente a glutamina, vía GOGAT-GS (ver más adelante) (Magasanik, 1982).

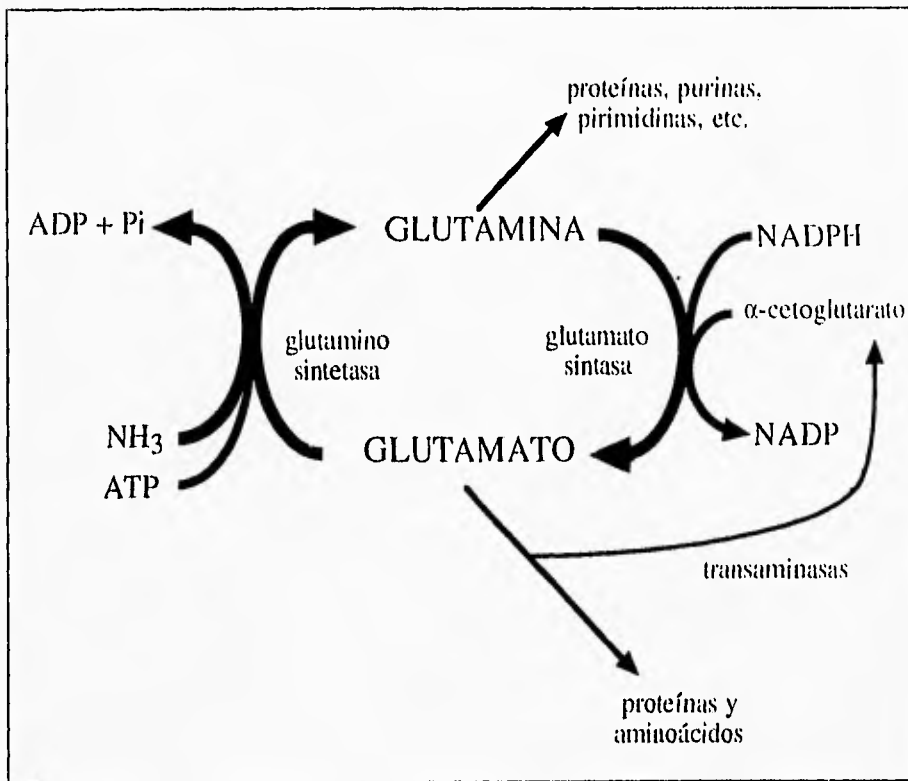
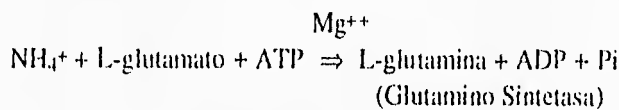
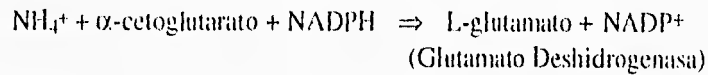
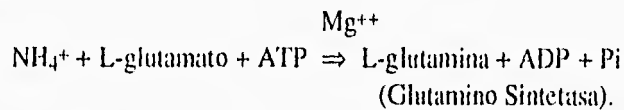
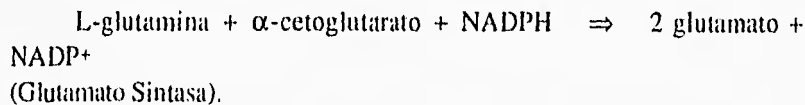


Figura 1. Ciclo de asimilación del amonio (Reitzer y Magasanik, 1987).

Las reacciones para la asimilación de amonio y la síntesis de glutamato y glutamina en un medio con amonio en exceso son las siguientes:



Las reacciones para la asimilación de amonio y la síntesis de glutamato y glutamina en un medio con limitación de amonio son las siguientes:



La reacción catalizada por la glutamino sintetasa (GS), es la única ruta biosintética conocida, descrita para la síntesis de glutamina. En enterobacterias, mutaciones en el gen *glnA* (gen estructural para la glutamino sintetasa), traen como consecuencia la auxotrofia por glutamina; este resultado permitió concluir que la GS es la única vía para la síntesis de glutamina y que el gen *glnA* es el único gen codificante para glutamino sintetasa (GS). Una cepa con mutaciones que provocan la pérdida de la glutamato deshidrogenasa (GDH) y de la glutamato sintasa (GOGAT), es auxótrofa de glutamato. (Branchley y Magasanik, 1974). Así, las enzimas esenciales para la asimilación de amonio y para la síntesis de glutamina y glutamato son GS, GDH, y GOGAT.

Considerando que la afinidad de la GDH por amonio es baja, con una K_m mayor de 1 mM en tanto que, la GS y la GOGAT tienen una mayor afinidad por este ión, con una K_m menor de 0.2 mM. Se ha postulado que

en un medio con amonio en exceso, tanto la GDH como la GOGAT tienen la capacidad de sintetizar glutamato; en cambio, cuando las células se crecen en un medio con limitación de nitrógeno, solamente la glutamato sintasa está involucrada en la formación de glutamato en tanto que, la glutamina sintetasa asimila el amonio del medio de cultivo. Por ende, la GS tiene dos funciones cuando las células se crecen en un medio con limitación de nitrógeno: una es sintetizar glutamina y otra la de asimilar nitrógeno.

Asimismo, cabe señalar que cuando disminuye la cantidad de amonio en el medio, las bacterias entéricas responden aumentando la expresión de una variedad de genes y de operones involucrados en la asimilación y degradación de fuentes de nitrógeno alternativas al amonio. La respuesta coordinada de todas estas vías metabólicas, se conoce como respuesta *Ntr* (nitrogen regulation) (Tyler, 1978).

Las células requieren cerca de 8 veces más glutamato que glutamina para la biosíntesis celular; consecuentemente durante el desarrollo en un medio que contiene bajos niveles de amonio o alguna otra fuente de nitrógeno, el amonio es asimilado exclusivamente vía GS, y muchas de las moléculas de glutamina son recicladas a glutamato vía GOGAT (Reitzer y Magasanik, 1987).

Existen otras enzimas amidotransferasas dependientes de glutamina, las cuales pueden proveer cerca del 12% del glutamato intracelular durante el crecimiento en condiciones de limitación de nitrógeno. Aparentemente, la glutamato sintasa produce el 88% del glutamato intracelular (Reitzer y Maganik, 1987)

En *Escherichia coli*, la enzima GOGAT esta compuesta de cuatro dímeros con subunidades diferentes. El gen *gltB* codifica para la subunidad grande de 135000 daltones, el gen *gltD* codifica para la subunidad chica de 53000 daltones. Ambos genes se encuentran adyacentes en el minuto 69 del mapa de *E. coli*. Además, recientemente se reportó la presencia de un tercer gen denominado *gltF* involucrado en la respuesta *Ntr*. Por lo tanto, los dos genes estructurales y el tercer gen regulatorio forman parte de una unidad transcripcional que constituye el operón *gltBDF* (Castaño *et al*, 1988).

Una cepa carente de GOGAT en ausencia de glutamato, no puede crecer en ninguna fuente generadora de amonio excepto en D-serina; aparentemente este aminoácido es degradado muy rápido, de tal manera

que genera amonio para la síntesis de glutamato vía GDH lo que compensa la ausencia de GOGAT. El crecimiento en una fuente de nitrógeno que genere glutamato requiere de altos niveles de GS para la utilización del amonio derivado del glutamato. Una cepa mutante *glbB* (codifica para la subunidad grande de GOGAT) no crece en fuentes generadoras de glutamato, como son la prolina y la arginina: este fenotipo se debe al efecto polar que esta mutación ejerce sobre los genes *glbD* y *glbF* los cuales parecen jugar un papel importante en la inducción de la respuesta *Ntr*. (Castaño et al., 1992). Esto es un hecho importante por la razón de que una gran proporción de la glutamina producida por la asimilación de amonio, es convertida a glutamato vía GOGAT.

Además del fenotipo *Ntr*⁻ de las cepas *glbB*⁻, se ha reportado que éstas son incapaces de elevar el nivel de GS durante el crecimiento en glutamina como fuente de nitrógeno (fenotipo *Gsd*) (Tyler, 1978; Magasanik, 1982; y Castaño, 1988). La relación entre la biosíntesis de GOGAT y los sistemas *Ntr* ha sido sustentada por el hecho de que el fenotipo *Ntr*⁻ de mutantes *glbB* puede ser suprimido por mutaciones en *glnL* (ver más adelante) (Pahel et al, 1978 y Magasanik, 1982), el cual resulta en una alta concentración de GS independiente de la fuente de nitrógeno en el medio.

Otro aspecto muy importante referente a la regulación del operón *glbBDF* es su relación con el regulón Lrp (leucine-responsive regulatory protein) que regula positiva o negativamente cerca de 40 polipéptidos. El primer operón del regulón Lrp que se reconoció es el operón *llvH*, este es regulado por presencia o ausencia de leucina, este operón codifica para la forma III de la ácido acetohidroxi sintasa. Lrp es un activador transcripcional de la expresión de este operón, en ausencia de leucina en el medio de cultivo, la expresión se reduce entre 5 y 10 veces (Ernsting et al. 1993). En análisis de geles de electroforesis bidimensionales para cepas que tenían o carecían de un gen funcional *Lrp* creciendo con o sin leucina donde se detectaron proteínas ya conocidas y otras desconocidas y se observó que la expresión de éstas, se da en función de Lrp respondiendo de una manera sensible a leucina (Ernsting, 1992). Dos de los polipéptidos detectados sobre los cuales existe influencia del regulón Lrp es el polipéptido que codifica para la subunidad pequeña de GOGAT (codificada por el operón *glbBDF*) y la glutamino sintetasa (Ernsting, 1993), en este

trabajo se demostró que la regulación de la expresión de GS por Lrp es indirecta y que aparentemente es debida al efecto de Lrp sobre la expresión de GOGAT. La expresión de *glBDF* en cepas *lrp*⁺ es reprimida 2.2 veces en presencia de leucina exógena y 16 veces en medio Luria. La represión de la expresión de *glBDF* cuando las células se crecen en medio mínimo con leucina o medio Luria no se ve de igual manera en una cepa isogénica con el transposón Tn10 insertado en *lrp*, en este caso la expresión del operón *glBDF* es 40 veces más bajo que en cepas *lrp*⁺. Lrp se une específicamente a un fragmento de la región promotora del operón *glBDF* (Ernsting, 1993).

E. coli y *S. typhimurium*, pueden cultivarse en una gran variedad de compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, pero no pueden crecer en compuestos inorgánicos nitrogenados excepto en amonio. Sin embargo, algunas especies de *Klebsiella* pueden utilizar nitratos, nitritos o nitrógeno atmosférico diatómico. Un número limitado de compuestos orgánicos nitrogenados permiten el desarrollo celular si son la única fuente de nitrógeno (Tyler, 1978).

El tiempo de duplicación en estas fuentes orgánicas de nitrógeno es invariablemente lento en comparación con el amonio por lo que estas condiciones son consideradas como fuentes limitantes de nitrógeno. Estas observaciones indican que el factor esencial del desarrollo es la tasa de generación de amonio de estas fuentes nitrogenadas y de su subsecuente asimilación. El mismo sistema regulatorio que modula el nivel y actividad de la glutamino sintetasa, está involucrado en la regulación del sistema *Ntr*, con esto incrementa el nivel de las enzimas necesarias para el abastecimiento de amonio requerido por la célula para su crecimiento (Magasanik, 1982).

Algunos de estos compuestos nitrogenados pueden además servir como fuente de carbono y energía para la célula. En cada caso el uso de estos compuestos nitrogenados generalmente requiere proteínas específicas que están reprimidas. Estas proteínas forman parte del sistema *Ntr*, el cual se induce en condiciones de deficiencia de amonio, y su papel es el de transportar y catabolizar estas fuentes alternativas de nitrógeno. Los sistemas *Ntr* están involucrados, por ejemplo: en la degradación de arginina, ornitina, agmactina, putrecina y γ -aminobutirato en *E. coli*; y en

la degradación de histidina y urea en *K. aerogenes* (Reitzer y Magasanik, 1987).

La síntesis de las proteínas de los sistemas *Ntr* están a menudo sujetas a la regulación de interacciones de una pequeña molécula efectora con una proteína reguladora específica para una ruta degradativa en particular, como fue dilucidado originalmente para el operón *Lac*. Sin embargo este sistema de control específico no es usualmente una condición suficiente para una síntesis máxima de las proteínas necesarias para la utilización de compuestos nitrogenados. En general se requiere la presencia de otras proteínas regulatorias como efectores positivos; el punto crítico es que el elemento de control positivo no es ruta-específico. Una proteína en particular puede incrementar la transcripción de una gran variedad de genes.(Reitzer y Magasanik, 1987).

El crecimiento en L-glutamina como fuente de nitrógeno mantiene un tiempo de duplicación casi tan corto como cuando las células crecen en amonio, sin embargo la transcripción de *glnALG* (ver más adelante) y otros sistemas *Ntr* está activada, lo que sugiere que el crecimiento en glutamina es una condición parecida a la de deficiencia de nitrógeno. La GOGAT aparece lo suficientemente activa como para agotar la glutamina intracelular cuando las células están creciendo con glutamina como fuente de nitrógeno (Reitzer y Magasanik, 1987).

