

1/2 EJEM

Universidad Nacional Autónoma de México.

Facultad de Medicina.

Instituto de Investigaciones Biomédicas.

"Regulación de la síntesis de asparagina en *Escherichia coli*."

T E S I S

que para obtener el título de:

Licenciado en Investigación Biomédica Básica

P R E S E N T A :

Clelia Domenzain Reyna.

Director de tesis: Dra. Rosa Laura Camarena Mejía.

marzo-1999.

273252

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
APARTADO POSTAL 70228
CIUDAD UNIVERSITARIA
04510 MEXICO, D.F.

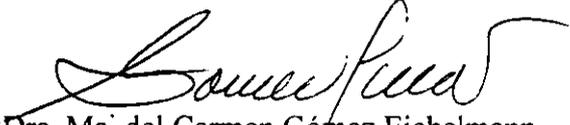
Marzo 22, 1999.

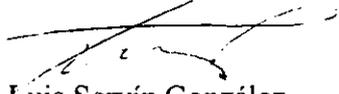
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MEXICO

DR. ALEJANDRO CRAVIOTO QUINTANA
DIRECTOR
FACULTAD DE MEDICINA
P R E S E N T E .

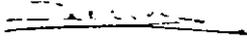
Por medio de la presente le informamos que la tesis "Caracterización del gen *asn B* de *Escherichia coli*", que presenta la alumna CLELIA DOMENZAIN REYNA con número de cta. 9135783-6, reúne ampliamente los requisitos de una tesis de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto, los suscritos miembros del Jurado damos nuestro voto aprobatorio para que la tesis sea presentada en examen oral.

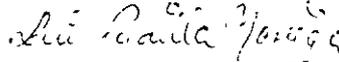
Atentamente,


Dra. Ma. del Carmen Gómez Eichelmann


Dr. Luis Servín González


Dra. Laura Camarena Mejía


Dra. Socorro Durán Vargas


Dr. Luis Padilla Noriega

**A mi mamá,
a mi papá,
a mi abuela
y a mi yaya**

Agradezco todo el apoyo brindado para la realización de esta tesis, en especial a la Dra. Laura Camerena Mejía, Qim. Aurora Osorio, Sebastian Poggio y Norma García.

Gracia a Alfonso, Luis, Mariana y Paula por el apoyo que me dieron para hacer la tesis.

Agradezco a mis sinodales. Dr. Luis Servín, Dra. Carmen Gómez, Dr. Luis Padilla y la Dra. Socorro Durán por sus consejos y ayuda para la realización de esta tesis.

Agradezco el apoyo que, para la realización de esta tesis, me brindo la
Fundación UNAM, A.C.

Resumen

En *Escherichia coli* la asparagina (Asn) es un aminoácido sintetizado a partir de amonio y aspartato por la enzima Asparagina Sintetasa A, o por Gln y aspartato (Asp) vía la Asparagina Sintetasa B. Para la síntesis de compuestos nitrogenados esenciales para su crecimiento utiliza al amonio y a otros compuestos que contienen nitrógeno. La glutamina (Gln) y el glutamato (Glt) son los aminoácidos más importantes para la síntesis de compuestos orgánicos nitrogenados. Las enzimas encargadas de sintetizar estos aminoácidos son: la GS (que sintetiza Gln), GDH y GOGAT (que sintetizan Glt).

El hecho de que tanto el amonio como la Gln sean los donadores directos para la síntesis de Asn podría decirnos que existe una relación entre la asimilación del amonio a Gln y Glt, y la síntesis de la Asn.

Determinamos los niveles de la transcripción de *asnA* de la cepa MX614 y sabemos ahora que estos son dependientes de la calidad y cantidad de la fuente de nitrógeno en la cual este creciendo la cepa. Determinamos también que la ausencia del gen *gong* (MX902) produce una des-regulación de los niveles de transcripción de *asnA*.

Obtuvimos una cepa mutante en *asnB* a la que se llamó MX4003 la cual tiene un inserto en la región codificadora del gen *asnB* (inserto que contiene al gen reportero *lacZ*). Usamos esta cepa para analizar los niveles de transcripción de *asnA*, así como para determinar las actividades específicas de las enzimas GS, GDH y GOGAT, la utilizamos también para ver los niveles de transcripción del gen *asnB* vía el gen reportero.

La cepa MX4003 mostraba crecimiento anómalo en medio mínimo, hicimos pruebas que nos dijeron que la cepa era auxótrofa para cisteína (Cys), posteriormente se realizaron curvas de crecimiento por lo cual se concluyó que la cepa presentaba un fenotipo Auto⁻ (este fenotipo nos dice que la cepa es capaz de utilizar fuentes limitantes de nitrógeno para crecer).

Determinamos que los niveles de transcripción de *asnA* tendían a compensar la falta de *asnB* en la cepa MX4003.

Se midieron las actividades enzimáticas de GS, GDH y GOGAT en distintas condiciones de crecimiento (amonio alto, bajo, Gln y Asn como fuentes de nitrógeno) que nos indican que la actividad de GS y GOGAT está des-regulada, cuando las comparamos

con la cepa silvestre (MX614) ya que se observa una disminución en su actividad en la cepa MX4003.

Se ha reportado que la ausencia de genes involucrados en la regulación del estado de oxidación de la célula producen braditrofia por compuestos como cisteína, metionina o sulfito, y que al reducir por otros medios el estado de oxidación de la célula el requerimiento por dichos compuestos desaparecía. Crecimos la cepa MX4003 en condiciones de anaerobiosis y determinamos que la aparente auxotofia por cisteína desaparecía. Medimos la actividad de β -galactosidasa de la cepa MX4003 en estas condiciones y determinamos que en condiciones anaeróbicas la transcripción de *asnB* disminuía 10 veces por lo que decimos que la transcripción de *asnB* esta regulada por la disponibilidad de oxígeno en el medio. Determinamos en estas mismas condiciones la actividad específica de GS en las cepas Mx614 y MX4003 y vimos una disminución en su actividad muy parecida a la que se observa en la cepa MX4003 en condiciones aeróbicas.

Indice:

INTRODUCCION

BIOSÍNTESIS DE ASPARAGINA

Regulación de la actividad

SISTEMA DE ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO

Glutamino Sintetasa

Glutamato Deshidrogenasa

Glutamato Sintasa

OBJETIVO GENERAL

OBJETIVOS PARTICULARES

MATERIAL Y METODOS

Cepas Bacterianas

Medios de Cultivo

Condiciones de cultivo

Obtención de ADN cromosomal bacteriano

Hibridación ADN-ADN (Southern Blot)

El gel

Para desnaturalizar el ADN del gel

Transferencia del ADN por presión

Prehibridación de la membrana

Marcaje de la sonda por Bio Prime Label System

Hibridación de la membrana

Lavado y Revelado de la membrana

Obtención de la sonda de *asnB*

Determinación de la actividad de la actividad de la enzima b- galactosidasa

Determinación de la actividad enzimática de Glutamino Sintetasa

Determinación de la actividad enzimática de Glutamato Sintasa

Determinación de la actividad enzimática de Glutamato Deshidrogenasa

Determinación de la cantidad de proteínas por el método de Lowry

Purificación de ARN total

Hibridación ARN-ADN (Northern Blot)

El gel

Las muestras

rehibridación de la membrana

Marcaje de la sonda por Random Primer

Hibridación de la membrana

Lavado y revelado de la membrana

Diagnostico para la Auxotrofia

Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Obtención de sonda *asnA*

RESULTADOS

Análisis tipo Northern Blot para la determinación del nivel de la transcripción del gen *asnA* en las cepas MX614 y MX902

Análisis tipo Northern Blot para la determinación del nivel de la transcripción del gen *asnB* de la cepa silvestre MX614

Análisis tipo Southern Blot de las cepas MX614 y MX4003

Determinación de auxotrofia de la cepa MX4003 y fenotipo Aut de la misma

Análisis de la transcripción del gen *asnA* de la cepa MX4003 por medio de un ensayo de hibridación ARN-ADN tipo Northern Blot

Determinación de la actividad de β -galactosidasa de la cepa MX4003

Determinación de las actividades específicas de las enzimas GS, GDH y GOGAT de las cepas MX4003 y MX614

Determinación de la síntesis de β -galactosidasa en la cepa MX4003 en anaerobiosis

Actividad específica de la enzima GS en las cepas MX4003 y MX614 en anaerobiosis

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

INTRODUCCIÓN

La síntesis de aminoácidos es de vital importancia para cualquier organismo. Aunque en ciertas condiciones los requerimientos y nutrientes se encuentran al alcance de la mano y en suficiente cantidad, otras veces no es así, por lo que es necesario sintetizarlos.

La asparagina es un aminoácido que es sintetizado gracias a la acción de dos enzimas: la asparagino sintetasa dependiente de amonio y la asparagino sintetasa dependiente de glutamina. La primera de ellas se ha descrito en procariontes como *Escherichia coli* y *Klebsiella aerogenes*, esta cataliza la síntesis asparagina a partir de aspartato y amonio. Por otra parte, la asparagino sintetasa dependiente de glutamina ha sido encontrada tanto en procariontes como en eucariontes, esta cataliza preferentemente la síntesis de asparagina utilizando glutamina y aspartato; ambas enzimas realizan estas reacciones mediante la hidrólisis de adenosín trifosfato (ATP).

Sabemos que para la síntesis de asparagina se requiere de glutamina y amonio, que son componentes importantes dentro del sistema de asimilación de nitrógeno; por lo que no sería raro encontrar una relación entre el sistema de asimilación de nitrógeno y la biosíntesis de asparagina. Existen algunos datos en *K. aerogenes* que nos sugieren que esta relación probablemente exista.

A continuación se describe más ampliamente el proceso, tanto de la síntesis de asparagina como del sistema de asimilación de nitrógeno, que nos ayudarán a comprender mejor el presente trabajo.