La GS es esencial para la formación de la glutamina requerida para la síntesis de proteínas, de metabolitos que contienen nitrógeno, purinas, pirimidinas, y además, para la asimilación de amonio cuando las células están creciendo en medio con deficiencia de amonio. Por esto la importancia de la glutamina en el metabolismo celular. En consecuencia, no sorprende que la actividad catalítica y la síntesis de esta enzima esten altamente reguladas. La catálisis de la GS es dependiente de ATP para la síntesis de L-glutamina a partir de amonio y L-glutamato. La enzima purificada de *Escherichia coli* es un dodecámero de subunidades idénticas de 55,000 daltones, su actividad catalítica está regulada por la adición covalente de un grupo AMP (adenosín monofosfato) a un residuo de tirosina en cada subunidad. La adenilación de una subunidad, solamente inactiva a ésta que ha sido adenilada, lo que significa, que una enzima con 9 de sus 12 subunidades adeniladas tiene solamente 3 unidades activas (Reitzer y Magasanik, 1987).

Como se mencionó, la actividad y nivel de GS, así como la expresión de los sistemas *Ntr* se encuentran finamente regulados. En esta regulación participan al menos cuatro enzimas: la enzima P_{II} , producto del gen *glnB*, NR_{II} , producto del gen *glnL*; NR_I , producto del gen *glnG* (*NtrC*); y la enzima bifuncional UTasa/UR (uridiltransferasa/desuridiltransferasa), producto del gen *glnD* (Stadman y Ginsburg, 1974; Adler, *et al.*, 1975; García, y Rhee, 1983; Ninfa, 1986), sus actividades son determinadas por la concentración intracelular de glutamina/ α -cetoglutarato.

A nivel de actividad, la GS está controlada por adenilación y desadenilación de sus subunidades, esta reacción es catalizada por una misma enzima, denominada adeniltransferasa (ATasa), la cual es regulada por la proteína P_{II} . Esta proteína puede estar presente en la célula en dos conformaciones interconvertibles: P_{II} y P_{II} -UMP. P_{II} estimula a la ATasa para que efectúe la reacción de adenilación de la GS, en tanto que P_{II} -UMP estimula la desadenilación de la GS. La interconversión de P_{II} a P_{II} -UMP es dependiente de la actividad de la proteína uridiltransferasa (UTasa), que une reversiblemente un grupo UMP a la proteína P_{II} . La UTasa también es capaz de desuridilar a P_{II} -UMP para convertirla en la forma P_{II} . Cuando la poza intracelular de glutamina es baja en relación a la poza de α -cetoglutarato y hay altas concentraciones intracelulares de ATP, se estimula la actividad de la UTasa lo que provoca la uridilación de P_{II} para formar P_{II} -UMP, que a su vez estimula la desadenilación de la GS, lo cual trae como resultado una mayor actividad biosintética de la enzima GS y por lo tanto mayor síntesis de glutamina. Inversamente, altas concentraciones de glutamina y fosfato inorgánico inhiben la reacción de uridilación de la proteína P_{II} y además estimulan la actividad removedora de grupos uridilo de la UTasa por tanto, la presencia de la forma no modificada de la proteína P_{II} tiene como consecuencia la adenilación de la GS con su consiguiente inactivación.

La actividad de la ATasa también se ve afectada por los niveles de ATP, glutamina y α -cetoglutarato, de tal manera que cuando las concentraciones de glutamina son altas en relación con las de α -cetoglutarato, se ve estimulada la adenilación. Cuando los niveles de glutamina son bajos en relación con los de α -cetoglutarato y ATP, se ve estimulada la desadenilación (Stadtman, 1978). Estas reacciones forman una cascada bicíclica, que provoca que las células respondan a pequeños

cambios en las concentraciones intracelulares de glutamina y α -cetoglutarato, ajustando el estado de adenilación de la GS, y por lo tanto de su actividad biosintética (Fig. 2).

Por otro lado, la transcripción del operón *glnALG* está controlada por los productos de los genes *glnG* y *glnL*, los cuales, a su vez son regulados a nivel de actividad por la proteína P_{II} . La expresión del operón *glnALG* se da a partir de dos promotores con un arreglo en tandem denominados *glnAp1* y *glnAp2*. Estos son reprimidos o activados, respectivamente, por la proteína NR_I . La transcripción a partir de *glnAp2* requiere del núcleo RNA polimerasa asociado al factor sigma 54 (σ^{54}). El complejo promotor-RNApol, es por si mismo incapaz de iniciar la transcripción y requiere de la presencia de NR_I -P para la formación de complejo abierto e iniciar así la transcripción. Dado que la concentración intracelular de RNApol- σ^{54} no depende del estatus nitrogenado de la bacteria, la activación del promotor *glnAp2* es completamente dependiente de la acumulación de NR_I -P., condición que sólo ocurre durante el crecimiento con deficiencia de nitrógeno (fig. 3) (Hirschman, *et al*, 1985 y Reitzer y Magasanik, 1985).

El producto de *glnL*, NR_{II} , es una proteína cinasa-fosfatasa, la cual puede autofosforilarse y además fosforilar y desfosforilar a NR_I (Ninfa y Magasanik, 1986). Cuando las células bacterianas se crecen en exceso de amonio, la proteína P_{II} favorece la reacción de desfosforilación de NR_I -P y por lo tanto, los niveles intracelulares de NR_I -P disminuyen dramáticamente. Esto provoca que se transcriban niveles basales de mensajero a partir de *glnAp1*, con el núcleo RNA polimerasa asociado al factor σ^{70} . Inversamente, durante el crecimiento en condiciones de deficiencia de nitrógeno, la proteína P_{II} -UMP es incapaz de interferir con la reacción de fosforilación de NR_I , lo cual provoca la acumulación de NR_I -P y en consecuencia, la activación de la transcripción a partir de *glnAp2*. Cabe mencionar que algunos promotores bajo control del sistema *Ntr*, son activados por NR_I -P (como el sistema de transporte de glutamina en *E. coli*).

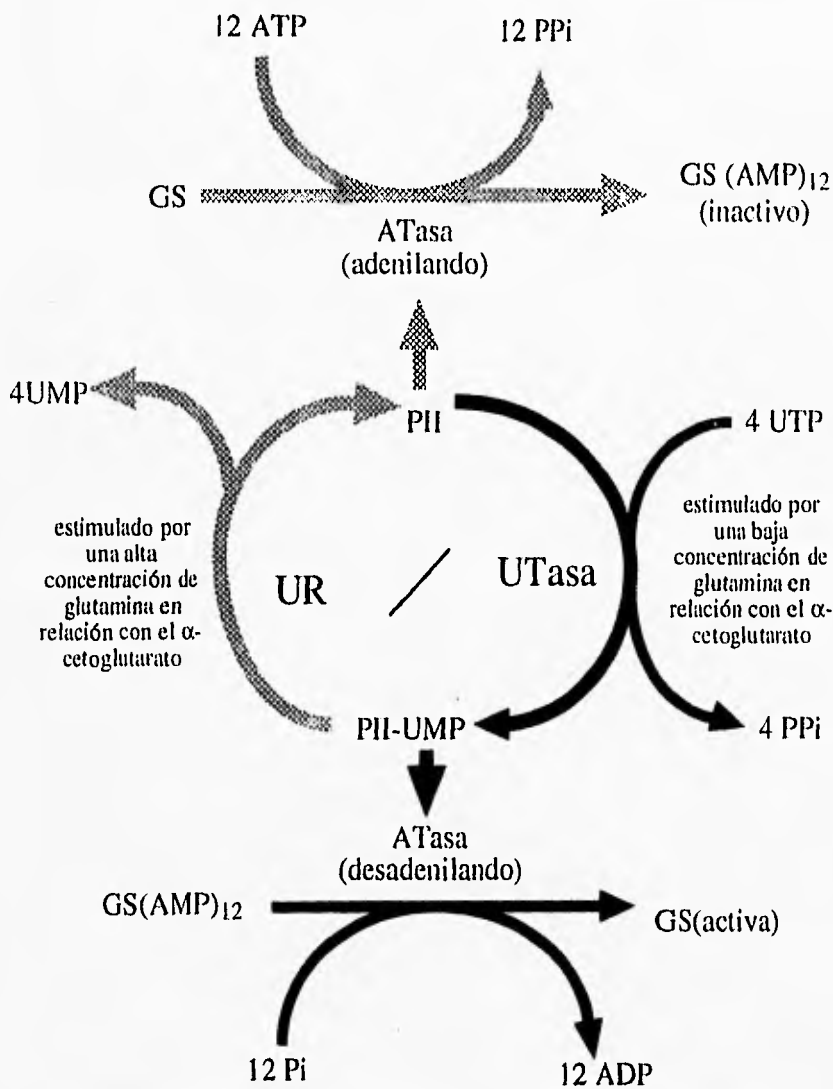


Figura 2. Modificación covalente de la glutamino sintetasa (GS) por la enzima uridil/desuridil transferasa (UR/UTasa) (Reitzer y Mugasnik, 1987).

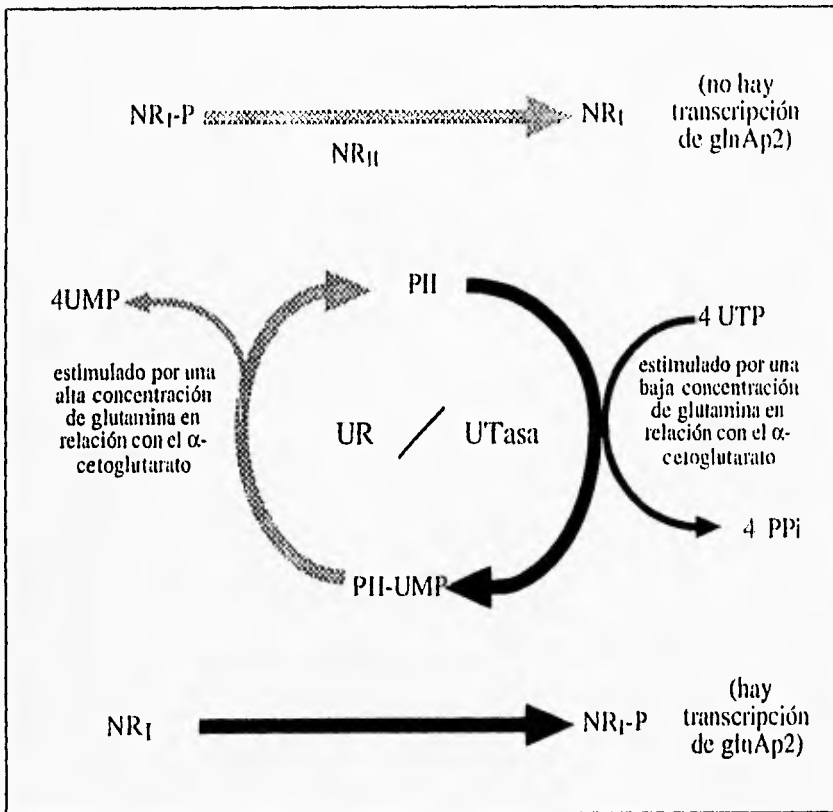
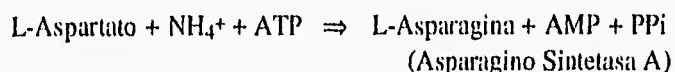


Figura 3. Modificación covalente de NR1, el regulador de la transcripción de glnAp2 (Reitzer y Magasanik, 1987).

En el metabolismo nitrogenado de *E. coli* existen otras enzimas capaces de sintetizar biomoléculas importantes, como la asparagina, que es sintetizada por dos enzimas: una asparagina sintetasa dependiente de amonio y una asparagina sintetasa dependiente de glutamina.

La auxotrofia por asparagina en *E. coli* resulta de mutaciones en dos genes, el gen *asnA* localizado en el minuto 84, y el gen *asnB* localizado en el minuto 16. Originalmente se purificó y caracterizó una asparagina sintetasa dependiente de amonio. Esta enzima es codificada por el gen *asnA* (Cedar y Schwartz, 1969), tiene un peso molecular de 80,000 daltones (Cedar y Schwartz, 1969, Reitzer y Magasanik, 1983) y está formada por un par de dímeros iguales, cada uno pesa 36,868 daltones. Recientemente fue dilucidado uno de los mecanismos de regulación para esta asparagina sintetasa dependiente de amonio. Una proteína de 17,000 daltones codificada por el gen *asnC*, que es adyacente pero divergente de la transcripción de *asnA*, activa la transcripción de este último gen; la asparagina inhibe la transcripción de *asnA* mediante el producto de *asnC* (Buhk y Messer, 1983; de Wind *et al*, 1985 y Kölling y Luther, 1985). El producto de *asnC* autoregula su propia síntesis, esto es, *AsnC* reprime la transcripción de *asnC* (de Wind *et al*, 1985). Una cepa *asnA*⁺, *asnB*⁻, *asnC*⁻ no es auxótrofa de asparagina a 37°C, pero sí a 42°C, lo cual sugiere que el gen que codifica para esta enzima dependiente de amonio es termosensible (Humbert y Simoni, 1980).

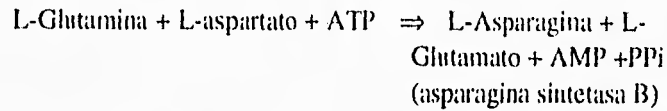
La reacción catalizada por la enzima dependiente de amonio es la siguiente:



Se ha reportado una segunda asparagina sintetasa la cual es dependiente de glutamina y es codificada por el gen *asnB*; la enzima es un tetrámero de subunidades idénticas; cada subunidad tiene un peso molecular de 57,000 daltones (Reitzer y Magasanik, 1987). La enzima comparte propiedades con otras amidotransferasas, tiene actividad de glutaminasa dependiente de aspartato, y en altos niveles de amonio este compuesto puede reemplazar a la glutamina como donador de nitrógeno. Al igual que la asparagina sintetasa dependiente de amonio también es reprimida por

altas concentraciones de asparagina (Cedar y Schwatz, 1969; Humbert y Simoni, 1980; Reitzer y Magasanik, 1987).

La reacción que cataliza la enzima dependiente de glutamina es la siguiente:



Una mutante *asnA*⁺, *asnB*⁻ de *K. aerogenes* no puede crecer en una gran variedad de fuentes nitrogenadas de lenta metabolización, como son: prolina, aspartato, nitrato y glutamato, pero crecen tan bien como la silvestre en amonio o asparagina como fuente de nitrógeno. Estas mutantes presentan fenotipo *Ntr*⁻, que se ve reflejado cuando las células son incapaces de crecer en arginina como fuente de nitrógeno (fenotipo *Aur*⁻). Esto sugiere que el producto de *asnB*, la asparagina sintetasa dependiente de glutamina (*asnB*), es requerida para crecer en un medio limitante de nitrógeno (de Wind *et al*, 1985 y Reitzer y Magasanik, 1987)

No se sabe mucho de los mecanismos de represión de *asnB*. Sin embargo, en *K. aerogenes* fue observado que los niveles de asparagina sintetasa dependiente de amonio son altos, cuando las células se cultivan en un medio rico en amonio, mientras los niveles de la enzima dependiente de glutamina son bajos. Sin embargo, cuando las células son crecidas en medios limitantes de amonio, los niveles de la enzima dependiente de amonio son bajos y los niveles de la enzima dependiente de glutamina son altos (Reitzer y Magasanik, 1987).

La limitación de nitrógeno implica la elevación de los niveles de NR_I, producto de *glnG*. En cepas de *K. aerogenes* con mutaciones que resultan en bajos niveles de NR_I, la enzima dependiente de amonio no es reprimida (Reitzer y Magasanik, 1987). Este resultado indica que NR_I reprime a *asnA*, pero el análisis de la secuencia nucleotídica de *asnA* y *asnC* de *E. coli* no muestra una similitud por el sitio de unión de NR_I, por lo que el efecto de esta proteína puede ser indirecto a través de un mecanismo aun no dilucidado.

Como se mencionó una cepa mutante en *asnB*, en *K. aerogenes* tiene fenotipo *Aur*⁻, y los niveles de NR_I afectan la actividad transcripcional del gen *asnA*. Sin embargo muy poco se conoce al respecto de los mecanismos

moleculares que provocan estas observaciones. Así mismo quedan abiertas las preguntas: ¿cuál es la relación del gen *asnB* con el sistema *Ntr*?, ¿existe una relación entre los niveles de *asnA* y de *asnB* que permitan un apropiado balance de la poza de asparagina?

En base a lo anterior, nos planteamos como objetivo el aislar y caracterizar una mutante en el gen *asnB* de *E. coli* que nos permita estudiar la regulación transcripcional a la que este gen se encuentra sujeto y si esta es dependiente de la calidad de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo. Finalmente, con esta mutante se podrá determinar si en *E. coli*, *asnB* se encuentra vinculado al sistema *Ntr*.

OBJETIVOS

Aislar y caracterizar una mutante en el gen *asnB* de la bacteria *Escherichia coli*.

Determinar él o los mecanismos de regulación del gen *asnB*.

Determinar si el gen *asnB* está vinculado con los sistemas *Ntr*

MATERIAL Y METODOS

Cepas bacterianas:

MX614: Derivada de *E. coli* K-12. Genotipo: (*lac-pro*)D, *galE*, *ilv-680*, *thi-1*/F⁻

AB1157: *thr-1*, *leu-6*, *ara*, *pra lac*, *gal* B^S, *his*, *Sm^R*, *xyl*, *mtb arg*, B1 F⁻

JF448: Derivada de *E. coli* K-12. Genotipo F⁺, *asnB32*, *relA1*, *spaT1*, *bglR13*, *asnA31*, *rhs-4*, *thi-1*, I⁻ (Felton *et al.*, 1980)

CSH135: F⁺*lacZ8305::Muets62/ MudX D(gpt-lac)5*, *his*, *met*, *tyr*, *gyrA*, *rpsL*. (Baker, *et al.*, 1983).

M8820: *MudI1734* Tc^R, Kan^R (Castilho, 1984).

12077: Derivada de MG1655. Genotipo *zhe-280/Tn10*

JF448-P: P1(12077) X JF448 (este trabajo)

MX4000: P1(JF448-P/MudX) X MX614 (este trabajo)

MX4003: P1(JF448-P/MudI1734) X MX614 (este trabajo)

Condiciones de cultivo.

Las cepas se mantuvieron en tubos de agar inclinado con medio Luria y antibiótico si se requería, los cuales fueron resembrados a intervalos de un mes.

Los medios utilizados fueron:

Medio Luria: 1% de bacto triptona, 0.5% de extracto de levadura y 1% de cloruro de sodio.

Medio LCTG: medio sólido de Luria, adicionando 25 mM de cloruro de calcio, 25mg/ml de timina y glucosa, a una concentración final de 0.2%.

Medio mínimo MM: un litro de medio contiene 13.6g de fosfato monobásico de potasio, 2.61g de sulfato de potasio, 0.2g de sulfato de magnesio heptahidratado, 0.01g de cloruro de calcio y 0.05 mg de sulfato ferroso heptahidratado, el pH del medio es 7.4 y se ajusta con KOH.

Como fuente de carbono se añadió al medio glucosa al 20% (concentración final 2%). Como fuentes de nitrógeno se utilizaron concentraciones finales: cloruro de amonio 15 mM (amonio en exceso),

cloruro de amonio 0.5 mM (limitación de amonio), glutamina 6.8 mM y asparagina 1.9 mM.

Medio de LC: medio de Luria más 25 mM de cloruro de calcio con 0.6% de agar.

Los medios de cultivo para las cepas MX614, MX4000, MX4003, fueron complementados con L-isoleucina (50 mg/ml), L-valina (50 mg/ml), prolina (100 mg/ml), y tiamina (0.2 mg/ml), y con asparagina 1.9 mM para MX4000 y MX4003.

Cuando fue necesario añadir antibiótico se agregaron en las siguientes concentraciones: tetraciclina (Tc) 25mg/ml, kanamicina (Kn) 50mg/ml, ceftizoxima 100mg/ml y cloramfenicol (Cm) 20mg/ml.

Para los medios de cultivo sólidos, se adicionaron 15 gramos de agar por litro.

Los aminoácidos fueron esterilizados por filtración. La glucosa y los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave 20 minutos, a 15 lb y 120°C.

METODOS.

Preparación de lisados P1 virA:

Para la preparación del fago en la cepa donadora, se cultivó esta en medio Luria hasta alcanzar una fase exponencial (40 unidades Klett). Se tomó 0.5 ml de cultivo y se mezcló con 1×10^7 ufp/ml (unidades formadoras de placas) en medio Luria. La mezcla se colocó en 3 ml de LC, se mezcló bien y se vació en cajas de Petri con medio sólido LCTG. Se dejó incubando toda la noche a 37°C. Luego se agregaron 3 ml de Luria líquido y se raspó con una espátula, para después poner la mezcla en tubos. Se agregó cloroformo en una proporción 1/20 y se agitó vigorosamente en vórtex, después se centrifugó a 5000 rpm, se recuperó el sobrenadante, se añadió nuevamente cloroformo y se volvió a centrifugar. Los bacteriófagos se guardaron a 4°C.

Titulación de PI virA.

Los lisados se titularon infectando a la cepa AB1157, la cual se cultivó en medio Luria y se recuperó en 0.01 M de sulfato de magnesio y 0.005 M de cloruro de calcio. Se mezclaron 0.1 ml de la suspensión celular con diferentes diluciones de fago PI, después de 20 minutos de incubación a 37°C, sin agitación, se vaciaron sobre cajas de LCTG con agar suave LC. Se incubaron toda la noche a 37°C y después se contaron las placas para determinar el título.

Transducción con PI virA.

Después que se propagó y se tituló el PI en la cepa donadora, se cultivó la cepa receptora en medio Luria, hasta alcanzar 40 U.K, se centrifugó y se concentró diez veces en medio Luria. Se separó en dos tubos cada uno con 0.5 ml de suspensión bacteriana y se añadieron 0.5 ml a cada tubo de una solución de cloruro de calcio 0.05M y sulfato de magnesio 0.02M, al tubo de la transducción se le agregó 5 ml de PI vir propagado en la cepa donadora adecuada, diluido 1×10^7 ufp/ml. Al control se le añadió 0.1 ml de medio Luria. Después de incubarlo 20 minutos a 37°C sin agitación, se centrifugaron las células y se lavaron con NN dos veces. Las células se resuspendieron en 0.1 ml de NN y se plaquearon en cajas Petri con el medio adecuado para la selección.

Obtención de lisados de *MudX* y *Mud11734*, por inducción con temperatura

Para obtener los lisados de los derivados de *Mu*, (Miller, 1992) se parte de las cepas CHS135 para el *Mudx*, y de la cepa M8820 para el *Mud11734*, esta última cepa requiere ser infectada con un lisado de *Mucts62*, con el fin de que este último complemente las funciones de encapsidación y lisis ausentes en el fago (*Mud11734*).

Para la obtención del lisado de *MudX*, se creció la cepa CSH135 en medio Luria a 30°C hasta fase exponencial (aproximadamente 60-70 U.K.).

Se incubaron por 20 minutos a 42°C, para inactivar al represor termosensible, y después se incubó con agitación a 37°C hasta que se

observó lisis celular. Posteriormente se le agregó 1/20 volúmenes de cloroformo, se agitó vigorosamente, para posteriormente centrifugarlo para eliminar los restos celulares. El lisado debe usarse el mismo día, ya que pierde la infectividad rápidamente.

Una vez que se obtuvo el lisado de *MudX*, se creció la cepa receptora en medio Luria hasta 60 U.K. Se centrifugó y se resuspendió en la décima parte del volumen de Luria adicionado con $MgSO_4$ 0.01 mM y $CaCl_2$ 0.005 mM. Posteriormente se tomaron 0.1 ml del lisado, de manera que la multiplicidad de infección fuera de 10 (es decir 10 fagos por bacteria) y se incubó por 20 minutos a 30°C sin agitación. Posteriormente se diluyó 5 veces en medio Luria y se cultivó en agitación a 30°C durante 2 horas para permitir que los genes de resistencia a cloramfenicol se expresaran (*MudX* Cm^R). Inmediatamente se lavó con medio mínimo dos veces, para después, diluirlo diez veces con medio mínimo complementado con glucosa-NH₄⁺, y cloramfenicol.

Este cultivo se dejó incubando a 37°C aproximadamente dos horas, al final de las cuales se observó crecimiento. También se incluyó un control en el que las células concentradas llevando ya $MgSO_4$ y $CaCl_2$, se mezclaron con 0.1 ml de Luria en vez de suspensión de fagos. Este control se trató de manera idéntica a los experimentales. Al final de la incubación el control con Cm, estaba completamente transparente, es decir, no había crecimiento ya que la cepa silvestre de *E. coli* es sensible a este antibiótico.

Para la obtención del lisado de la cepa M8820 (portadora de *Mud11734*), primeramente se obtuvo un lisado de la cepa M8820 (la cual es lisogena de *Muets*) de la misma forma que se explica detalladamente en el párrafo anterior. La cepa M8820 se crece hasta fase exponencial y se incubó primero a 42° C y luego a 37°C hasta observar lisis celular. Este lisado que es portador de los bacteriófagos *Muets* y *Mud11734*, se utilizó para infectar la cepa donadora, siguiendo el procedimiento descrito para la infección con *MudX*, excepto que en lugar de Cm, se añade kanamicina a una concentración final de 50 ug/ml.

Determinación de la actividad enzimática de Glutamino Sintetasa (GS).

La actividad de la enzima se midió mediante el ensayo de g-glutamyl transferasa (Covarrubias *et al*, 1980). Este ensayo mide la formación de g-glutamyl hidroxamato.

Para la preparación de los extractos se crecieron 10 ml de cultivo en medio NN con las fuentes de nitrógeno adecuadas, hasta alcanzar un crecimiento de 80 U.K., inmediatamente se añadió 1 ml de CTAB a una concentración de 1 mg/ml, se agitó durante tres minutos en las mismas condiciones de crecimiento. Posteriormente se enfriaron en hielo y se centrifugaron las células en frío, se lavaron una vez con cloruro de potasio al 1%, se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron en cloruro de potasio al 1% en 1/10 del volumen original. El extracto se mantiene en hielo hasta que la determinación enzimática se lleva a cabo.