1. BIOSINTESIS DE ASPARAGINA:

En procariontes tales como *Escherichia coli* y *Klebsiella aerogenes* se sabe de la existencia de dos asparagino sintetetasas (Cedar, et al, 1969; Felton, et. al., 1980; Humbert, et. al., 1980; Reitzer, et. al., 1982) que catalizan las dos reacciones de síntesis de asparagina (Asn). Ambas reacciones son esquematizadas a continuación.



En *K. aerogenes* la enzima AsnA (asparagino sintetetasa-dependiente de amonio) es un dímero de subunidades iguales de 38-kDa. La AsnB (asparagino sintetetasa-dependiente de glutamina) es un tetrámero de subunidades iguales que pesan 57-kDa cada una. Estas enzimas son codificadas por dos genes, *asnA* y *asnB* respectivamente (Reitzer, et. al., 1982). El primero de estos genes se encuentra en el minuto 84 del cromosoma de *E. coli* y el segundo en el minuto 16 (Felton, et. al., 1980). Ambos se encuentran en lugares equivalentes del cromosoma de *K. aerogenes* (Reitzer, et. al., 1982).

Para obtener auxotrofia por asparagina se requiere de mutaciones tanto en *asnA* como en *asnB*, mientras que cepas con genotipo *asnA*⁺ *asnB*⁻ o *asnA*⁻

asnB⁺ no parecen tener ningún problema para crecer en medio sin asparagina (Reitzer, et. al., 1982).

Regulación de la actividad:

Se tiene conocimiento de la existencia de un tercer gen involucrado en la biosíntesis de asparagina: el gen *asnC*. Este gen se encuentra cerca de *oriC*, adyacente a *asnA*, y se transcribe en sentido divergente a este último. El producto del gen *asnC* (AsnC) tiene la capacidad de unirse al ADN, y tiene un peso aproximado de 17-kDa (Kölling, et al, 1985). AsnC activa la transcripción de *asnA*. AsnC controla la expresión de su propio gen, es decir AsnC reprime a *asnC* y la asparagina parece no intervenir en dicha regulación. La acción de AsnC sobre *asnA* y *asnC* se da, mediante la unión de AsnC a la región promotora de ambos genes (Kölling, et al, 1985).

En las cepas silvestres de *K. aerogenes* los niveles de las dos asparagino sintetasas, dependen directamente de la fuente de nitrógeno en la que estén creciendo las células. La actividad de la enzima AsnA se encuentra elevada cuando la cepa crece en condiciones de exceso de amonio, no así cuando ésta crece en condiciones de limitación de amonio. La AsnB esta sujeta a una regulación exactamente inversa. La actividad de ambas enzimas es fuertemente inhibida por la adición de asparagina al medio de cultivo (0.01%) (Reitzer, et al 1982); sin embargo, otro reporte indica que en *E. coli* la asparagina (0.1%) no tiene un efecto considerable sobre estas enzimas (Humbert, et al, 1980).

En cepas *asnB⁻* de *K. aerogenes*, los niveles de AsnA en condiciones de crecimiento son: en exceso de amonio (>1mM), similares a los que se encontraron en la cepa silvestre, en presencia de glutamina aumenta la actividad más de diez veces y se mantiene la represión por asparagina. Esta cepa es incapaz de crecer en medio con glucosa y fuentes limitantes de nitrógeno como prolina, aspartato, arginina o glutamato (Reitzer, et al 1982); lo cual sugiere que la enzima dependiente de glutamina actúa durante el crecimiento en situaciones de limitación de nitrógeno.

En las cepas *asnA⁻* de *K. aerogenes* el crecimiento es normal en: exceso de amonio, glutamina y asparagina, como fuentes de nitrógeno en las condiciones de cultivo. La falta de este gen produce que, en exceso de amonio, los niveles de AsnB se eleven cuatro veces en comparación con los de la cepa silvestre, probablemente para compensar la ausencia de la enzima AsnA (Reitzer, et. al 1982).

El crecimiento en un medio con fuentes limitantes de nitrógeno implica la elevación de los niveles de la transcripción y actividad de NR_I, producto del gen *glnG*. Esta proteína, junto con la cinasa NR_{II}, son las proteínas encargadas de modular la respuesta global a limitación de nitrógeno. Cepas de *E. coli* y *K. aerogenes glnG⁻* son incapaces de regular los niveles de una gran cantidad de genes y operones involucrados con la asimilación y metabolismo de algunos compuestos nitrogenados. Por lo tanto, las cepas *glnG⁻* son incapaces de crecer en fuentes limitantes de nitrógeno como prolina, arginina, etc. (fenotipo Ntr⁻), y además presentan niveles bajos constitutivos de la enzima glutamino sintetasa (GS) (Magasanik, 1982).

En cepas de *K. aerogenes glnG*, no se observa ningún efecto sobre la actividad de AsnB (Reitzer, et. al 1982). La actividad de AsnA en las mutantes *glnG* fue distinta. Cuando el nitrógeno en el medio representa un factor limitante para el crecimiento, esta mutación provoca un aumento dramático en AsnA; no así, cuando el nitrógeno en el medio es abundante (amonio) (Reitzer, et. al 1982). Por esto se podría pensar que *glnG* tiene un papel importante en la regulación de *asnA*, pero el análisis de la secuencia nucleotídica del gen y del promotor de *asnA* de *E. coli* no muestra secuencia alguna para la unión de NR_I.

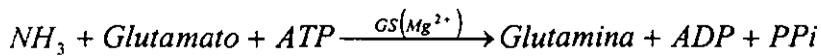
Podría pensarse que NR_I actúa sobre *asnC* para que esta a su vez regule a *asnA*, pero esto no se ha podido comprobar ya que tampoco se han encontrado secuencias de unión para esta proteína en el promotor de *asnC*. Por lo tanto, el efecto que vemos podría estar dado de forma indirecta por medio de algún mecanismo aún no descrito.

2. SISTEMA DE ASIMILACION DE NITRÓGENO:

Se sabe que las bacterias entéricas como *E. coli* tienen un crecimiento ideal en amonio como fuente única de nitrógeno, y glucosa como única fuente de carbono; sin embargo, son capaces de utilizar una gran variedad de compuestos cuando no están en las condiciones óptimas.

Los intermediarios celulares, relevantes para la biosíntesis de algunos compuestos nitrogenados, son: la glutamina, de la cual se obtiene el 15% del nitrógeno utilizado en la célula, y el glutamato, del cual se obtiene el 85%

restante. Estos aminoácidos son sintetizados por tres enzimas la glutamino sintetasa (GS), la glutamato deshidrogenasa (GDH) y la glutamato sintasa (GOGAT) que catalizan las siguientes reacciones:



Cada una de estas enzimas actúa en distintas condiciones de crecimiento. Cuando las células crecen en condiciones de exceso de amonio (>1mM) sintetizan glutamato vía GDH, y una porción de este glutamato es convertida a glutamina vía GS, pero esta última enzima no se encuentra muy activa en estas condiciones debido a su afinidad por el amonio.

Cuando las células crecen en condiciones de limitación de nitrógeno, obtenido de la degradación de compuestos orgánicos, o directamente de amonio a bajas concentraciones (0.1mM), la asimilación del mismo ocurre gracias a la acción de la GS, la cual convierte el glutamato y el amonio en glutamina y la síntesis de glutamato es mediada por GOGAT.

La existencia de dos vías para la síntesis de glutamato, asegura la disponibilidad del mismo dentro de la célula, ya que GDH y GOGAT son reguladas diferencialmente por factores como: la concentración de carbono, la

disponibilidad de nitrógeno y los niveles de fosfato en el medio (Helling, 1994).

Glutamino Sintetasa:

La GS es la enzima responsable de la síntesis de glutamina, utilizando como sustrato amonio y glutamato con la concomitante hidrólisis de ATP. En *E. coli* esta proteína está codificada por el gen *glnA*, el cual forma parte del operón *glnALG*. Este operón codifica tanto para la enzima GS así como para sus dos reguladores que son NR_{II} (*glnL*) y NR_I (*glnG*), estas proteínas son responsables de la regulación del operón *glnALG* y otros operones que responden a la disponibilidad de nitrógeno en el medio (Reitzer, 1998).

La transcripción de este operón puede ser iniciada desde tres promotores: *glnAp1*, *glnAp2*, los cuales se encuentran en ese orden en la región 5' no codificadora del operón, y *glnLp*, que se encuentra localizado entre *glnA* y *glnL*; el uso diferencial de cada uno de estos promotores depende de las condiciones de crecimiento (Magasanik, 1993).

Cuando las células crecen en condiciones de exceso de amonio la transcripción de *glnA* procede desde el promotor *glnAp1*. *glnLp* transcribe los genes *glnL* y *glnG* en un nivel basal (Reitzer, et. al., 1985).

En condiciones de limitación de nitrógeno, la concentración de NR_I -P (forma en la que es activa esta proteína) aumenta dentro de la célula, ocasionando la activación del inicio de la transcripción a partir del promotor *glnAp2*, transcribiéndose los tres genes del operón al parecer

aproximadamente diez veces más que en condiciones de exceso de amonio (Reitzer, et. al., 1985). Se ha comprobado que la activación de la transcripción del gen *glnA* requiere forzosamente de NR_I y de NR_{II} (Ninfa, et. al., 1986).

NR_{II} es la responsable de fosforilar a NR_I, (NR_I-P) la cual a su vez interactúa con la ARN-polimerasa asociada con el inductor σ^{54} ($E\sigma^{54}$) formando el complejo abierto para el inicio de la transcripción desde el promotor *glnAp2*. NR_I es un activador de la transcripción de los promotores dependientes de, y NR_{II} es la proteína que puede fosforilar o desfosforilar a NR_I dependiendo de las condiciones de crecimiento de la bacteria (Reitzer, et. al. 1998).

La activación de la transcripción desde *glnAp2* resulta en una acumulación rápida de la enzima GS y de NR_I. El incremento de NR_I-P propicia que pueda actuar sobre otros operones y genes (relacionados con la respuesta Ntr) los cuales, como este, dependen de la ARN polimerasa- σ^{54} para el inicio de su transcripción. Estos sitios de unión a NR_I no tienen la misma afinidad por NR_I-P que tiene el promotor *glnAp2* del operón *glnALG*, por lo que el efecto inmediato para las células bajo privación de nitrógeno es la activación del operón *glnALG*; lo que resulta en un sistema de regulación muy fino en cuanto a la activación de otros genes que tienen que ver con la respuesta a la limitación de nitrógeno (Magasanik, 1998).