Mezcla de reacción: Se preparó con 3.5 ml de agua bd., 1.125 ml de Imidazol 1M pH 7.33, 0.185 ml de NH_2OH 0.8M, 0.0225 ml de MnCl_2 0.1M, 0.75 ml de arseniato de sodio 0.25M pH 7.33, 0.150 ml de ADP sódico 20mM pH 7.0, 0.75 ml de CTAB 1mg/ml y 1.0315 ml de L-glutamina 0.2M. Se ajustó el pH a 7.33 con KOH, para después aforar la mezcla a 8.25 ml. Se colocaron tres tubos de vidrio por extracto a 37°C. A todos los tubos se les agregó 0.4 ml de la mezcla de reacción y luego se adicionó 0.1 ml del extracto celular a cada uno de ellos. A los primeros tubos de cada condición se les agregó 1 ml de buffer stop mix para parar la reacción al tiempo cero, y los segundos y terceros tubos se dejaron incubando con el extracto 5 y 10 minutos respectivamente antes de detener la reacción. El reactivo para detener la reacción contiene 5.5g/l de cloruro férrico hexahidratado, 20g/l de ácido tricloroacético y 21 ml/l de ácido clorhídrico. Se centrifugaron los tubos y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 540 nm. El factor de conversión utilizado fue 0.532, que es la absorbancia de 1 mmol de g-glutamyl hidroxamato. Las actividades específicas se reportan como nmoles de g-glutamyl hidroxamato producidos por minuto y por mg de proteína.

Determinación de la actividad enzimática de GOGAT (Meers, 1970).

Los extractos se prepararon creciendo 10 ml del cultivo en medio NN con las fuentes de nitrógeno adecuadas, hasta una densidad óptica de 80 U.K., después se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos. Se tiró el sobrenadante y se lavaron las células dos veces con el buffer de extracción de Tris-HCl 50mM con b-mercaptoetanol 10mM pH 7.6. Se centrifugaron las células y se resuspendieron en 1 ml de buffer de extracción, posteriormente las células se sonicaron tres veces durante 15 segundos con un intervalo de descanso de 1 minuto, luego se centrifugaron 3 minutos a 5000 rpm. El sobrenadante se colocó en otro tubo para hacer la determinación enzimática a intervalos de 1 minuto, durante 4 minutos. Debido a que existen otras transaminasas que utilizan NADPH como sustrato, se pusieron dos controles uno sin glutamina y otro sin acetoglutarato.

Mezclas de reacción:

| Soluciones | Mezcla completa | Control a-ceto | Control Gln |
|-----------------------|-----------------|----------------|-------------|
| a-cetoglutarato 5 mM | | | |
| pH 7.0 | 50ml | | 50ml |
| Glutamina 5 mM | 50ml | 50ml | |
| Tris-HCl 50 mM pH 7.6 | 50ml | 50ml | 50ml |
| NADPH 0-25 mM | 125ml | 125ml | 125ml |
| Agua | 625ml | 625ml | 625ml |

La reacción se inició agregando a una celda del espectrofotómetro, 0.9 ml de la mezcla de reacción, más 0.1 ml del extracto celular. La actividad enzimática se determinó a 340 nm para seguir la conversión de NADPH a NADP. El extracto celular se conservó en hielo hasta que se hizo la determinación de proteína por el método de Lowry (Lowry, *et al*, 1951).

Determinación de proteína por el método de Lowry (Lowry, et al., 1951)

Se prepararon las siguientes soluciones:

Solución A para 1 litro:

| | |
|---------------------------------|-----|
| NaOH | 4g |
| Na ₂ CO ₃ | 20g |

Solución B para 100 ml:

| | |
|-----------------------------|----|
| Tartrato de sodio y potasio | 2g |
|-----------------------------|----|

Solución C para 100 ml:

| | |
|---------------------------------------|----|
| CuSO ₄ ·5 H ₂ O | 1g |
|---------------------------------------|----|

Solución BSA (albúmina sérica de bovino), 1 mg/ml, es alicuotado y se guarda a -20°C.

Solución mezcla:

| | |
|------------|----------|
| Solución A | 98.0 ml |
| Solución B | 1.0 ml |
| Solución C | 1.0 ml |
| Total | 100.0 ml |

Solución Folín. Diluir 1/3 en agua.

a) Blanco: 5 ml de mezcla solución, más 0.5 ml de Folín.

Referencia: 100 ml de BSA, con 900 ml de agua bidestilada.

Muestra: 100 ml de extracto, con 900 ml de agua bidestilada.

b) Se agregaron 5 ml de la solución mezcla, se agitó vigorosamente y se dejó reposar 10 minutos.

c) Se agregaron 0.5 ml de solución Folín 1:3, se agitó vigorosamente y se dejó reposar 30 minutos, se determinó la absorbancia a 625 nm.

Determinación de la actividad específica de β -galactosidasa (Miller, 1992).

Para cada una de las cepas que se determinó la actividad enzimática, se puso un precultivo toda la noche en medio adecuado (medio mínimo con glucosa), a 37°C. Del precultivo se diluyó 1:100 en medio fresco y se pusieron en agitación a 37°C hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Se pusieron a incubar 20 minutos en hielo para detener el rápido crecimiento. Se adicionó a cada tubo 0.1 ml de cultivo y 0.9 ml de buffer Z (60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mM de KCl, 1 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mM de b-mercaptoetanol, a pH 7.0).

Para romper las células se adicionaron dos gotas de cloroformo y una de SDS al 1%, con una pipeta Pasteur, se agitaron los tubos por 10 segundos y se dejaron reposar cinco minutos a 28°C. Se agregaron 0.2 ml de ONPG (4 mg/ml) a cada tubo, se agitaron vigorosamente, en este momento dio comienzo la reacción (el ONPG se preparó en buffer de fosfatos 100mM a pH 7.0). La reacción se paró a diferentes tiempos, con 0.5 ml de Na_2CO_3 1 M. Se leyeron las reacciones a una densidad óptica de 420 nm. La cantidad de proteína en el extracto fue determinada por el método de Lowry. La actividad se reportó como ng de ONPG hidrolizado por minuto por mg de proteína a 28°C.

Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.

Para esto se utilizó el kit de USBioClean™ MP, por ser un método rápido y eficiente para extraer DNA de geles de agarosa, elimina solventes orgánicos, concentra el DNA sin precipitación con etanol y se pueden obtener rendimientos de hasta un 80%. La pureza del producto de este procedimiento es tan alta que puede ser utilizado en marcaje con radioactividad, digestiones enzimáticas o secuenciación. En este método se aprovecha la capacidad del vidrio para adherir el DNA por carga eléctrica (Vogelstein y Gillespie, 1979).

Primeramente se corrió un gel de agarosa con el DNA a purificar y se cortaron las bandas seleccionadas de acuerdo al patrón de peso molecular dado por 1 *HindIII*, y se colocó en un tubo Eppendorf, se le añadieron 3 volúmenes de yoduro de sodio 6 M y se incubó a 65°C hasta que se disolvió completamente la agarosa. Se añadieron 10ml de glass powder (granos de vidrio) y se mezclaron bien en un vortex, después se incubaron en hielo 30 minutos. Después se centrifugaron a 3000 rpm por 2 minutos en frío y se guardó el sobrenadante por si el DNA se hubiera quedado en él. Al tubo con la pastilla de vidrio, se le añadieron 500ml de buffer de lavado frío y se agitó bien en vortex, se centrifugó 2 minutos a 3000 rpm y se eliminó el sobrenadante, se lavó 2 veces más, se resuspendió en 30 ml de agua bidestilada estéril y se incubó a 42°C por 30 minutos, después se corrió un gel de agarosa al 1% con una alícuota de la muestra y cuando no se observó la banda se repitió el procedimiento con el primer sobrenadante que se guardó.

Extracción de DNA cromosomal de bacteria (Ausubel, *et al*, 1994).

A partir de un precultivo de toda la noche se inoculó 0.1 ml en 15 ml de medio Luria y se dejó crecer hasta la fase de crecimiento estacionaria, se centrifugó por 2 minutos a 5000 rpm y se tiró el sobrenadante, se resuspendió el botón de células en 5.6 ml de buffer TE, después se adicionaron 300 ml de SDS al 10% y 30 ml de proteinasa K, se mezclaron bien y se incubaron 1 hora a 37°C. Se adicionó 1 ml de NaCl 5 M y se mezcló bien, se adicionaron 800 ml de solución CTAB/NaCl. Se mezclaron bien y se incubaron 10 minutos a 65°C. Se adicionó un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico, se mezcló bien y se centrifugaron a 5000 rpm de 4 a 5 minutos. Se retiró la fase acuosa y se colocó en un tubo limpio, se adicionó un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico después se mezcló suavemente y se centrifugaron a 5000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio, se adicionaron 0.6 volúmenes de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos, el DNA se transfirió a un tubo con etanol al 70% para enjuagarlo, secarlo y finalmente se resuspendió en 1 ml de buffer TE.

Purificación de RNA total (Aiba, *et al.*, 1981).

Todo el material utilizado durante la manipulación de RNA se horneó (en caso de material de vidrio), y el nuevo se esterilizó en autoclave durante 25 minutos (en caso de material de plástico). El manejo durante todos los procesos se llevó al cabo con guantes y siempre se evitó el contacto directo con las manos. Los frascos de reactivos como etanol, cloroformo, fenol, etc. eran nuevos y solamente se introdujeron pipetas horneadas.

Soluciones y reactivos:

Agua bidestilada, filtrada y esterilizada, puede además añadirse dietilpírocarbonato al 0.2%, concentración final, se incubó toda la noche y después se esterilizó en autoclave. Con éste disolvente se prepararon las soluciones.

Solución de lisis:

NaAc 20 mM pH 7.5

EDTA 1 mM

SDS 0.5%

Se esterilizó en autoclave

Fenol bidestilado saturado con NaAc 20 mM pH 5.5 y EDTA 1 mM

Acetato de sodio 3 M pH 5.5 (esterilizado en autoclave)

Etanol absoluto

Etanol al 70%

Procedimiento:

Se puso un cultivo de toda la noche de la cepa deseada en medio mínimo con sus requerimientos respectivos.

Se inocularon matraces con 0.1 ml por cada 10 ml de medio y se crecieron a una densidad óptica de 80 unidades kletts. Una vez que se llegó a esta densidad se centrifugaron en corex siliconizados de 30 ml a 10000 rpm durante un minuto a 4°C. Se resuspendieron en 1/10 de volumen de solución de lisis. Una vez que se resuspendió se calentó a 65°C por un minuto. Inmediatamente se agregó un volumen de fenol saturado previamente calentado a 65°C. Se agitó en una incubadora a 65°C de 200 a 300 rpm durante 10 minutos asegurando que se mezclaran las fases. Se centrifugaron a 4000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Se

sumirgieron los tubos unos segundos en baño maría a 65° sin mezclar las fases, se tomó la fase acuosa y se repitió dos veces más la extracción. Se precipitaron con 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.5 más 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C durante toda la noche. Se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se resuspendieron en 500 ml de agua y se extrajeron con un volumen de cloroformo. Se volvieron a precipitar. Se centrifugaron en el cuarto frío por 15 minutos, se lavaron con etanol al 70%, se secó la pastilla ligeramente y se resuspendió en 50 ml de agua. Se leyeron en el espectrofotómetro 5 ó 10 ml de la muestra en 1 ml de agua a 260, 280 y 310 nm. El valor de la relación 260/280 fue de 2.0 y el de 310<0.01. El valor de 1.0 a una D.O de 260 nm equivale a 40 mg/ml de RNA.

Hibridización DNA-RNA (Northern blot) (Thomas, 1980).

Soluciones:

MENP 10X (1 lt)

MOPS 41.8 gr.

NaAc 6.8 gr Ajustar pH a 7.0

EDTA 3.7 gr

Mezcla de muestra (610 ml):

Formamida desionizada 400 ml

Formaldehido 37% 36 ml

MENP 10X 90 ml

H₂O 84 ml

Fosfato de sodio y potasio 1M pH 6.9

Solución de bromofenol:

5 ml de glicerol

0.05% de azul de bromofenol

100 ml de fosfato de sodio y potasio pH 6.9

5 ml de agua

SSC 20X

NaCl 3M

Citrato de sodio 0.3M

Denhart 50X:

Ficoll 1%

| | |
|----------------------|----|
| Polivinilpirrolidona | 1% |
| BSA | 1% |

Solución de prehibridación:

| | |
|------------------------------------|----------|
| Formamida | 5.0 ml |
| 20X SSC | 2.5 ml |
| Fosfato de Na y K pH 6.9 | 5.0 ml |
| Pirofosfato de Na% | 0.5 ml |
| SDS 10% | 0.1 ml |
| Denhart 50X | 1.0 ml |
| DNA de timo de ternera (10 mg/ml). | 0.25 ml |
| Sonda marcada | 0.125 ml |
| EDTA 0.5M | 0.05 ml |
| H ₂ O | 0.05 ml |

Se desnaturalizó el DNA (de timo de ternera y sonda juntos) 5 minutos a 100°C, se puso en hielo y se añadió la solución de hibridación.

Preparación de la sonda de DNA. A partir de un producto de PCR del gen *asnB*, se corrió un gel y se cortó una banda de 3 kb que corresponde a este gen y se purificó por el método de purificación de fragmentos a partir de geles de agarosa (glass powder) descrito en esta misma sección. 300 ng de fragmento fueron marcados por el método de Nick Translation del kit de BRL con dCTP alfa³²P.

Gel desnaturalizante. (Tsang *et al*, 1993):

La agarosa se prepara poniendo por cada 100 ml finales de agarosa:

- 10 ml MENP 10X
- 1.5 gr de agarosa (gel al 1.5%)
- aforar a 94.6 ml con agua

Se esterilizó en autoclave durante 15 minutos. Cuando se ha enfriado hasta 65°C se añaden 5.35 ml de formaldehído para una concentración final de 0.66M.