En *Klebsiella aerogenes*, NR_I-P activa la transcripción del operón *nifLA*; el cual codifica para proteínas involucradas en la producción de las

enzimas necesarias para la fijación de nitrógeno, y también del gen que codifica para la proteína Nac, el cual se encarga de transcribir a los genes que siendo parte de la respuesta mediada por nitrógeno son transcritos por (la ARN-polimerasa asociada al factor σ^{70} ($E\sigma^{70}$) (Bender, 1991).

Otras de las proteínas que se encuentran relacionadas con la síntesis de la GS son: P_{II} (*glnB*), la uridil transferasa/eliminador de uridilo, UTasa/UR (*glnD*) y adeniltransferasa, ATasa (*glnE*). Su función varía de acuerdo a las concentraciones de la fuente de nitrógeno de la siguiente manera.

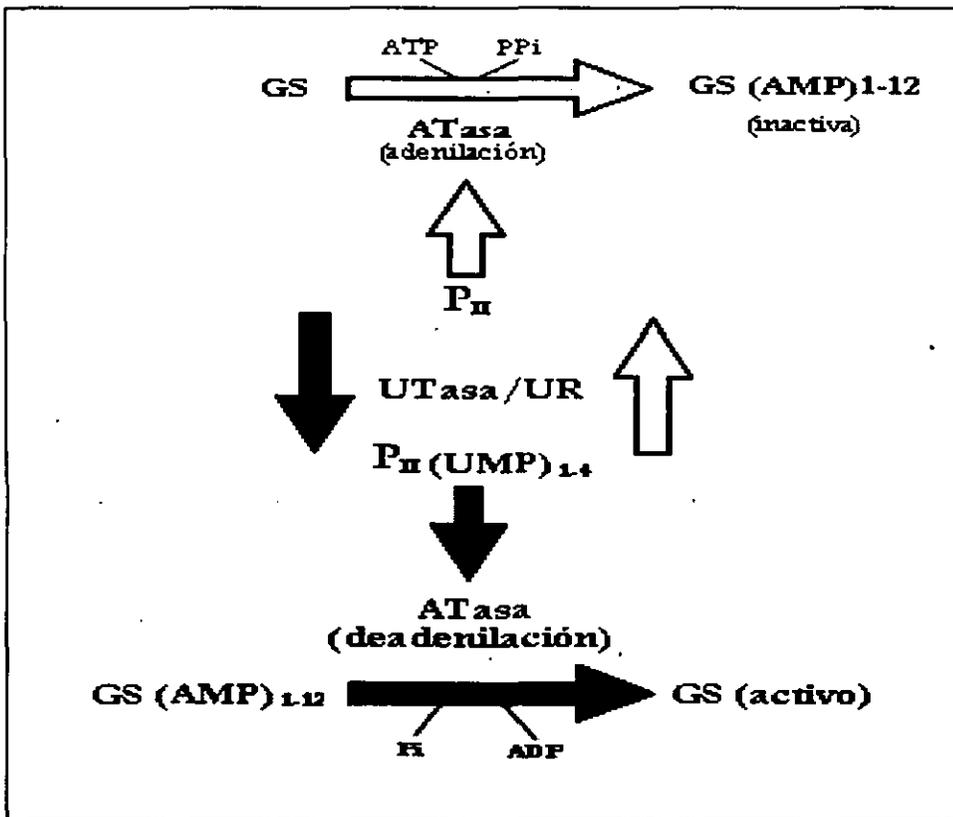


Figura 1. Ciclo de adenilación de la enzima GS. Las flechas blancas describen los eventos que llevan a la adenilación de la GS. Las flechas negras ilustran los eventos que llevan a la remoción de los grupos adenilos de la enzima GS (Reitzer, 1998).

En condiciones de limitación de nitrógeno, la GS es activada por la desadenilación de sus subunidades. La proteína ATasa adenila o desadenila a la GS para regular su acción. PII es uridilada por la UT (PII-UMP) y así puede actuar sobre la ATasa activándola para que desadenile a la GS. Cuando las condiciones de crecimiento son de abundancia en nitrógeno, la UTasa mediante su actividad UR desuridila a PII-UMP. PII actúa sobre ATasa provocando la adenilación de la GS lo que la inactiva (Figura 1) (Reitzer, et. al, 1998).

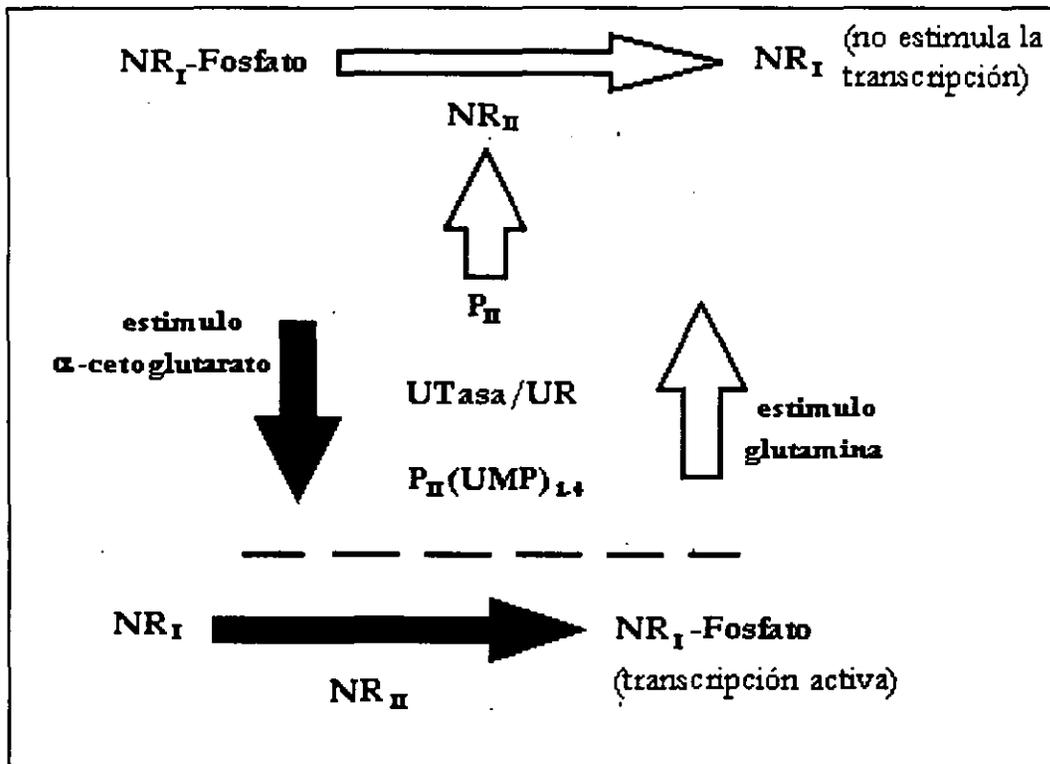


Figura 2. Control transcripcional de *glnA* por disponibilidad de nitrógeno. (Reitzer, 1998).

Esta cadena de reacciones está relacionada con la actividad de las proteínas NR_I y NR_{II} mencionadas anteriormente. En condiciones de exceso de nitrógeno, se estimula la actividad de UR, lo cual favorece la desuridilación

de PII-UMP, consecuentemente PII interactúa con NR_{II} impidiendo que esta última fosforile a NR_I y además, promueve la desfosforilación de NR_I -P. Cuando las condiciones de nitrógeno son limitantes, se activa la UTasa que promueve la uridilación de PII con lo que se impide que PII interactúe con NR_{II} y por lo tanto permite la fosforilación de NR_I activándose así, la transcripción del operón *glnALG* (Figura 2) (Magasanik, 1993; Reitzer, 1998).

Glutamato Deshidrogenasa:

La enzima GDH sintetiza glutamato a partir de amonio y α -cetoglutarato. Esta enzima es codificada por el gen *gdhA*. La enzima GDH de *E. coli* se encuentra activa en condiciones de crecimiento con exceso amonio y glucosa, y es reprimida por glutamato y aspartato. La represión por glutamato se da cuando este es utilizado como única fuente de nitrógeno (Magasanik, 1998; Reitzer, 1998). La limitación de nitrógeno reprime a esta enzima en *K. aerogenes* y esta represión es mediada por Nac (activador de nitrógeno) (Macaluso, et. al., 1990).

Glutamato Sintasa:

GOGAT también sintetiza glutamato pero a partir de amonio y glutamina. Esta constituida por dos dímeros de subunidades distintas. La subunidad grande es una proteína de aproximadamente 135-kDa y esta codificada por *gltB*, la subunidad pequeña tiene un peso aproximado de 53-kDa y esta codificada por el gen *gltD*, estos dos genes forman parte del

operón *gltBDF* ; *gltF* codifica para un regulador que aparentemente esta involucrado en la respuesta Ntr (Castaño, et. al., 1988; Castaño, et. al., 1992).

La síntesis de GOGAT se ve reprimida en condiciones de crecimiento limitantes de nitrógeno, y al utilizar como fuente de nitrógeno aminoácidos cuya degradación genera rápidamente glutamato. La represión de GOGAT cuando hay glutamato en el medio requiere de la inducción de la respuesta Ntr, la cual, es necesaria para el transporte eficiente y el subsecuente catabolismo de estos aminoácidos. El producto de *gltF* parece participar en la represión de GOGAT dependiente de glutamato, ya que las mutantes que no tienen este gen tienen tres veces más actividad de GOGAT en condiciones de crecimiento con glutamato, en comparación con la cepa silvestre (Castaño, et. al., 1992).