Tanto el peine como el molde para el gel y la cámara de electroforésis se trataron con RNAsas. Se sumergieron en NaOH 0.5M durante toda la noche y se enjuagaron con agua desionizada estéril.

El buffer de corrida es MENP 1X, y se utilizó una bomba peristáltica para recircular el buffer durante toda la corrida, misma que se llevó al acabo en el cuarto frío.

Preparación de muestras:

Se tomaron 7.5 ml de RNA (20 ml), se agregaron 22.5 ml de mezcla de muestra recién hecha y se mezcló. Se calentó a 65°C dos minutos y después se pusieron en hielo 5 minutos. Se añadieron 3 ml de solución de bromofenol, se mezcló y se cargó en el gel. El gel se corrió toda la noche en el cuarto frío a 20 V.

Transferencia:

El gel se pasó a una cámara de transferencia que consiste de SSC 20X.

Se transfirió durante 20 horas. Después, la misma nitrocelulosa se dejó secar entre dos filtros whatman, y luego se hornearon a 80°C durante 2.5 horas en un horno con vacío.

Hibridación:

Se enjuagó el filtro con SSC 4X durante 5 minutos y se dejó escurrir, después se puso en una bolsa para hibridación y se añadió solución de prehibridación, se selló la bolsa y se prehibridó a 42°C durante toda la noche. Se abrió en una esquina para sacar la solución de prehibridación y se llenó con solución de hibridación con la sonda radioactiva, se dejó hibridar toda la noche, se deshechó la solución y se lavó el filtro.

Lavado del filtro:

El filtro se lavó tres veces durante 5 minutos a temperatura ambiente en SSC 2X y SDS 0.1%. Después se lavó dos veces durante 10 minutos en SSC 0.1X y SDS 0.1% a 42°C, por último se enjuagó el filtro en 0.1X de SSC dos veces durante 15 minutos, se secó en un filtro whatman y se expuso con un film de rayos X.

Hibridación DNA-DNA (Southern blot).

La hibridación DNA-DNA, se realizó según Southern (1975). Primeramente se corre un gel de agarosa al 1% con las muestras de DNA cromosomal digerido con enzimas de restricción. Se tiñó el gel con bromuro de etidio y se tomó una fotografía del gel para posteriormente poder calcular los pesos moleculares de las bandas en base a los marcadores de peso molecular dados por *Hind III*.

a) Desnaturalización del gel:

Se colocó el gel en 5 volúmenes de una solución 0.25 M de HCl con agitación suave.

En seguida se colocó el gel en 5 volúmenes de una solución 1.5 M de NaCl, 0.5 M de NaOH por 20 minutos con agitación suave a temperatura ambiente, se repitió una vez más.

Neutralización del gel:

Se colocó el gel en una solución 1 M de Tris, 1.5 M de NaCl pH 7.5 por 20 minutos a temperatura ambiente con agitación suave, se repitió la operación.

Para una buena eficiencia de neutralización del gel debemos obtener un pH menor de 8.5.

b) Transferencia del DNA:

Se colocó el gel en una cámara de transferencia con solución SSC 20X, en seguida se colocó sobre el gel un filtro de *nylon* del mismo tamaño, se montó la torre de transferencia con filtro *Wattman* y papel absorbente y se dejó transfiriendo toda la noche. Posteriormente se secó el filtro en un horno a 80°C por una hora.

c) Prehibridización de la membrana:

Soluciones: Formamida 100% (para una concentración final de 50%)
SSPE 20X (NaCl 3 M, NaH₂PO₄.H₂O, NA₂EDTA 0.002M, pH 7.4). (para una concentración final de 6X)

Denhardt 50X (concentración final de 5X).

SDS 10% (concentración final de 1%).

DNA de timo de ternera 10 mg/ml

Se colocó el filtro en una bolsa de hibridización y se hizo una solución de prehibridización mezclando las soluciones anteriores según el área de la membrana. Se utilizaron 20 ml de DNA de timo por cada ml de solución de prehibridización; éste se hiervió previamente por 10 minutos y se colocó en hielo, se adicionó la solución de prehibridización a la bolsa con el filtro y se deja toda la noche a 42°C.

d) Hibridización de la membrana:

Se utilizaron las mismas soluciones que en la prehibridización pero además se le adicionó la sonda marcada con el kit de BioNick™ previamente hervida por 10 minutos y se dejó hibridando toda la noche a 42°C.

e) Lavado del filtro:

Para una alta astringencia se lavó 2 veces en una solución SSC 5X, SDS 5% durante 5 minutos, después se lavó con una solución SSC 0.1X, SDS 1%, durante 30 minutos, finalmente se lavó una vez con una solución SSC 2X durante 5 minutos.

f) Unión del conjugado estreptoavidina-fosfatasa alcalina (SA-AP):

Se lavó el filtro durante 5 minutos en TBS-Tween 20 (Tris base 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.05% (v/v), pH 7.5) durante un minuto. Se colocó la membrana en un contenedor limpio y se agregó solución bloqueadora a 65°C y se incubó una hora a 65°C con agitación suave, se centrifugó el tubo del conjugado SA-AP durante 30 minutos en frío, luego se tomó la cantidad necesaria y se diluyó 1/1000 en TBS-Tween. Se quitó la membrana de la solución de bloqueo, para posteriormente colocarla en un contenedor con el conjugado y ponerlos en agitación suave a temperatura ambiente durante 10 minutos, asegurándose que la solución cubriera completamente la membrana. La membrana se lavó 15 minutos en TBS-Tween, y se repitió el mismo lavado en solución fresca durante una hora. Se lavó la membrana durante una hora en solución de lavado final (final wash buffer), luego se colocó la membrana en una mica y se adicionaron 500ml del reactivo de detección, se colocaron en un folder para evitar el paso de la luz para finalmente ponerlo a incubar 30 minutos a 37°C. Se expuso una placa de rayos X por el tiempo conveniente y se reveló.

Obtención de la sonda del operon *glbDF*:

Se obtuvo a partir del plásmido *pRSP21* (Castaño et al, 1988) el cual contiene al operon *glbDF*. El plásmido fue digerido con la enzima *Hind III*, la cual generó 6 fragmentos, entre los cuales encontramos los del operón *glbDF*. Posteriormente se marcó la sonda por el método de BioNick.

Obtención de la sonda de *asnB*:

La sonda se obtuvo por el método de PCR. La amplificación del gen *asnB* cromosomal, se llevó al cabo utilizando un par de oligonucleótidos específicos que se diseñaron en base a la secuencia reportada por Scofield y

colaboradores (1990). Los oligonucleótidos diseñados fueron: 1C 5'gggegttgtgcaggg3' y 2C 3'ccaactgegacgtccgag5'.

Utilizando la Taq polimerasa (Gibco), DNA de la cepa silvestre y los oligos se preparó la mezcla de "reacción en cadena de la polimerasa", y se colocaron en una maquina de PCR bajo las siguientes condiciones:

Programa No.1: 3 minutos a 94°C

Programa No.2, con tres temperaturas de PCR:a 94°C por 30 segundos; a 55°C por 30 segundos; a 72°C por 30 segundos, con un total de 30 ciclos.

Programa No.3, con tres temperaturas de PCR:a 94°C por 30 segundos; a 55°C por 1 minuto; a 72°C por 30 minutos, con un total de 3 ciclos.

Marcaje de la sonda de DNA:

Las sondas utilizadas (*gltBDF* y *asnB*), se purificaron por el procedimiento de glass powder. Después se marcaron con el kit de BioNick equivalente al de Nick Traslacion pero no radiactivo. En este metodo se utiliza un complejo de biotina-14-dATP el cual es incorporado al DNA. Una vez llevada al cabo la hibridización, este es revelado por el procedimiento de unión del conjugado SA-AP (avidina-fosfatasa alcalina). Poner en tubo Eppendorf 5ml de dNTP Mix, 21ml de DNA, 19ml de agua y 5ml de Enzima Mix. Mezclar bien y poner a incubar 1 hora a 16°C. Adicionar 5 ml de Stop Buffer. Añadir 1ml de tRNA de levadura. Precipitar con etanol, acetato de sodio 2 veces y finalmente resuspender la sonda en 50 ml de buffer TE. Almacenar a -20°C.

RESULTADOS

Para cumplir con los objetivos planteados, se decidió aislar una fusión transcripcional del gen *asnB* con el gen *lacZ* utilizando a los bacteriófagos *MudxX* y *Mu11734*.

Para la obtención de esta mutante, el primer punto a considerar era el diseñar una estrategia que permitiera seleccionar las mutaciones que aparecieran (ocurriesen) en *asnB*. Para ello, fue remplazado, en la cepa JF448 (Felton *et al*, 1980), el alelo *asnB32* por el alelo silvestre proveniente de la cepa MX614.

Se propagó el bacteriófago P1virA en una cepa protótrofa de asparagina portadora de un Tn10 en el minuto 15.75, para después cruzarlos por la cepa Felton (JF448), la cual es auxótrofa de asparagina y es portadora de las mutaciones *asnA31*, y *asnB32*, de esta cruce se seleccionaron transductantes Tc^R, de las cuales un 40% resultaron protótrofos de asparagina, lo cual nos indica, que el alelo *asnB32* ha sido reemplazado por el gen silvestre *asnB*. Una transductante, denominada JF448-P (*asnA31 asnB⁺ Tc^R*) fue purificada y utilizada en los subsiguientes pasos de mutagénesis.

Mutagenesis con el bacteriófago *MudX*

A partir de lisados de la cepa CHS135 se infectó a la cepa JF448-P con el fago *MudxX*, el cual además de inactivar el gen en el cual transpone, crea una fusión transcripcional entre el gen en cuestión y *lacZ*.

Después de infectar a la cepa JF448-P, tal y como se describe en material y metodos, se seleccionaron las colonias auxótrofas de asparagina, Cm^R, Lac⁺, Aut⁻; una cepa con estas características fue utilizada como donadora de P1virA. Este lisado se utilizó para transducir el transposon *MudX* presente en la cepa JF448-P, a la cepa MX614. Una de las transductantes con fenotipo Cm^R Aut⁻ Lac⁺ fue purificada y se le denominó MX4000.

El fenotipo Ntr⁻ de la cepa MX4000, se observó al crecer a la cepa silvestre (MX614), y a la mutante (MX4000) en NH₄⁺ 15 mM y en arginina como fuente de nitrógeno donde ambas cepas crecen bien

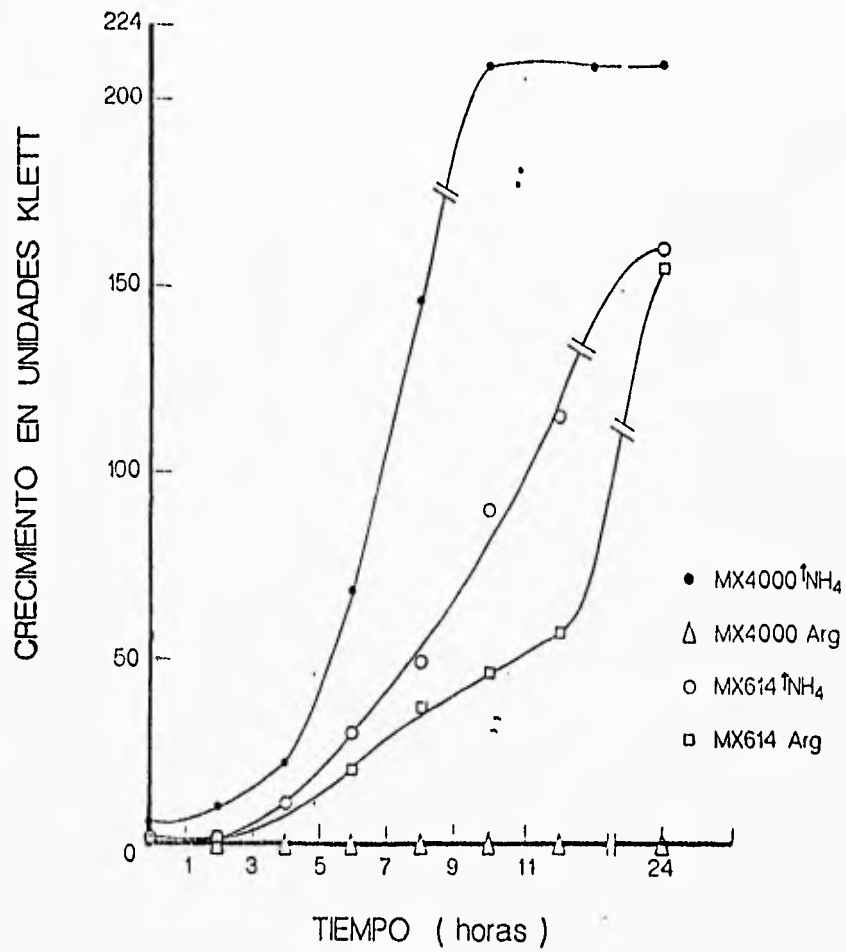


FIGURA 4. CURVA DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS MX614 Y MX4000

en amonio 15 mM, y en arginina crece solamente la cepa silvestre (figura 4).

Por tanto, la capacidad de utilizar arginina al 1% como fuente de nitrógeno es un reflejo de la capacidad de la célula para inducir la respuesta *Ntr* durante el crecimiento en fuentes limitantes de nitrógeno.