La limitación de carbono reprime moderadamente la síntesis de GOGAT, esto parece ser mediado por la proteína CRP ya que en el promotor del operón *gltBDF* de *E. coli* se encuentra un sitio de unión para esta proteína (Reitzer, 1998). Este patrón de regulación puede servir para que GOGAT no se acabe el α -cetoglutarato del ciclo de Krebs, cuando las condiciones de carbono o energía son limitantes.

Por otra parte, la respuesta estricta, que es una respuesta fisiológica generada cuando las bacterias son ayunadas de algún aminoácido (o son incapaces de aminoacilar los ARNt cuando el requerimiento de síntesis de proteínas se mantiene alto), parece controlar entre otras cosas la síntesis de GOGAT: esto se vio cuando al mutar el gen de la glutamil-ARNt sintetasa veían que los niveles de GOGAT disminuían. Por lo tanto, se ha considerado

que la actividad de la enzima GOGAT se encuentra bajo control de la respuesta estricta, así como por las fuentes de carbono. El control del consumo de carbono versus la asimilación de nitrógeno, en condiciones en las que ambos sistemas son requeridos, limitación tanto de nitrógeno como de carbono, logra la mejor forma de sobrevivencia para las bacterias (Reitzer, 1998).

La enzima GOGAT de *E. coli* se reprime durante el crecimiento en aminoácidos generadores de glutamato como única fuente de nitrógeno. Pero también es requerida para el crecimiento de limitación de nitrógeno. A pesar de que GOGAT es reprimida en las cepas silvestres, las mutantes deficientes de esta enzima no pueden utilizar arginina como única fuente de nitrógeno (fenotipo *Aut⁻*). Esta aparente contradicción se explica si GOGAT fuera sólo necesaria para la inducción pero no para el sostén de la respuesta Ntr. Esta conclusión es apoyada por que cepas mutantes constitutivas de Ntr y deficientes de GOGAT sí pueden utilizar arginina y otros aminoácidos productores de glutamato (Reitzer, et. al., 1998).

Las cepas deficientes en GOGAT presentan fenotipo *Ntr⁻*. Se piensa que *gltF* y no GOGAT es lo que se requiere para la respuesta Ntr. La sobreexpresión de *gltD* y *gltF* suprimen dos aspectos de este fenotipo: la incapacidad de utilizar arginina como fuente de nitrógeno y la incapacidad de inducir la síntesis de histidasa. La secuencia de aminoácidos sugiere que *gltF* es una proteína cinasa transmembranal, por lo que se propone que *GltF* fosforila a NR_I o a NR_{II} y que esta fosforilación es esencial para la inducción de la respuesta Ntr (Castaño, et. al., 1992). Sin embargo, dado que la presencia de *gltD* es estrictamente necesaria para suprimir el fenotipo *Ntr⁻*, se contempla

la posibilidad de que GltD podría estar involucrado en la inducción de la respuesta Ntr por su capacidad de unir α -cetoglutarato, censando así la concentración de este metabolito.

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar la regulación de la síntesis de asparagina de *Escherichia coli*, en diferentes condiciones de cultivo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar los niveles de la transcripción del gen *asnA* en la cepa silvestre en distintas condiciones de nitrógeno en el medio, midiendo los niveles de mRNA.
- Caracterizar los niveles de transcripción del gen *asnA* en la cepa MX902 (*glnG*).
- Caracterizar los niveles de transcripción del gen *asnB*, en la cepa silvestre y en la cepa MX4003 en distintas condiciones de nitrógeno en el medio, midiendo los niveles de mRNA así como la expresión del gen por medio de un gen reportero (*lacZ*).
- Caracterizar el comportamiento de las principales enzimas involucradas en el metabolismo de asimilación del nitrógeno, como son GS, GDH y GOGAT, en la cepa silvestre (MX614) y la cepa mutante MX4003 (*asnB::MudI*), en distintas condiciones de nitrógeno en el medio.

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar la regulación de la síntesis de asparagina de *Escherichia coli*, en diferentes condiciones de cultivo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar los niveles de la transcripción del gen *asnA* en la cepa silvestre en distintas condiciones de nitrógeno en el medio, midiendo los niveles de mARN.
- Caracterizar los niveles de transcripción del gen *asnA* en la cepa MX902 (*glnG*).
- Caracterizar los niveles de transcripción del gen *asnB*, en la cepa silvestre y en la cepa MX4003 en distintas condiciones de nitrógeno en el medio, midiendo los niveles de mARN así como la expresión del gen por medio de un gen reportero (*lacZ*).
- Caracterizar el comportamiento de las principales enzimas involucradas en el metabolismo de asimilación del nitrógeno, como son GS, GDH y GOGAT, en la cepa silvestre (MX614) y la cepa mutante MX4003 (*asnB::MudI*), en distintas condiciones de nitrógeno en el medio.

MATERIAL Y METODOS

- **CEPAS BACTERIANAS:**

MX614: F⁻, $\Delta(lac-pro)$, *galE ilv-680*, *thi-1* derivada de *Escherichia coli* K-12 (Osorio, *et al.*, 1984).

MX4003: *asnB::MudI1734* derivada de MX614.

MX902: *glnG74::Tn5*, Kan^R derivada de la MX614 (Osorio, *et al.*, 1984).

JF448: F⁺, *asnB32*, *asnA31*, *spoT1*, *bglR13*, *rbs-4*, *thi-1*, *relA1*, *l-*, derivada de *E. coli* K-12 (Felton, *et al.*, 1980)

CAG12077: MG1655 *zbe-280::Tn10* (15.75') (Mitchel, *et al.*, 1989).

- **MEDIOS DE CULTIVO:**

Medio Luria:

Contiene 1% de Bacto triptona, 1% de cloruro de sodio (NaCl) y 0.5% de extracto de levadura. En el caso de prepararse medio sólido se agregan 1.5% de Agar. Se esteriliza por autoclave y se guarda a 4°C.

Medio Mínimo (NN1X):

Para un litro de NN1X se agregan 13.6g de fosfato monobásico de potasio, 2.62g de sulfato de potasio, 0.2g de sulfato de magnesio, 0.01g de cloruro de calcio y .05mg de sulfato ferroso, se ajusta todo a pH 7.4 con hidróxido de potasio (aproximadamente 4.5g). Se esteriliza por autoclave y se guarda a temperatura ambiente.

El medio mínimo se adiciona con:

Requerimientos	Concentración de la Solución madre	Concentración final	Observaciones
Generales			
Cisteína	0.36%	14.85µM	A esta solución se le debe Agregar NaOH hasta llegar a pH 14 Esterilizar por filtración.
Citrato de Sodio ¹	2M	0.04M	
Glucosa	20%	0.2%	
Isoleucina-Valina	1%	0.01%	Se pone 0.5% de cada uno.
Molibdato de Sodio ²	35µM	0.035%	
Prolina	2%	200µg/ml	
Tiamina	0.1%	20µg/ml	

Fuente de Nitrógeno (se pone sólo una de las fuentes)

Arginina	10%	5.74mM	
Asparagina	2%	1.9mM	
Glutamina	2%	6.8mM	Esterilizar por filtración.
NH ₄ Cl (exceso)	8%	15mM	
NH ₄ Cl (limitación)	0.67%	0.5mM	

Antibiótico

Kanamicina	0.5%	50mg/ml	Esterilizar por filtración.
Tetraciclina	0.25%	25mg/ml	Esterilizar por filtración.

1 y 2 Se utilizan sólo en condiciones de crecimiento anaeróbico.

NOTA: Todo lo que no se esteriliza por filtración se esteriliza por autoclave a 120°C, 15lb por 20min.

• **CONDICIONES DE CULTIVO:**

Se mantienen las células por tiempos de tres a cuatro semanas en tubos con medio Luria sólido inclinado a 4°C, se les agrega antibiótico en caso de que sea necesario.

Para los ensayos con las células se crecen primero cultivos de 3-5ml durante toda la noche a 37°C en agitación constante de 200 revoluciones por minuto (rpm). Posteriormente se inoculan con 1ml de este cultivo matraces con 10ml de medio. Se dejan crecer en las mismas condiciones hasta la densidad requerida.

Para el crecimiento en condiciones de anaerobiosis se llenan los tubos hasta el tope tratando de que quede el menor aire posible, se dejan sin agitación a 37°C hasta la densidad óptica requerida, según el experimento que se vaya a realizar.

• **OBTENCIÓN DE ADN CROMOSOMAL BACTERIANO:**

Se crecen las células en 5ml de medio Luria durante toda la noche. Se centrifugan a 5000rpm durante 5min para después resuspender en:

- 567µl TE
- 30µl SDS 10%
- 12µl Proteinasa K (20mg/ml)

Se mezcla bien (sin vórtex) y se deja incubando de 1-2hrs a 37°C. Al término de la incubación se añaden:

- 100µl NaCl
- 80µl CTAB/NaCl

Se mezcla bien, invirtiendo el tubo eppendorff varias veces pero con cuidado para que no se vaya a romper el ADN, y se deja por 15-20min a 65°C.

Después de la incubación se agrega un volumen de cloroformo:isoamílico, 24:1 (v/v) y se centrifuga a 14000rpm por 15min.

Se toma y se pasa la fase acuosa, a otro tubo eppendorff. Se añade un volumen de cloroformo:fenol:isoamílico, 25:24:1, (v/v/v) y se mezcla por inversión para después centrifugar a 14000rpm durante 10min. De nueva cuenta se toma y se pasa la fase acuosa a otro tubo donde se le agregan 0.6 volúmenes de isopropanol. Se agita suavemente hasta que se logre ver una hebra.

Se toma la hebra con una pipeta pasteur y se lava en 500µl de etanol al 70%. Se deja secar sobre la mesa. Una vez seco se resuspende en 20µl de H₂O estéril.

Una vez que se encuentra bien resuspendido se cuantifica. Se hace una dilución de la muestra, en agua, y se lee en un espectrofotómetro a 260 y 280nm de longitud de onda en luz UV. La relación de las lecturas 260/280 debe dar un número entre 1.7 y 1.9 para considerar que la muestra esta limpia. Para saber la concentración de ADN en nuestra muestra tomamos que: una lectura de uno de D.O. a 260nm es igual a 50µg/ml de ADN.

- **HIBRIDACIÓN ADN-ADN (Southern Blot)**

1. **El gel:**

Primero se corre un gel de agarosa al 1% con un marcador de peso molecular y las muestras de ADN que se vayan a analizar, digeridas, a 80V. Se pone aproximadamente la misma concentración de ADN en cada pozo (excepto del marcador que se pone sólo 1µl del Stock), se diluyen en el Buffer de carga* y se ponen aproximadamente 10µl por pozo. Una vez que el gel corre se tiñe en una solución de Bromuro de Etidio por 15min y se ve en el transiluminador de luz UV.

***Buffer de carga 10X (colorante)**

Compuesto	para 10ml
Glicerol	5ml
Azul de Bromofenol	0.005g
Acetato de Sodio	41mg
EDTA	37.2mg
Tris base	0.484g
Ácido acético	183.3 μ l

2. Para desnaturalizar el ADN en el gel:

Se coloca el gel en 5 volúmenes de una solución de HCl al 0.25M con agitación suave (no más de 15min), hasta que el colorante se vea amarillo. Enseguida se pone el gel en 5 volúmenes de: NaCl al 1.5M y NaOH al 0.5M en agitación suave por 20min, se repite el paso anterior y después se pone en 5 volúmenes de Tris(pH7.5) 1M con NaCl al 1.5M: esta acción se repetirá hasta que el gel tenga un pH < 8.5. Todo el proceso se realiza a temperatura ambiente.

3. Transferencia del ADN por presión:

Se cortan los carriles del gel y se mide. Se corta la membrana del tamaño del gel se transfiere por presión con el buffer de transferencia (SSC20X) y se coloca en la cámara de transferencia (Presiblot):

1. Papel Wathman grande
2. Membrana (Hybond-N, Amersham.)
3. Mascara
4. Gel
5. Papel Wathman chico
6. Esponja

Se cierra perfectamente la cámara de transferencia y se deja a 70psi por 1:30hrs. Una vez que se transfirió el ADN se fija este a la membrana con luz UV (0.1-0.6J/cm²).

4. Prehibridación de la membrana:

Para hacer todo el procedimiento en los tubos del horno de hibridación se debe cortar un pedazo de mesh (tela muy porosa) más grande que la membrana. Los volúmenes que se utilizan son siempre los mismos no importando el tamaño de la membrana que se va a hibridar (en los tubos grandes se ponen 20ml y en los tubos chicos 10ml para la prehibridación y la hibridación). Se precalienta la solución de prehibridar, se mojan tanto el mesh como la membrana con esta misma solución y se enrollan poniendo la membrana sobre el mesh. Se pone en el tubo la solución de prehibridar y se deja calentando por una hora. La solución de prehibridar tiene:

Compuesto	[concentración final]	para 100ml
Formamida 100%	50%(v/v)	50ml
SSPE 20X	6X	30ml
Denhardt's 50X	5X	10ml
SDS10% (p/v)	1%	5ml

Se ponen el mesh y la membrana enrollados en el tubo y se desenrollan de modo que queden pegados a la pared del mismo.

A la solución de prehibridación se le pone ADN de timo 10mg/ml (la cantidad de ADN de timo que se pone en la solución se obtiene de la siguiente forma: $Y\mu\text{l} = 20 (0.25A)$, donde Y es el stock de ADN de timo y A el área de la membrana en cm, este se hierve por separado por 10min y se pone inmediatamente en hielo por 5min para después vaciarse en la solución de prehibridar.

Una vez que ya esta todo en el tubo se deja a 42°C con agitación moderada de 4 a 6hrs.

4a. **Marcaje de la sonda por Bio Prime Label System (Gibco-BRL):**

Se ponen en un tubo eppendorff:

- 20µl ADN (>25ng en 5-20µl)
- 20µl Random Primers 2.5X

Se desnaturaliza hirviendo por 5min y se pone en hielo inmediatamente, posteriormente se agregan

- 5µl dNTP's 10x (contiene biotina-14-dCTP)
- 2µl H₂O

Todo debe quedar en un volumen final de 49µl, se mezcla perfectamente, se centrifuga 15seg y se le agrega

- 1µl ADNpolimerasa I (fragmento Klenow)

Se incuba a 37°C por 1hr. Una vez transcurrido este tiempo se le agregan, primero 5µl de Buffer de Paro y después 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M, 2 volúmenes de etanol absoluto.

Se congela a -70°C o en hielo seco por 15min, se centrifuga 10min a 14000rpm se decanta y se resuspende en agua.

5. **Hibridación de la membrana:**

Se agrega al mismo tubo la sonda marcada*^{4a}, la cual se desnaturalizó previamente hirviéndola por 5min para después ponerla en hielo por otros 5min, y dejarla toda la noche a 42°C en agitación moderada.

6. Lavado y Revelado de la membrana:

Se lava la membrana con agitación fuerte dos veces con SSC 5X, SDS 0.5% a 65°C por 5min (todos los lavados se realizan con 20ml de la solución que se vaya a emplear para el tubo pequeño y 40ml para el tubo grande). Se lava por tercera ocasión con SSC 0.1X, SDS 1% durante 30min a 50°C. Finalmente se realiza un lavado con SSC 2X por 5min a temperatura ambiente.

Para la unión del conjugado estreptoavidina-fosfatasa alcalina (SA-AP). Se vacía el tubo perfectamente y se enjuaga con un poco de TBS-Tween, Se añade la solución bloqueadora (TBS-Tween, BSA3%) previamente calentada a 65°C (10-20ml) y se deja incubando por 1hr en agitación moderada, es importante que la temperatura no suba a más de 66°C para evitar que flocule la albumina.

Paralelamente a esto se centrifuga el SA-AP a 4°C , 14000rpm por 30min. Se toman 7ml por cada cm^2 de la membrana y se disuelven en TBS-Tween 1:100 (v/v) (10-20ml).

Terminada la incubación con la solución bloqueadora se le quita perfectamente ésta a la membrana y se le agrega el SA-AP, TBS-Tween y se deja en agitación moderada por 10min a temperatura ambiente. Posteriormente se lava con un exceso de TBS-Tween (20-40ml) primero por 15min y después por una hora a temperatura ambiente.

Para terminar se lava con buffer de lavado final 1X (Tris base 100mM, NaCl 100mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 50mM, pH9.5) a temperatura ambiente por una hora.

Se saca la membrana del tubo y sin dejar que se seque, se pone en un fólter de plástico donde se ponen 0.01ml/cm²(de la membrana) del reactivo de detección a un costado del fólter. Se expande todo el liquido de forma que no queden burbujas y que se moje toda la membrana con el mismo (no se debe de tallar encima de la membrana). Se sellan las esquinas del fólter y se deja a 37°C por 30min. Se expone a una placa de rayos X, primero por 15min y se revela: si no se viera nada o si se ve sobreexpuesta la placa, se puede volver a exponer por el tiempo que se crea conveniente.

• **OBTENCIÓN DE LA SONDA DE *asnB*:**

Esta se obtuvo por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de ADN cromosomal de la cepa MX614, utilizando un par de oligonucleótidos específicos que se diseñaron sobre la base de la secuencia reportada por Scofield y colaboradores (1990). Los oligonucleótidos diseñados fueron:

1C . 5' GGCGCGTTGTGCAGGG 3'

2C . 3' CCAACTGCGACGTTCCGAG 5'

Para realizar el PCR se utilizaron:

dNTPs	2mM	10µl
Buffer+Mg	10X	10µl
DMSO		10µl
<i>asnB</i> 1C	10pmoles/µl	6µl
<i>asnB</i> 2C	10pmoles/µl	6µl
H ₂ O		56.5µl
Taq polimerasa	1:10	3µl
ADN cromosomal		xµl

En un volumen final de 100µl.

Se colocó el tubo con la reacción en la máquina de PCR bajo las siguientes condiciones:

1. 3min a 94°C
2. 30ciclos de 30seg a 94°C, 1min a 56.5°C y 30seg a 72°C
3. 10min a 72°C
4. 4°C

• **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA β -GALACTOSIDASA (Miller, 1992)**

Se pone un precultivo (en medio mínimo suplementado con la fuente de nitrógeno que se vaya a ensayar) de 5ml en agitación constante durante toda la noche a 37°C. El precultivo se diluye 1:10 en el mismo medio y se deja crecer hasta la fase exponencial de crecimiento (aproximadamente 90 Unidades Klett).

Una vez alcanzados los 90 U.K. se pone en hielo y se centrifuga a 5000rpm por 5 minutos a 4°C. Se resuspende el botón en 1ml de NN1X y se deja en hielo hasta que se vaya a utilizar.

En tubos para enzimas perfectamente lavados se ponen 0.9ml de buffer Z (Na_2HPO_4 60mM, NaH_2PO_4 40mM, KCl 10mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mM, β -mercaptoetanol 50mM, pH 7), 0.1ml del extracto celular, 2 gotas de cloroformo y 1 gota de SDS 0.1%. Se agita vigorosamente por 10 segundos y se deja reposar a temperatura ambiente 5 minutos.

A los tubos que serán el tiempo cero (t_0) se les agregan en este momento 0.5ml de carbonato de sodio 1M. A todos los tubos se les agregan 0.2ml de ONPG a una concentración de 4mg/ml.

La reacción se para a diferentes tiempos con 0.5ml de carbonato de sodio 1M, se centrifugan 3min a 14000rpm y se leen en el espectrofotómetro a 420nm. El factor de conversión que se utilizó es

0.0045 de absorbancia que equivale a 1 mol de ONPG hidrolizado. Las actividades de esta enzima se reportaron como nmoles de ONPG hidrolizado/min/mg de proteína.

- **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GLUTAMINO SINTETASA, GS (Covarruvias *et. al*, 1980)**

La actividad de esta enzima se midió mediante el ensayo de γ -glutamyl transferasa, el cual mide la formación de γ -glutamylhidroxamato.