Mutagénesis con el bacteriofago *MudI1734*

La cepa JF448-P fue utilizada para ser infectada con un lisado del bacteriofago *MudI1734*, tal y como se describe en la sección de material y métodos. El total de la población, fue seleccionada en LKan,Tc, lo que garantizó la presencia de al menos un fago por célula. El bacteriofago P1 fue propagado en una mezcla de varios auxotrofos de aspargina (pool) obtenidos de la población celular Tc^R Kan^R. Ambos marcadores de resistencia fueron transducidos a fondo genético silvestre (cepa MX614). Una de las transductantes Kan^R Tc^R fue purificada y denominada MX4003.

Determinación de la actividad de β -galactosidasa en la cepa MX4000.

La cepa MX4000 fue crecida en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono y como fuente de nitrógeno se utilizó glutamina 6.8 mM, aspargina 1.9 mM, amonio 0.5 y 15 mM. La actividad de β -galactosidasa en cada uno de estos cultivos fue determinada tal y como se describe en material y métodos. Los resultados se muestran en la tabla I, donde se puede observar que el valor obtenido en amonio 15 mM es 2.3 veces mayor que el valor obtenido cuando las células se crecieron en amonio 0.5 mM, la pequeña diferencia entre estos dos valores, no permite concluir con certeza si ésta puede ser adscrita a un control transcripcional. Por otro lado, se puede observar que cuando las células se crecieron en glutamina se obtuvieron los valores más elevados de la actividad específica de β -galactosidasa, esto puede deberse a que este gen tiene como sustrato a la glutamina y en cierto modo sugiere la existencia de un control que

sea el responsable de las diferencias observadas. Cuando las células se crecieron en asparagina como fuente de nitrógeno se observa actividad transcripcional, lo cual resultó inesperado, ya que se sabe que la asparagina reprime a este gen. Sin embargo, es posible que se requiera del gen silvestre para observar represión total, tal y como ha sido reportado para *glbDF* cuando *E. coli* es crecida en glutamato como fuente de nitrógeno (Castaño *et al.*, 1992)

Amplificación y secuenciación parcial del gen *asnB*.

Dado que para llevar al cabo los experimentos de hibridación tipo Southern, se requiere de una sonda específica del gen deseado. Decidimos obtenerla mediante amplificación del gen *asnB*.

Para ello se diseñaron dos oligonucleótidos específicos en base a la secuencia reportada (Scofield, *et al.*, 1990). Los oligos fueron los siguientes: oligo 1C 5'ggcgcgttggtgcagg3'; oligo 2C 3'ccaactgcgaegtccgag5'.

El producto amplificado fue de aproximadamente 3 kb (figura 5), lo cual fue consistente con el tamaño esperado. Sin embargo, para tener la certeza de que este producto de amplificación representaba al gen *asnB*, este producto fue purificado y secuenciado parcialmente. Se identificó una región correspondiente a las bases 2751 a 3051 de la secuencia reportada y en base a esta región se comprobó que se trataba de la sonda correcta

Actividad transcripcional del gen *asnB* en la cepa silvestre (MX614) en diferentes fuentes nitrogenadas.

Una vez que se obtuvo la sonda específica del gen *asnB* se procedió a realizar hibridaciones tipo Northern para determinar la actividad transcripcional del gen *asnB* para la cepa silvestre en diferentes condiciones de nitrógeno.

Para ello, se aisló RNA total, a partir de cultivos de la cepa MX614 crecida en medio mínimo con glucosa y diferentes fuentes de nitrógeno. (tal y como se describe en la sección de material y métodos)

Tabla I. Actividad específica de β -galactosidasa en la cepa MX4000

| Cepa | 15mM NH ₄ ⁺ | 0.5mM NH ₄ ⁺ | 6.8 mM Gln | 1.9 mM Asn |
|--------|-----------------------------------|------------------------------------|------------|------------|
| MX614 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| MX4000 | 533.243 | 231.599 | 803.996 | 296.410 |

Las actividades enzimáticas están expresadas como nanomoles de ONPG hidrolizado por minuto por miligramo de proteína.

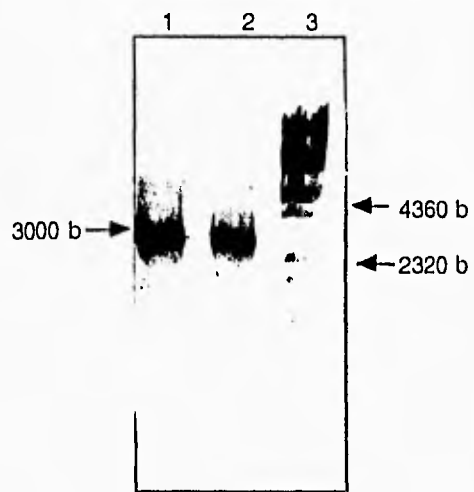


Figura 5. Productos de amplificación por PCR del gen *asnB* de la cepa mutante JF448 en el carril 1 y de la cepa silvestre MX614 en el carril 2 y en el carril 3, λ cortado con *Hind III* como marcador de peso molecular.



Figura 6. Análisis tipo Northern (hibridación DNA-RNA) a partir de RNA total de la cepa silvestre MX614 crecida en diferentes condiciones nitrogenadas, la sonda específica utilizada fue el producto de PCR del gen *asnB*. En el carril 1 la cepa MX614 se creció en glutamato como fuente de nitrógeno, en el carril 2 asparagina, en el 3 NH_4 0.5 mM y en el carril 4 NH_4 15 mM.

El RNA así aislado, fue sometido a electroforésis en un gel de agarosa con formaldehído y posteriormente transferido a una membrana de nitrocelulosa. Esta membrana fue hibridada con la sonda del gen *asnB* (marcada radioactivamente).

En la figura 6, se muestran los resultados de esta hibridación. El primer carril nos muestra la cantidad de transcrito para la condición de amonio 15 mM, y como se puede apreciar, es en esta condición donde más transcrito se observa. En las condiciones correspondientes a amonio 0.5 mM y glutamato 12 mM, carriles 2 y 3 respectivamente, es evidente una menor cantidad de mensajero en ambos carriles con respecto a la condición de exceso de amonio, sin embargo, no se observan diferencias cuando estas condiciones son comparadas entre sí. Finalmente, cuando el RNA provino de células crecidas en asparagina como fuente de nitrógeno, el transcrito de *asnB* es indetectable, tal y como se esperaba (este punto será discutido con mayor detalle en la próxima sección).

Actividades específicas de GS en diferentes condiciones de nitrógeno en las cepas MX4000 y MX614.

Dado que la cepa MX4000 presenta fenotipo *Aur⁻*, y este fenotipo está dado por el sistema *Ntr*, que es controlado a través del nivel intracelular de NR_I-P, decidimos averiguar si las enzimas GS y GOGAT, que también son reguladas directa o indirectamente por NR_I-P, se encuentran alteradas en la cepa mutante MX4000.

En la tabla II, se observa que las actividades de GS para la cepa MX4000 en condiciones de limitación y exceso de nitrógeno (0.5 mM y 15 mM respectivamente), son muy similares a las actividades detectadas en la cepa silvestre. En cambio, las actividades determinadas para la cepa MX4000 en glutamina como fuente de nitrógeno, son cuatro veces menores a las determinadas en la cepa silvestre, esto indica la incapacidad de la cepa mutante para desreprimir la transcripción de la glutamino sintetasa cuando las células se crecen en glutamina como fuente de nitrógeno. Cuando las células se crecieron en asparagina como fuente de nitrógeno se observa que disminuye a la mitad la actividad específica de la cepa

Tabla II. Actividad específica de la enzima GS en las cepas MX614 y MX4000.

| Cepa | 15mM NH ₄ ⁺ | 0.5mM NH ₄ ⁺ | 6.8 mM Gln | 1.9 mM Asn |
|--------|-----------------------------------|------------------------------------|------------|------------|
| MX614 | 0.1593 | 1.3067 | 1.2920 | 1.3032 |
| MX4000 | 0.1356 | 1.0879 | 0.3278 | 0.7467 |

Las actividades enzimáticas están expresadas como nanomoles de γ -glutamihidroxlamato formado por minuto, por miligramo de proteína a 37°C.

mutante en relación con la cepa silvestre. , esto posiblemente se debe a que la asparagina una vez que entra a la célula es convertida muy rápidamente a aspartato por ser una fuente preferencial de nitrógeno en comparación con la asparagina (Willis, 1973), así la hidrólisis de la asparagina en aspártico y amonio, puede provocar un aumento abrupto en la concentración intracelular de amonio, provocando la represión parcial de la GS. Posiblemente si se mide la actividad de GS en condiciones limitantes de asparagina, esta represión quizá tienda a disminuir.

Actividad específica de GOGAT en diferentes condiciones de nitrógeno para las cepas MX614 y MX4000.

En la tabla III, se puede observar que las actividades detectadas en alto amonio, bajo amonio y glutamina para la cepa mutante (MX4000), son prácticamente nulas en relación con la cepa silvestre (MX614), lo cual indica que la mutación que porta la cepa MX4000 está afectando a una de las enzimas más importantes del metabolismo nitrogenado: la GOGAT. En relación a las actividades determinadas cuando las células se crecieron en asparagina como fuente de nitrógeno, son muy bajas y muy parecidas en ambas cepas, en la cepa silvestre es debido a que posiblemente la asparagina está inhibiendo a la GOGAT por su parecido con el glutamato (Miller, 1972); en la cepa mutante puede ser esta misma causa o bien la falta de una GOGAT funcional.

Hibridación tipo Southern de las cepas MX614, MX4000 y MX4003, con la sonda específica de GOGAT.

Dado el fenotipo tan dramático que presentó la cepa MX4000, en la síntesis de GOGAT, decidimos llevar a cabo experimentos tipo Southern blott, con el objeto de localizar de manera más directa la presencia del transposon en el genoma de *Escherichia coli* y lo más adecuado fué pensar que el transposon se encontraba en algún lugar del operon *glbDF* y se hizo la hibridación con la sonda específica de GOGAT, la cual se obtuvo a partir del plásmido pRSP21.

En la figura 7 puede observarse el patrón de hibridación de la cepa silvestre para la sonda de GOGAT (carril 1) y en el carril 2 se ve claramente que la cepa mutante MX4000 tiene un patrón diferente lo cual lleva a concluir que el transposon Mudx está en *gltB*, entonces, los resultados antes presentados para GS y GOGAT son comparables con los reportados por Castaño *et al* (1988), para mutantes *gltB*. El hecho de que en la cepa MX4000 el transposon se encuentre en *gltB*, puede deberse a que en el momento de transducir el carácter Cm^R a fondo genético silvestre, el bacteriófago transpusiera en otra región del cromosoma de la cepa MX614, y dada la selección *Aur*⁻, que se llevó al cabo, llevara a seleccionar un nuevo evento de transposición y no un simple evento de recombinación (transducción).

Hibridación tipo southern de las cepas MX614, MX4000 y la MX4003, con la sonda específica de *asnB*.

En la figura 8, se observa que la cepa mutante MX4000 presenta el mismo patrón que la cepa silvestre (MX614) lo cual nos indica que la cepa mutante MX4000 no tiene el transposón en el gen *asnB*, sin embargo, la cepa MX4003 presenta un patrón diferente al observado en la cepa silvestre, se observa que la banda de aproximadamente 3 kb aumentó su tamaño, lo que sugiere que el MudII734 se encuentra en el gen *asnB*. Estos resultados aunados a los de la figura 7 de las hibridaciones DNA-DNA, con la sonda específica de GOGAT demuestran que la fusión transcripcional del gen *asnB* se encuentra en la cepa MX4003 y no en la cepa MX4000.

Determinación de la actividad transcripcional del gen *asnB* en función de la actividad específica de β -galactosidasa

Una vez que se determinó que la cepa MX4003 tiene una fusión transcripcional del gen *asnB* con *LacZ* se procedió a medir la actividad transcripcional del gen *asnB* en función de la actividad específica de β -galactosidasa.

En la tabla IV, se observa que la actividad específica de β -galactosidasa es 2 veces mas alta cuando se crecieron en 15mM de NH_4^+ , que cuando se crecieron en 0.5mM NH_4^+ , la mayor actividad fué detectada cuando las células se crecieron en glutamina 8.6mM como fuente de nitrógeno, cuando las células se crecieron en asparagina como fuente de nitrógeno los valores de actividad enzimática obtenidos fueron muy parecidos a los detectados cuando se crecieron a las células en condición de limitación de amonio (0.5mM), este ultimo valor es un poco contradictorio al obtenido en el Northern de la figura 6, donde se observa que hay una represión total por asparagina, este valor obtenido para β -galactosidasa en asparagina posiblemente se debe a la ausencia del gen silvestre como tal

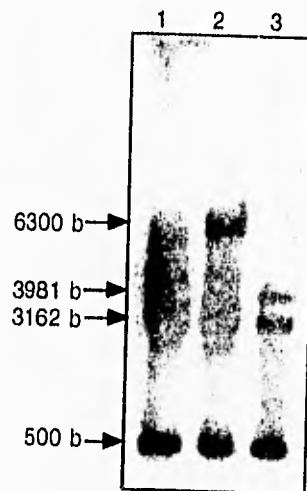


Figura 7. Hibridación tipo southern (DNA-DNA) con DNA total digerido de la cepa silvestre MX614 y de la cepas mutantes MX4000 y MX4003, se usó como sonda específica el operón *glIBDF*.