Para la preparación de los extractos se crecen 10ml de cultivo en medio mínimo (NN) con las fuentes de nitrógeno adecuadas (estos cultivos se inoculan con 1ml de un precultivo de 5ml crecido en las mismas condiciones) y se dejan crecer hasta 80-90 U.K. Se añade inmediatamente 1ml de CTAB [1mg/ml] y se incuba en agitación por 3min a 37°C después de lo cual se dejan en hielo por 20min.

Posteriormente se centrifugan a 5000rpm a 4°C durante 5min y se lavan con 10ml de KCl al 1%, se vuelven a centrifugar de la misma forma y el botón se resuspende en 1ml de KCl al 1%, se guardan en hielo hasta que se vayan a utilizar.

En tubos de vidrio perfectamente bien lavados y a 37°C se agregan 400 μ l de la mezcla de reacción (pH 7.3):

Compuesto	[concentración final]	vol. Para 8.25ml
H ₂ O bidestilada		3.5ml
Imidazol	1M	1.125ml
NH ₂ OH	0.8M	0.185ml
MnCl ₂	0.1M	0.0225ml
Arseniato de Sodio	0.25M	0.75ml
ADP sódico	20mM	0.150ml
CTAB	1mg/ml	0.75ml
L-Gln	0.2M	1.0315ml

Una vez que se equilibró la temperatura de la mezcla de reacción, a los tubos que serán el t₀ se les agrega en ese momento 1ml de Stop Mix (cloruro férrico*6H₂O 55g/l, ácido tricloroacético 20g/l, ácido clorhídrico 21ml/l). A todos se les agregan 100µl del extracto celular.

Los tiempos que se miden son 5 y 10min por lo que una vez terminado este tiempo se les agrega 1ml de Stop Mix . Se centrifugan todos los tubos a 14000rpm por 5min, y se leen las muestras a 540nm. El factor de conversión utilizado fue 0.532 que es la absorbancia de 1mmol de γ -glutamihidroxamato. Todas las actividades de esta enzima se reportan µmol de γ -glutamihidroxamato/min/mg de proteína.

• **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GLUTAMATO SINTASA, GOGAT (Meers, 1970)**

Los extractos celulares se obtuvieron del crecimiento de 10ml de cultivo en agitación a 37°C en medio NNIX suplementado con las fuentes de nitrógeno adecuadas, estos cultivos se inoculan con 1ml de un precultivo de 5ml crecido en las mismas condiciones. Los cultivos se dejan crecer hasta 90 U.K. Se centrifugan a 5000rpm durante 5min. Se lavan las células con 5ml de Buffer de Extracción (Tris-HCl 50mM, β -mercaptoetanol 10mM, pH 7.6) 2 veces y se resuspenden en 1ml del mismo buffer. Se sonicen las células durante 15seg 3 veces en hielo con un intervalo de descanso de 30seg para después centrifugarse durante 5min a 5000rpm.

Soluciones	mezcla completa	control α -ceto	control Gln
H ₂ O	625µl	625µl	625µl
Tris-HCl 50mM pH 7.6	50µl	50µl	50µl
Glutamina 5mM	50µl	50µl	
α -cetoglutarato 5mM pH 7	50µl		50µl
NADPH 8.33mg/5ml	125µl	125µl	125µl

En una celda para espectrofotómetro se ponen 0.9ml de la mezcla de reacción y 0.1ml del extracto celular, una vez que se añade el extracto se empieza a medir la variación de las lecturas en el espectro a 340nm. La determinación enzimática se hizo a intervalos de 15seg a 1min durante 4 minutos. Debido a que existen otras transaminasas que utilizan NADPH como sustrato, se pusieron dos controles: uno sin glutamina y otro sin α -cetoglutarato.

La actividad enzimática esta reportada en nmoles de NADPH oxidado /min/mg de proteína.

• **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GLUTAMATO DESHIDROGENASA, GDH:**

Los extractos celulares se obtuvieron del crecimiento de 10ml de cultivo en agitación a 37°C en medio NN1X suplementado con las fuentes de nitrógeno adecuadas, estos cultivos se inocularon con 1ml de un precultivo de 5ml crecido en las mismas condiciones. Los cultivos se dejan crecer hasta 90 U.K. Se centrifugan a 5000rpm durante 5min. Se lavan las células con 5ml de Buffer de Extracción (Tris-HCl 50mM, β -mercaptoetanol 10mM, pH 7.6) 2 veces y se resuspenden en 1ml del mismo buffer. Se sonicen las células durante 15seg 3 veces en hielo con un intervalo de descanso de 30seg para después centrifugarse durante 5min a 5000rpm.

Soluciones	mezcla completa	control α -ceto	control Gln
H ₂ O	625 μ l	625 μ l	625 μ l
Tris-HCl, 50mM pH 7.6	50 μ l	50 μ l	50 μ l
NH ₄ Cl, 1M	50 μ l	50 μ l	
α -cetoglutarato, 5mM, pH 7	50 μ l		50 μ l
NADPH, 8.33mg/5ml	125 μ l	125 μ l	125 μ l

En una celda para espectrofotómetro se ponen 0.9ml de la mezcla de reacción y 0.1ml del extracto celular, una vez que se añade el extracto se empieza a medir la variación de las lecturas en el espectro a 340nm. La determinación enzimática se hizo a intervalos de 15seg a 1min durante 4 minutos. Debido a que existen otras transaminasas que utilizan NADPH como sustrato, se pusieron dos controles: uno sin amonio y otro sin α -cetoglutarato.

La actividad enzimática esta reportada en nmoles de NADPH oxidado /min/mg de proteína.

• **DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY (Lowry, *et. al.*, 1951):**

Se preparan las siguientes soluciones:

- Solución A (se guarda a 4°C)

Compuesto	[concentración final]	peso para 1l
NaOH	0.1N	4g
NaCO ₃	2%	20g
- Solución B (se guarda a 4°C)

Compuesto	[concentración final]	peso para 100ml
Tartrato de Na y K	2%	2g
- Solución C (se guarda a 4°C)

Compuesto	[concentración final]	peso para 1l
CuSO ₄	1%	1g
- Estándar de Albúmina [1mg/ml]
- Folín 1:3 (v/v) con H₂O

Se toman 100µl del extracto celular y se aforan a 1ml con agua. Posteriormente se hace la mezcla de las soluciones A, B y C en las siguientes proporciones: A 100ml, B 1ml y C 1ml en ese orden. Se agregan de esta mezcla 5ml a los tubos donde se encuentra el extracto

celular y se agita vigorosamente para después dejar reposar durante 10min. Se agregan 500µl de la solución de Folín a cada tubo, se vuelve a agitar y se dejan a temperatura ambiente durante 30min para que se de la coloración. Todas las muestras se leen a 625nm.

En lugar de poner extracto celular, al tubo blanco se le pone 1ml de agua.

Para cada experimento se realizó una curvas standard de 2 puntos. Para esto se realiza el mismo procedimiento arriba mencionado sólo que en lugar de poner los 100µl del extracto celular, se ponen 100µg y 50µg de BSA a partir de un stock de BSA de 1mg/ml, estos se aforan de igual manera a un ml con agua. Los dos puntos servirán para la determinación de la concentración de proteína con relación a la D.O.

• **PURIFICACIÓN DE ARN TOTAL (Aiba, *et. al.*, 1981):**

Todo el material utilizado durante la manipulación del ARN debe estar libre de contaminación por ARNasas por lo que se esterilizó y horneó a 200°C mínimo 4hrs (en el caso del material de vidrio), el material de plástico se utilizó nuevo y estéril.

Soluciones y reactivos:

- Agua bidestilada y estéril
- Solución de lisis: pH 5

Compuesto	[concentración final]	peso para 50ml
Acetato de Sodio	20mM	0.33g
EDTA	1mM	0.1g
SDS	0.5%	0.25g

- Fenol bidestilado (saturado con Acetato de sodio 20mM, pH 5.5 y EDTA 1mM)
- Acetato de sodio 3M pH 5.5
- Etanol absoluto
- Etanol 70%

Procedimiento: Se pone un precultivo de 5ml a 37°C en agitación continua durante toda la noche en medio mínimo con la fuente de nitrógeno correspondiente el cual se diluye 1:10 en matraces con 30ml con el mismo medio. El cultivo se deja crecer hasta 90 U.K. Una vez en esta densidad se pasa a tubos córex siliconizados de 30ml y se centrifuga a 10000rpm durante un minuto a 4°C. El botón se resuspende en solución de lisis a un décimo del volumen inicial y se calienta a 65°C durante 1min.

Se agrega un volumen de fenol precalentado a la misma temperatura, se agita hasta que se mezclen las fases y se incuba a 65°C durante 10min en agitación continua. Se toma el tubo y se centrifuga a 4000rpm durante 10min a temperatura ambiente. Sin mezclar las fases, se sumerge en un baño a 65°C hasta que las fases se vean transparentes. Se toma la fase acuosa que se pasa a un tubo nuevo y se repite toda la operación dos veces más.

Se agrega para precipitar el ARN 1/10 de volumen de acetato de sodio más 2.5 volúmenes de etanol absoluto, se deja a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugan los tubos a 10000rpm durante 15min a 4°C. Se decanta perfectamente y el botón se resuspende en 500µl de agua.

Se toman los 500µl y se pasan a un tubo eppendorff donde se le agrega un volumen de cloroformo y se centrifugan a 10000rpm durante 10min a 4°C. Se pasa el sobrenadante a un tubo nuevo y se vuelve a precipitar de la

misma forma. Al día siguiente se centrifuga el tubo durante 15min a 10000rpm a 4°C. Se decanta y se lava el botón con etanol al 70%. Se le quita el etanol y se seca ligeramente en el desecador (Savant) para después resuspender en 50µl de agua.

Se leen en el espectrofotómetro 5µl de la muestra en 1ml de agua a 260, 280 y 310nm. El valor obtenido de la lectura a 260nm se analiza con la relación: una lectura de 1 es igual a 40µg/ml de ARN. El cociente de las lecturas de 260 y 280nm debe ser cercano a 2 y la lectura a 310nm debe ser menor a 0.01. Estas últimas relaciones determinan la pureza del ARN.

- **HIBRIDACIÓN ARN-ADN (Northern Blot) (Thomas, 1980):**

1. **El gel:**

Soluciones:

- MENP 10X (pH 7)

Compuesto	peso para 1l
MOPS	41.8g
Acetato de sodio	6.8g
EDTA	3.7g

- Solución de fosfatos de sodio y potasio (pH 6.9)

Compuesto	[concentración final]	peso para 1l
KH ₂ PO ₄	1M	68.9g
Na ₂ HPO ₄	1M	77.2g

- Formaldehido
- NaOH 100mM

Método para un gel de 100ml.

En un matraz horneado se ponen 10ml de MENP 10X, 1.5g de agarosa y 72.2ml de agua y se esteriliza por autoclave a 125°C por 15min. Se deja enfriar hasta una temperatura aproximada de 65°C y se le agregan 17.8ml de formaldehido 37%. Se vacía en la cámara de electroforesis que fue lavada previamente con NaOH 100mM por una hora (la cámara debe ser enjuagada con abundante agua estéril). Se deja gelificar el gel, se pone a 4°C y se vacía el Buffer de Corrida MENP 1X sin que cubra el gel. Se colocan dos tiras de papel absorbente plastificado en ambos extremos del gel para que pase la corriente a través del Buffer y se cubre el gel con papel parafilm para que no se evapore la formaldehido.

2. Las muestras:

Soluciones:

- Solución de pozos:

Compuesto	volumen para 10ml
MENP 10X	1ml
Agua	7.2ml
Formaldehido 37%	1.8ml

- Solución de muestras:

Compuesto	volumen para 610µl
Formamida desionizada	400µl
Formaldehido 37%	120µl
MENP 10X	90µl

- Solución de bromofenol:

Compuesto	[concentración final]	para 10ml
Glicerol	50%	5ml
EDTA 0.5M	1mM	20µl
PO ₄ de Na y K 1M	10mM	100µl
Azul de bromofenol	0.05%	0.005g

Aforar a 10ml con agua.

Método: Se toman 20µg de ARN que estén en un volumen final de 7.5µl de agua. Se le agregan 22.5µl de la solución de muestras y se mezcla. Se calienta a 65°C por 2min y se pone inmediatamente en hielo durante 5min. Se le añaden 3µl de la solución de bromofenol, se mezcla y se ponen en hielo.

Los pozos del gel se llenan con la solución de pozos y se vierte en ellos la muestra.

El gel se corre a 70V durante toda la noche.

La transferencia del gel se hace con SSC 20X como se indica en la técnica de Southern Blot. Se fija el ARN a la membrana de nitrocelulosa por irradiación con luz U.V. de la misma manera que en el Southern Blot.

3. Prehibridación de la Membrana:

Se sigue el mismo procedimiento que en el Southern Blot lo único que cambia es el contenido de la solución de Prehibridación que tiene:

Compuesto	[concentración final]	para 20ml
Formamida 100%	50%(v/v)	10ml
SSPE 20X	5X	5ml
Denhardt's 50X	2X	0.8ml
SDS 10%	0.1%	0.2ml
H ₂ O		4ml

3a. Marcaje de la sonda por Random Primer

Se desnaturalizan 25ng de ADN disuelto en 5-20µl de agua destilada. Se hierve durante 5min y se pasa de inmediato a hielo ya en el hielo se ponen:

- 2µl dATP
- 2µl dGTP
- 2µl dTTP
- 15µl Buffer de mezcla de Random Primers
- 5µl (aprox. 50mCi) [α 32-P] dCTP, 3000Ci/mmol, 10mCi/ml
- 1µl ADNpolimerasa I (fragmento Klenow)
- xµl ADN (de 25ng)

Todo debe quedar en un volumen final de 50µl. Posteriormente se deja incubando a 25°C por 1hr. Una vez transcurrido este tiempo se agregan 5µl de Buffer de Paro. Para purificar la sonda, se corta la punta de una jeringa de insulina y se le pone en la base fibra de vidrio. Se añade la resina hasta el tope de la jeringa (sephadex G-100 diluído en Buffer TE) y se centrifuga por el tiempo que tarde llegar a la velocidad de 2000rpm en un tubo corex, se añade nuevamente resina hasta que llegue a un volumen de 0.9ml y se centrifuga de nueva cuenta.

Se lava dos veces con 500µl de TES -EDTA1mM, Tris10mM, NaCl 100mM, pH8-, (centrifugando de la misma forma cada vez). La sonda se diluye hasta 400µl y se pone en la columna que se centrifuga a 2000rpm por 5min. La muestra obtenida se puede guardar a -20°C o se desnaturaliza para su utilización.

4. Hibridación de la membrana:

Se agrega al tubo la sonda marcada*^{3a}, la cual se desnaturalizó previamente hirviéndola por 5min para después ponerla en hielo por otros 5min, y se deja toda la noche(16-24hrs) a 42°C en agitación moderada.

5. Lavado y Revelado de la membrana:

Todos los lavados se realizan con 20ml de la solución que se vaya a emplear para el tubo pequeño y 40ml para el tubo grande.

Se lava la membrana con agitación fuerte con SSC 1X, SDS 0.1% a 37°C por 20min, se lava tres veces más con SSC 0.2X, SDS 0.1% durante 20min a 68°C cada lavado.

Se saca la membrana, se seca sólo un poco y se expone a una placa de rayos X por el tiempo conveniente (24-48hrs) a -70°C para después revelar la placa.

• **DIAGNÓSTICO PARA LA AUXOTROFÍA (Ronald W. Davis, 1980)**

Los medios para la determinación llevarán los siguientes compuestos (las mezclas se muestran en la siguiente tabla donde los números en negrillas representan lo que va en cada tubo y se lee en filas y columnas por separado:

	1	guananosin	Cys	Met	tiaminaB1
6	adenosina	a	Ile	Lys	Val
7	His	Leu	Triptofano	Thr	Pro
8	fenilalanina	Tyr	uracilo	Asp	Arg
9	Gln	Asn	Glt	DAP	Gly
10	Timina	Ser			
	2	3	4	5	

11 piridoxina, ácido nicotínico, biotina, pantotenato y Ala.

Se crece la cepa en estos medios, en la mezcla que se detecte crecimiento es en la que se encuentran el o los nutrientes para los que la cepa es auxótrofa.

Con los cinco requerimientos se hacen combinatorias entre ellos y se prueban cada uno por separado para determinar exactamente cual o cuales de los requerimientos de la mezcla son los que la cepa requiere para crecer.

Se preparan stocks de cada uno de los nutrientes en las siguientes concentraciones

Compuesto	stock	para 5ml
Adenosina	2.67%	25µl
Ala	0.84%	25 µl
Arg	10%	7 µl
Asn	0.84%	25 µl
Asp.K	1%	25 µl
Biotina	0.49%	25 µl
Cys	0.36%	50 µl
DAP	0.2%	50 µl
Glt.Na	20%	50 µl
Gln	2%	*µl
Gly	0.2%	25 µl
Guanosina	1.7%	25 µl
His	0.31%	25 µl
Ile	0.79%	25 µl
Leu	0.79%	25 µl
Lis	1.1%	25 µl
Met	0.5%	50 µl
Acido Nicotínico	0.25%	25 µl
Pantotenato de Ca	0.48%	25 µl
Fenilalanina	0.99%	25 µl
Pro	2%	65 µl
Pirridoxina.HCl	0.41%	25 µl
Ser	8.4%	25 µl
Tiamina (B1)	0.1%	75 µl
Thr	0.71%	25 µl
Timina	0.81%	25 µl
Triptofano	0.41%	25 µl
Tirosina	0.18%	50 µl
Uracilo	0.224%	25 µl
Val	0.7%	25 µl

*En el caso de la glutamina para la mezcla #1 se utilizan 50µl y para la mezcla #9, 250µl.

- **PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA (QIAEX II):**

Se corre el gel y se corta la banda que se desea sin exceso de agarosa. Se añaden 3 volúmenes de buffer QX1, se agregan 10µl de QIAEX II y se incuba 10min a 50°C agitando cada 2min. Se centrifuga por 30seg a 14000rpm y se retira el sobrenadante con pipeta. Se agregan 500µl de QX I y se resuspende. Se centrifuga 30seg a 14000rpm y nuevamente se quita el sobrenadante. Se añaden 500µl de buffer PE, se resuspende y se vuelve a centrifugar. Se repite este procedimiento y se retira perfectamente el sobrenadante con una pipeta.

Se deja secar el botón hasta que se ponga blanco y se eluye con 20µl de agua. Se incuba a temperatura ambiente durante 5min y se centrifuga nuevamente para tomar el sobrenadante y pasarlo a un tubo nuevo.

- **OBTENCION DE SONDA *asnA*:**

Esta se obtuvo por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de ADN cromosomal de la cepa MX614, utilizando un par de oligonucleótidos específicos que se diseñaron sobre la base de la secuencia reportada por Nakamura, M. *et al.*, 1981. Los oligonucleótidos diseñados fueron:

asnA-1 5' GGACCGTGCAGCGTTTCGG 3'

asnA-2 3' GGCGATGTCGGCACACGG 5'

Para realizar el PCR se utilizaron:

dNTPs	2mM	10μl
Buffer+Mg	10X	10μl
DMSO		10μl
<i>asnA</i> -1	10pmoles/μl	6μl
<i>asnA</i> -2	10pmoles/μl	6μl
H2O		45μl
Taq polimerasa	1:10	3μl
ADN cromosomal		xμl

En un volumen final de 100μl.

Se colocó en la máquina de PCR bajo las siguientes condiciones:

1. 1min a 94°C
2. 30ciclos de 30seg a 94°C, 1min a 56.5°C y 30seg a 72°C
3. 10min a 72°C
4. 4°C

RESULTADOS

Análisis tipo Northern Blot para la determinación del nivel de la transcripción del gen *asnA* en las cepas MX614 y MX902.