Carril 1. DNA total de la cepa silvestre MX614 digerido con las enzimas *Eco RI-Bgl II*

Carril 2. DNA total de la cepa mutante MX4000 digerido con las enzimas *Eco RI-Bgl II*

Carril 3. DNA total de la cepa mutante MX4003 digerido con las enzimas *Eco RI- Bgl II*

Tabla III. Muestra las actividades específicas de GOGAT para la cepa silvestre (MX614), y para la cepa mutante (MX4000).

| Cepa | 15mM NH ₄ ⁺ | 0.5mM NH ₄ ⁺ | 6.8 mM Gln | 19mM Asn |
|--------|-----------------------------------|------------------------------------|------------|----------|
| MX614 | 143.260 | 92.0 | 101.400 | 2.210 |
| MX4000 | 4.180 | 2.180 | 4.600 | 2.300 |

Las actividades enzimáticas están expresadas en nanomoles de NADPH oxidado por minuto por miligramo de proteína a 21°C.

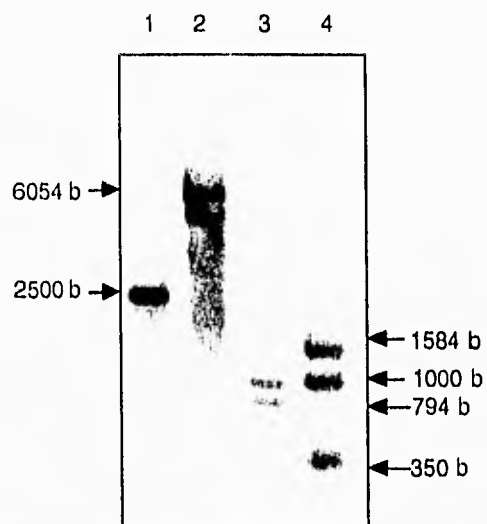


Figura 8. Hibridación tipo Southern (DNA-DNA) con DNA total digerido de la cepa silvestre MX614 y de la cepa mutante MX4003, se usó como sonda específica la amplificación por PCR del gen *asnB*

Carril 1. DNA de la cepa MX614 digerido con *Bgl II*.

Carril 2. DNA de la cepa MX4003 digerido con *Bgl II*

Carril 3. DNA de la cepa MX614 digerido con *Hinf I*

Carril 4. DNA de la cepa MX4003 digerido con *Hinf I*

Tabla IV. Muestra la actividad de β -galactosidasa de la cepa MX4003 en diferentes condiciones de nitrógeno.

| cepa | 15mM NH ₄ ⁺ | 0.5mM NH ₄ ⁺ | 8.6mM Gln | 19mM Asn |
|--------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------|----------|
| MX614 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| MX4003 | 7.638 | 3.083 | 9.208 | 2.557 |

Las actividades enzimáticas están expresadas como nanomoles de ONPG oxidado por minuto por miligramo de proteína.

Discusion

Para cumplir los objetivos planteados, el primer paso fue aislar y caracterizar una cepa mutante en el gen *asnB*. Para ello se aislaron cepas auxótrofas de asparagina en un fondo genético *asnA⁻*, y posteriormente se siguieron dos diferentes estrategias para segregar la mutación.

La primera, consistió en extrapolar los resultados previamente reportados para *K. aerogenes*, y suponer que las cepas *asnB⁻* en *Escherichia coli*, también tendrían fenotipo *Ntr⁻*.

La segunda estrategia, fue buscar los eventos de inserción cerca del minuto 15, sin seleccionar ningún fenotipo en particular.

Con la primera, fue aislada la cepa MX4000, la cual mostraba el fenotipo esperado para una mutación en *asnB*. Sin embargo, en base a su caracterización fisiológica, se dedujo que la inserción podía encontrarse en *glbB*. Posteriores pruebas moleculares confirmaron esta suposición.

De hecho, los valores obtenidos para la actividad de GOGAT en la cepa MX4000 fueron bastante sorprendentes, ya que fueron valores entre 20 y 30 veces menores en relación a los obtenidos para la cepa silvestre (MX614). Estos resultados, aunados al fenotipo *Ntr⁻*, claramente sustentaron la hipótesis de que la mutación en la cepa MX4000 afecta *glbB*.

Otra característica que apoyaba esta hipótesis fue, que cuando se determinaron las actividades específicas de GS en la cepa silvestre y en la cepa MX4000, esta última presentó valores 4 veces por abajo de los obtenidos para MX614, cuando se utilizó glutamina como fuente de nitrógeno. Por lo tanto, la cepa mutante es incapaz de desreprimir a la glutamino sintetasa cuando las células son crecidas en glutamina. Este fenotipo se conoce como *Gsd⁻*, y fue descrito por primera vez por Castaño *et al* (1988) para cepas *glbB⁻*.

Con estos datos fisiológicos, era evidente que la cepa MX4000 mostraba las mismas características que la cepa *glbB⁻* previamente reportada (Castaño *et.al*, 1988) esto es, fenotipo *Ntr⁻*, *Gsd⁻* y por supuesto, ausencia de una GOGAT funcional. Sin embargo, a diferencia de la mutante ya reportada, con la cepa MX4000 se evaluó si los niveles de actividad de GOGAT reportados en las diferentes condiciones de nitrógeno, reflejan cambios en la tasa de transcripción o simplemente obedecen a la modulación de la actividad enzimática.

Para determinar el nivel de transcripción del gen *glbB*, se evaluó la actividad de β -galactosidasa, utilizando diferentes fuentes de nitrógeno en el medio de cultivo.

Como fue mostrado en la sección de resultados, en glutamina o amonio 15 mM se observa la mayor actividad transcripcional, esto es, de 2.5 a 4 veces en relación a la actividad observada en NH_4 0.5 mM (ver tabla I).

Estas diferencias correlacionan con el nivel de actividad específica de GOGAT detectado en la cepa silvestre, en donde los mayores niveles de actividad también se detectan en glutamina y amonio 15 mM.

De estos resultados podemos concluir, que la disminución de la GOGAT observada en condiciones de limitación de nitrógeno, refleja una reducción en la transcripción del gen *glbB*.

El control transcripcional ejercido sobre el promotor *glbB* también se observa cuando se analizan las actividades de β -galactosidasa y GOGAT, obtenidas con asparagina como fuente de nitrógeno.

A pesar de que la actividad observada en asparagina puede tener una explicación particular, como lo es el hecho de que su degradación da lugar a ácido aspártico, precursor rápido y directo de glutamato, siendo este último represor específico de *glbB*.

También, podemos considerar una explicación alternativa, ésta implica que los niveles transcripcionales de *glbBDF* son bajos en fuentes limitantes de nitrógeno, como amonio 0.5 mM y asparagina, y los valores de β -galactosidasa detectados en estas condiciones de limitación de nitrógeno, reflejan el nivel basal de transcripción del operón *glbBDF*.

Para considerar que durante deficiencia de nitrógeno se obtienen niveles basales de transcripción, es necesario postular que durante el crecimiento en condiciones no limitantes, debe existir un activador, que permita elevar la tasa de transcripción en estas condiciones.

Este papel, puede ser cumplido por la proteína Lrp (producto del gen *lrp*), la cual se ha reportado como un regulador del operón *glbBDF*.

La proteína Lrp fue inicialmente reportada como el regulador global de la respuesta a leucina. En esta respuesta, se observó que al adicionar leucina al medio de cultivo, existen proteínas que aumentan y otras que disminuyen en extractos totales analizados por electroforesis bidimensional. Entre ellas, se identificó el producto del gen *glbD* (Ernsting, 1992).

Posteriormente, se identificaron en la región regulatoria del operón *gltBDF* un sitio de unión a Lrp, el cual une Lrp con alta afinidad. y aparentemente, la unión de Lrp a este sitio, activa la transcripción de *gltBDF* (Brian *et al*, 1993). Esta última aseveración se basa en el hecho de que mutantes *lrp⁻* tienen niveles muy bajos de transcripción de *gltBDF*, pero aún no se han hecho ensayos "in vitro" con el promotor *gltBDF*, RNAPolimerasa y Lrp para confirmar la observación genética.

Fue reportado, que la concentración de Lrp disminuye en medios de cultivo "ricos" como Luria o "medio mínimo enriquecido". Desgraciadamente, los autores no hacen una clara descripción del medio mínimo "enriquecido", sin embargo mencionan que es rico en aminoácidos (Ernsting, *et al* 1993).

Con esta información se puede hipotetizar que la activación de *gltB* en fuentes de nitrógeno no limitantes, podría estar mediada por Lrp. De este modo, aquellas fuentes limitantes de nitrógeno como amonio bajo, o aminoácidos cuya lenta degradación simula condiciones de limitantes de nitrógeno, pueden provocar por algún mecanismo, la disminución de los niveles intracelulares de Lrp y con ello disminuir la transcripción del operón *gltBDF*.

El modelo enunciado en el párrafo anterior predice que en condiciones limitantes de nitrógeno, Lrp estaría baja y por lo tanto, también el nivel de transcripción del operón *gltBDF*. Sin embargo, nosotros observamos que en glutamina los valores de β -galactosidasa se encuentran elevados.

Este último resultado es explicado dado que la glutamina asimilada debe ser convertida a glutamato (el cual es el principal donador de grupos nitrogenados) y esta conversión ocurre principalmente por acción de la GOGAT (Magasanik y Neidhar, 1987).

Por lo tanto, es necesario considerar que si Lrp fuera el único regulador de GOGAT, sería necesario que bajo ciertas condiciones de limitación de nitrógeno (como glutamina) la poza de Lrp no disminuyera. o alternativamente, considerar la existencia de mecanismos de control Lrp-independientes, que ejercen su efecto sobre la síntesis de GOGAT en estas condiciones.

Estos modelos propuestos, o algún otro alternativo, sólo podrán ser evaluados llevando al cabo estudios sobre la biosíntesis de Lrp que tengan

como objetivo elucidar el papel que ejerce *Lrp* sobre la transcripción de *gltB*, en diferentes condiciones de cultivo.

Para finalizar la discusión de la mutación *gltB::MudX*, se hará referencia a los resultados de GS observados para la cepa MX4000, como ya ha sido reportado, existen resultados que sugieren un estrecho vínculo entre la regulación de GOGAT y el sistema *Ntr*, en el cual el operón *glnALG* ocupa un lugar destacado.

Entre estos resultados se demuestra, la incapacidad observada de las células *gltB⁻* para crecer en fuentes limitantes de nitrógeno (*Ntr⁻*) (Tyler, 1978). Este resultado en si mismo sugiere que el nivel de NR1-P debe ser menor al de la cepa silvestre. Esta sugerencia se reforzó cuando se encontró que mutaciones en *glnL* del tipo constitutivo (*glnLC*) suprimen el fenotipo *Ntr⁻* de las mutantes *gltB* (Pahel *et al*, 1978; Magasanik, 1982).

Adicionalmente, ya ha sido mencionado que las cepas *gltB⁻* son incapaces de elevar el nivel de GS cuando son crecidas en glutamina como fuente de nitrógeno. Aunque la causa del fenotipo *Gsd⁻* es desconocida, se sabe que niveles silvestres de GOGAT no restablecen la inducción de los sistemas *Ntr* (Castaño *et al*, 1988).

Sin embargo, análisis de complementación indicaron que los genes *gltD* y *gltF* parecen ser importantes para la completa inducción de la síntesis de histidasa (bajo control de *Ntr*) (Castaño *et al*, 1992). El hecho de que se requiera la presencia de *gltD* para observar fenotipo *Ntr⁺* complicó el posible modelo de regulación que explique a nivel molecular como los niveles de *gltD* y *gltF* alteran el sistema *Ntr*.

En este caso, la cepa MX4000 mostró el fenotipo *Gsd⁻* esperado, sin embargo, se observan valores relativamente bajos de GS durante el crecimiento en asparagina como fuente de nitrógeno. Dado lo consistente de este resultado, podríamos considerar que el fenotipo *Gsd⁻* y esta disminución observada en asparagina, tienen en común la presencia del nitrógeno amido de estos compuestos, quizá el metabolismo de estos grupos amido, de alguna manera favorece la disminución de la GS observada en estas condiciones, alternativamente, los productos de degradación (por amidasas, que darían lugar a glutamato y aspartato respectivamente, los cuales son rápidamente interconvertibles) de algún modo modularán esta incapacidad para inducir GS.

A pesar de que se requieren todavía una gran cantidad de estudios que

permitan conocer los controles a los cuales la expresión de *glBDF* se encuentra sujeta, nuestros resultados aportan información con respecto al nivel de transcripción de *glBDF* en diferentes condiciones de cultivo y demuestran que existe una modulación de la transcripción del operón en las diferentes condiciones estudiadas.

En la segunda parte de este trabajo finalmente se logró aislar una mutante *asnB::lacZ*. La presencia de la inserción (*Mud11734*) fue confirmada por hibridación DNA-DNA, usando como sonda específica al gen *asnB*, en esta hibridación se observa claramente que la cepa mutante MX4003 tiene un patrón diferente al de la silvestre, donde una de las bandas de la mutante aumenta su tamaño de 2.7 kb a aproximadamente 6 kb, esto confirma que la mutación se encuentra en *asnB*.

A diferencia de los resultados reportados para las mutantes *asnB* en *K. aerogenes*, la cepa MX4003 es capaz de crecer en arginina como única fuente de nitrógeno y por lo tanto, no presenta fenotipo *Ntr⁻*.

Esta discrepancia no es totalmente sorprendente, pues en *K. aerogenes* se han reportado diversas vías metabólicas sujetas a control *Ntr* sin embargo, este control no ha sido observado ni en *S. typhimurium* o ni en *E. coli*.

Dado que la cepa MX4003 fue aislada posteriormente a la cepa MX4000, su caracterización es aún incipiente. Por ello, es aun necesario determinar el nivel de actividad de las principales enzimas del metabolismo nitrogenado, para concluir si las mutaciones en *asnB* alteran la regulación del mismo en *E. coli*.

Posteriormente, se procedió a determinar la actividad transcripcional de este gen en función de la actividad específica de β -galactosidasa en diferentes condiciones de nitrógeno, para de esta manera obtener información de la regulación de este gen en los diferentes tipos de fuentes nitrogenadas.

Los valores obtenidos de β -galactosidasa de la cepa MX4003 son 2.5 veces mas elevados cuando las células se crecieron en amonio 15 mM que los valores obtenidos cuando las células se crecieron en amonio 0.5 mM, en tanto que los valores más altos se obtuvieron cuando las células se crecieron en glutamina como fuente de nitrógeno. Estos valores concuerdan con los obtenidos en la hibridación DNA-RNA, usando como sonda específica el gen *asnB*, donde se observa una mayor cantidad de transcrito cuando las células se crecieron en amonio 15 mM como fuente de nitrógeno, en relación

a cuando las células se crecieron en fuentes limitantes de nitrógeno como lo son amonio 0.5 mM y glutamato. En tanto que cuando las células se crecieron en asparagina como fuente de nitrógeno, los valores de β -galactosidasa son muy parecidos a los obtenidos en células crecidas en amonio 0.5 mM. Probablemente este resultado refleje la necesidad de un gen funcional para lograr una completa represión, tal y como fue observado para GOGAT (Castaño et al, 1992)

Cabe mencionar que las diferencias observadas en la cantidad de mensajero y de β -galactosidasa, probablemente reflejen la existencia de algún mecanismo que permita la represión (o falta de activación) de *asnB* durante la deficiencia de nitrógeno, quizá con el objeto de proteger la poza de glutamina.

En este sentido, podría no ser casual el hecho de que la mayor transcripción de *gltBDF* y *asnB* ocurre cuando las células son crecidas en glutamina como fuente de nitrógeno, o cuando la poza de glutamina es alta, como en amonio 15 mM.

En este sentido, es posible especular la existencia de un mecanismo capaz de disminuir los niveles transcripcionales de *asnB* y *gltBDF* en condiciones limitantes de nitrógeno (por ejemplo ausencia de Lrp). De hecho, ha sido observado que cepas mutantes *glnG⁻* presentan aproximadamente el 50% de la actividad de GOGAT observada en la cepa silvestre, durante el crecimiento en 15 mM amonio (Osorio, y .Camarena, comunicación personal). En estas condiciones la poza de glutamina, normalmente alta, se vería afectada por la disminución de GS provocada por la mutación *glnG⁻*, esta disminución en la poza de glutamina provocaría la drástica disminución de la transcripción de *asnB* y *gltBDF*, para balancear el flujo glutamina-glutamato e impedir fugas hacia otras amidotransferasas como *asnB*.

Claramente es necesario llevar a cabo una gran cantidad de experimentos que permitan fortalecer o desechar esta hipótesis. Por ahora, los resultados obtenidos sugieren la existencia de un mecanismo que controla sutilmente la expresión del gen *asnB*

CONCLUSIONES

1. La cepa MX4000 lleva una mutación creada por la inserción del bacteriófago *MudX1* en *glbB*. La cepa MX4003 lleva una inserción de *Mud11734* en *asnB*.
2. La cepa MX4000 presenta fenotipo *Ntr⁻ Gxd⁻*, ambos descritos previamente para mutantes *glbB⁻*. La cepa MX4003 no tiene un fenotipo aparente.
3. El nivel de actividad de GOGAT, así como el nivel de transcripción de *asnB* y *glbB*, mostraron variaciones de acuerdo a la calidad de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo.
4. Los resultados obtenidos sugieren la existencia de un mecanismo de control transcripcional (o varios) que disminuya la transcripción de los genes *asnB* y *glbBDF* durante el crecimiento en fuentes limitantes de nitrógeno. La disminución transcripcional puede ocurrir por represión de la transcripción, o por falta de activación de la misma.

Bibliografía:

Adler, S.P., Purich, D. and E.R. Stadtman (1975) "Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase: properties of P_{II} regulatory protein and the uridylyltransferase-uridylyl-removing enzyme". J. Biol. Chem. **250**:6264-6272.

Aiba, H., Adhya, S., De Crombrughe, B (1981) "Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells". J. Biol. Chem. **256**:11905-11910.

Castilho, B. S., Olfson, P., and Casadaban, J (1984). Plasmid insertion mutagenesis and *Lac* fusion with mini-Mu bacteriophage transposons. J. Bacteriol. **15**:488-95.

Ernsting, B. R., Atkinson, M. R., Ninfa, A. J., and Matthews, R. G (1992) "Characterization of the regulon controlled by the leucine responsive regulatory protein in *Escherichia coli* . J. Bacteriol. **174**:1109-1118.

Ernsting, B. R., Denninger, J. W., Blumenthal, R. M., and Matthews (1993) "Regulation of the *gltBDF* operon of *Escherichia coli*: how is a leucine-insensitive operon regulated by the leucine-responsive regulatory protein? J. Bacteriol. **175**:7160-7169.

Bueno, R., Pahel, G. and B. Magasanik (1985) "Role of *glnB* and *glnD* gene products in regulation of *glnALG* operon of *Escherichia coli*". J. Bacteriol. **164**:816-822.

Buhk, H.J., and W. Messer (1983) "The replication origin region of *Escherichia coli*: Nucleotide sequence and functional units". Gene. **24**:265-279.

Burchal, J.J., Reichelt, E.C., and M.J. Wolin (1964) "Purification and properties of the asparagine synthetase of *Streptococcus bovis*". J. Biol. Chem. **239**:1794-1798.

Brechley, J.E., Baker, C.A., and L.G. Patil (1975) "Regulation of the ammonia assimilatory enzymes in *Salmonella typhimurium*." J. Bacteriol. **124**:182-189.

Castañó, I., Bastarrachea, F., and A. Cobarrubias (1988) "*gltBDF* operon of *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **170**: 821-827.

Castañó, I., Flores, N., Valle, F., Covarrubias A., and F. Bolívar (1992) "*gltF*, a member of the *gltBDF* operon of *Escherichia coli*, is

involved in nitrogen-regulated gene expression". *Molecular Microbiology*. 6: 2733-2741.

Cedar, H., and J.H. Schwartz (1969) "The asparagine synthetase of *Escherichia coli* II. Studies on mechanism". *J. Biol. Chem.* 244:4122-4127.

Cohen, G.N., I. Saint-Girons, and P. Truffa-Bachi (1972) "The evolution of biosynthetic pathways". *Trends Biochem. Sci.* 2:97-99.

Covarrubias, A.A., Sánchez-Pescador, R., Osorio, A., Bolivar, F., and F. Bastarrachea (1980) "*Col E1* hybrid plasmid containing *Escherichia coli* genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine". *Plasmid*.3:150-164.

de Wind, N. de Jong M. Meijer M, and A.R. Stujtje (1985) "Site-directed mutagenesis of the *Escherichia coli* chromosome near *oriC* identification and characterization of *asnC*, a regulatory element in *Escherichia coli* asparagine metabolism". *Nucleic Acid Res.* 13:8797-8811.

Felton, J., Michaelis, S. and A. Wright (1980) "Mutation in two unlinked genes are required to produce asparagine auxotrophy in *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* 142:212-220.

García, E., and S.G. Rhee (1983) "Cascade control of *Escherichia coli*. Glutamine synthetase: Purification and properties of P_{II} uridylyltransferase and uridylyl-removing enzyme". *J. Biol. Chem.* 258:2246-2253.

Hirschman, J., Wong, P.K., Sei, K., Keener, J. Kutsu (1985) "Products of nitrogen regulatory genes *ntrA* and *ntrC* of enteric bacteria activate *glnA* transcription in vitro: evidence that the *ntrA* products is a σ factor". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:7525-7529.

Humbert, R., and R.D. Simoni (1980) "Genetic and biochemical studies demonstrating a second gene coding for asparagine synthetase in *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* 142:212-220.

Igo, M.M., Ninja, A.J., Stock, J.B., and T.J. Silhavy. (1989). "Phosphorylation and dephosphorylation of a bacterial transcriptional activator by a transmembrane receptor". *Genes and Development.* 3:1725-1734.

Kölling, R., and H. Luther (1985) "*asnC*: an autogenously regulated activator of asparagine synthetase A transcription in *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* **164**: 310-315.

Kutsu, S., Hirschman, J., Burton, O., Jelesco, J., and J.C. Meeks (1984) "Covalent modification of bacterial glutamine synthetase: physiological significance". *Molecular and General Genetics.* **197**: 309-317.

Lea, P.J., and L., Fowden (1975) "The purification and properties of glutamine-dependent asparagine synthetase isolated from *Lupinus albus*". *P.R.S.L.S.B.* **192**: 13-26.

Lowry, O.H., Rosebroug, N.J., Farr, A.L., and R.J., Randall (1951) "Protein measurement with the folin phenol reagent." *J. Biol. Chem.* **193**:265-270.

Magasanik, B., Prival, M.J., Brenchley, J.E., Tyler, B.M., Oeleo, A.B., Streicher, S.L., Bender, R.A., and C.G. Paris (1974) "Glutamine synthetase as a regulator of enzyme synthesis". *Curr. Top. Cell. Regul.* **8**: 119-138.

Magasanik, B (1982) "Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria". *Annu. Rev. Genet.* **16**:135-168.

Magasanik, B., and F.C., Neidhart (1987) "Regulation of carbon and nitrogen utilization in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*." *Cellular and Molecular Biology.* American Society for Microbiology. **2**:1318-1325.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., and J. Sambrook (1982) "Molecular cloning: A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory.

Meers, J. L., Tempest, D. W., and Brown, C. M (1970) "Glutamine (amide): 2-oxoglutarateamidetransferase oxidoreductase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria". *J. Gen. Microbiol.* **64**:187-194.

Miller, J. F(1992) "A short course in bacterial genetics". Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Nakamura, M., M., Yamada, Hirota, K., Sugimoto, A., Oka., and M. Takanami (1981) "Nucleotide sequence of the *asnA* gene coding for asparagine synthetase of *Escherichia coli* K-12". *Nucleic Acid Res.* **9**:4669-4676.

Nigel, G.J., And S.M., Schuster (1992) "An alternative mechanism for the nitrogen transfer reaction in asparagine synthetase". **313**: 98-102.

Ninfa, A.J. and B. Magasanik (1986) "Covalent modification of the *glnG* product, NR_I, by the *glnL* product NR_{II}, regulates the transcriptional of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **83**:5909-5913.

Pahel, G., Zelenetz, A.D. and B.M. Tyler (1978) "*glnB* gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **133**:139-148.

Pahel, G., Dothstein, D.M., and B., Magasanik (1982) "The complex *glnA-glnL-glnG* operon of *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **150**:202-213.

Reitzer, L.J. and B. Magasanik (1983) "Isolation of the nitrogen assimilation regulator NR_I, the product of the *glnG* gene of *Escherichia coli*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **80**:5554-5558.

Reitzer, L.J. and B. Magasanik (1985) "Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters". Proc. Natl Acad. Sci. USA. **82**:1979-1983.

Reitzer, L.J., and B. Magasanik (1987) "Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*". Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology. **1**:302-317.

Scofield, M.A., Lewis W.S., and S.M. Schuter (1990) "Nucleotide sequence of *Escherichia coli asnB* and deduced amino acid sequence of asparagine synthetase" B. J. Biol. Chem. **265**. **22**:12895-12902.

Senior, P.J (1975) "Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*: studies with the continuous culture technique". J. Bacteriol. **123**:407-418.

Southern, E (1975) "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis". J. Mol. Biol. **98**:503

Stadtman, E.R (1973) En "The enzymes of glutamine metabolism". Prusiners and Stadtman, E.R.(eds). Academic Press New York. pp 1-8.

Stadtman, E.R., and A, Ginsburg (1974) "The glutamine synthetase of *Escherichia coli*: structure and control", en: Boyer, P.A.(edit). The enzyme, vol 10. Academic press. New York. pp 755-807.

Thomas, P. S (1980) "Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments trasferred to nitrocellulose". Biochemistry. **77**:5201-5205.

Tsang, S. S., Yin, X., Guzzo-Arkuran, C., Jones, V. S., and Davison, A. J (1993) "Loss of resolution in gel electroforesis of RNA: a problem associated with the presence of formaldehyde gradients". Biotechniques. **14** (3): 380-381.

Vogelstein, B., and Gillespie, D (1979) "Preparative and analytical purification of DNA from agarose". Proc. Natl. Acad. Sci., USA. **76**:615-619.

Tyler, B (1978) "Regulation of the assimilation of nitrogen compounds". Annu. Rev. Biochem. **47**:1127-1162.

Wohlheuter, R.M., Shutt, H., and H. Holzer (1973) "Regulation of glutamine synthesis in vivo in *Escherichia coli*." En prusiner, S., Stadtman, E.R. (edits). "The enzymes of glutamine metabolism". Academic Press, New York. pp 45-64.