Para determinar si la transcripción del gen *asnA* de *Escherichia coli* dependía de la concentración y calidad de la fuente de nitrógeno en el medio, se hizo un ensayo de hibridación ARN-ADN tipo Northern de la cepa MX614 (silvestre) crecida en exceso de amonio (15mM), limitación de amonio (0.5mM), glutamina (6.8mM) y asparagina (1.9mM) como diferentes fuentes de nitrógeno, y fue revelado con una sonda específica para *asnA* obtenida por PCR, según se describe en materiales y métodos (Figura 3).

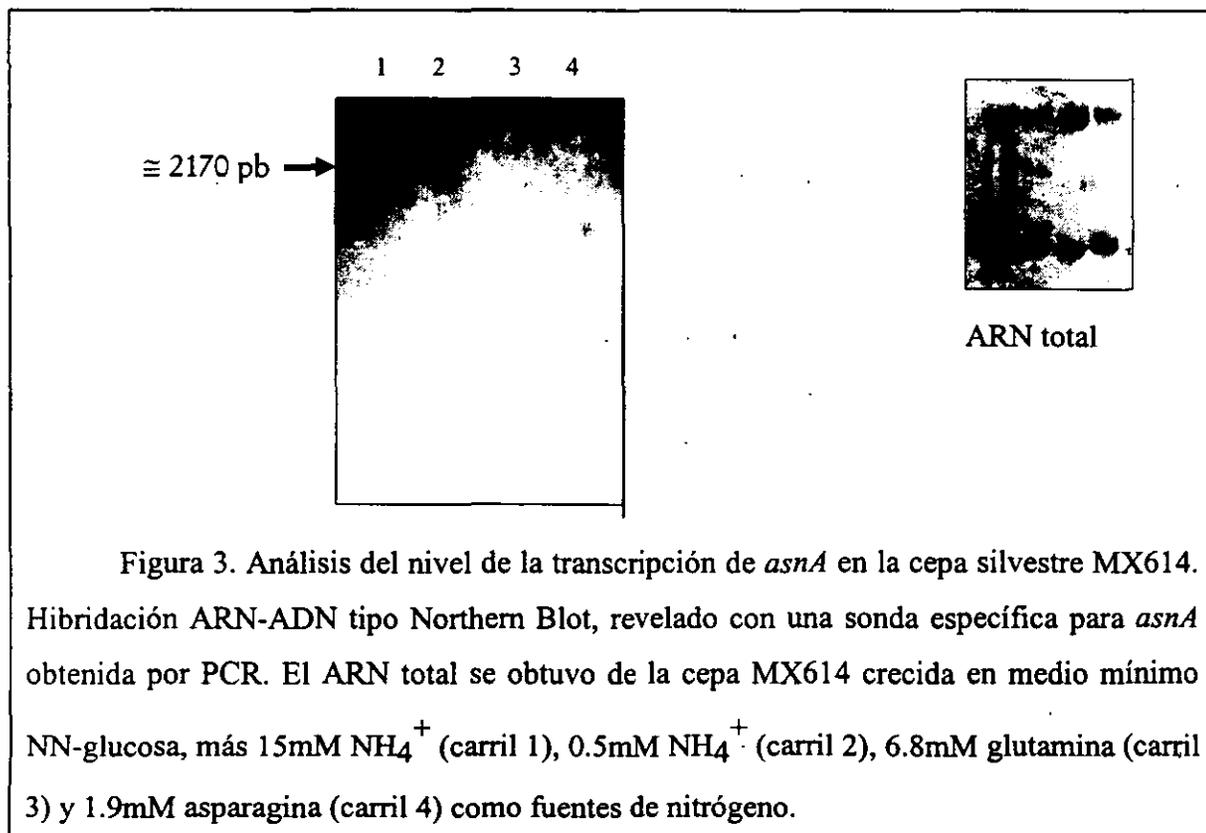


Figura 3. Análisis del nivel de la transcripción de *asnA* en la cepa silvestre MX614. Hibridación ARN-ADN tipo Northern Blot, revelado con una sonda específica para *asnA* obtenida por PCR. El ARN total se obtuvo de la cepa MX614 crecida en medio mínimo NN-glucosa, más 15mM NH_4^+ (carril 1), 0.5mM NH_4^+ (carril 2), 6.8mM glutamina (carril 3) y 1.9mM asparagina (carril 4) como fuentes de nitrógeno.

Los resultados de la hibridación nos muestran claramente la represión de la que este gen es objeto en condiciones de limitación de nitrógeno y en asparagina. Sólo podemos observar una banda del peso esperado (2170pb) en la condición de exceso de amonio. Este resultado concuerda con las actividades enzimáticas reportadas por Reitzer, et. al. (1982) para *K. aerogenes*. Como se puede observar en la condición de exceso de amonio es en la única condición en la que se observa transcrito, ya que es el sustrato de esta enzima para producir asparagina.

Anteriormente se había reportado para *K. aerogenes* la posible regulación de *asnA* por la proteína NR₁ (Reitzer, et. al., 1982). Para saber si esta proteína tenía la misma acción en *E. coli*, se decidió hacer un experimento de hibridación ARN-ADN tipo Northern con la cepa MX902, la cual tiene una mutación en el gen *glnG*, que codifica para la proteína NR₁.

Se creció la cepa MX902 en condiciones de exceso de amonio (15mM), limitación de amonio (0.5mM) y glutamina (6.8mM) como fuentes de nitrógeno, para después hacer el ensayo y revelar con la sonda de *asnA*, obtenida por PCR, (Figura 4). Se puede observar, la clara des-regulación de la cual es objeto *asnA* en ausencia de *glnG*. En los carriles 2 (limitación de amonio) y 3 (glutamina) se observa que la cantidad de transcrito es significativamente mayor a la del carril 1 (exceso de amonio).

Este resultado nos dice que tal vez NR₁ actúe modulando la expresión de *asnA* negativamente.

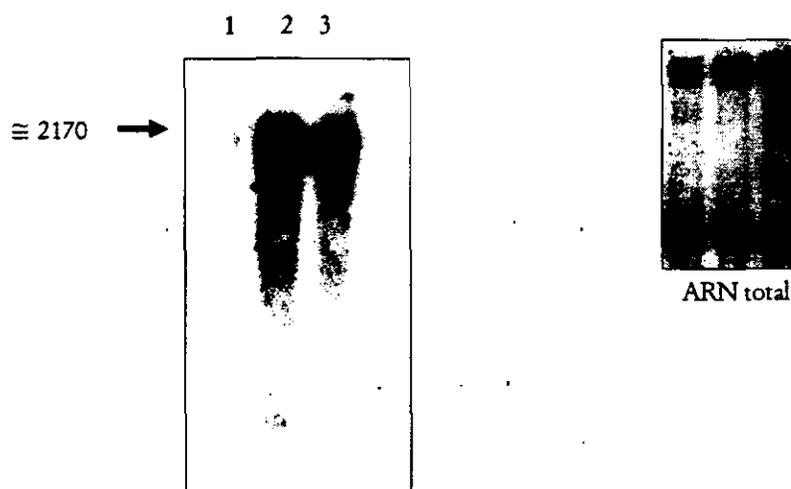


Figura 4. Análisis del nivel de la transcripción de *asnA* en la cepa MX902. Hibridación ARN-ADN tipo Northern Blot, revelado con una sonda específica para *asnA* obtenida por PCR. El ARN total se obtuvo de la cepa MX902 crecida en medio mínimo NN-glucosa, más 15mM NH_4^+ (carril 1), 0.5mM NH_4^+ (carril 2) y 6.8mM glutamina (carril 3) como fuentes de nitrógeno.

Análisis tipo Northern Blot para la determinación del nivel de la transcripción del gen *asnB* en la cepa silvestre MX614.

Para ver si los niveles de transcripción del gen *asnB* de *Escherichia coli* dependían de la concentración y calidad de nitrógeno en el medio, se hizo un ensayo de hibridación ARN-ADN tipo Northern de la cepa MX614 (silvestre) crecida en exceso de amonio (15mM), limitación de amonio (0.5mM), asparagina (1.9mM) y L-glutamato (12mM) como diferentes fuentes de nitrógeno, y revelado con una sonda específica para *asnB* obtenida por PCR (Figura 5).

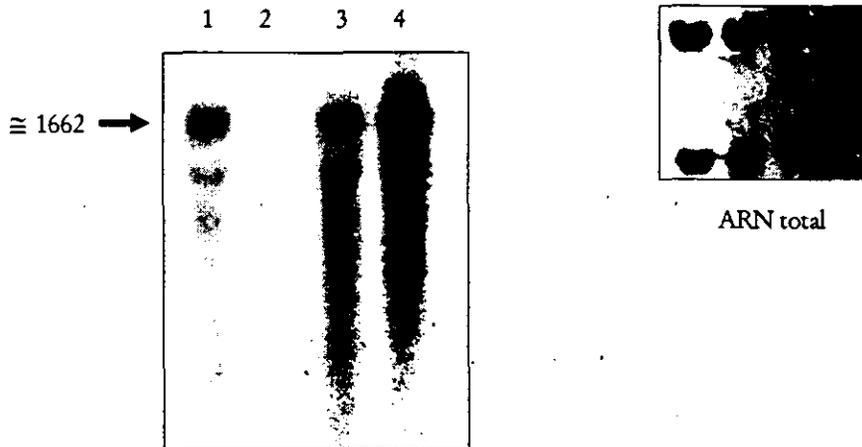


Figura 5. Análisis del nivel de la transcripción de *asnB* en la cepa silvestre MX614. Hibridación ARN-ADN tipo Northern Blot, revelado con una sonda específica para *asnB* obtenida por PCR. El ARN total se obtuvo de la cepa MX614 crecida en medio mínimo NN-glucosa, más glutamato 12mM (carril 1), asparagina 1.9mM (carril 2), 0.5mM NH_4^+ (carril 3) y 15mM NH_4^+ (carril 4), como fuentes de nitrógeno.

Como podemos ver en la Figura 5, el nivel de la transcripción del gen *asnB* varía según la calidad y cantidad de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo. Exceso de amonio (carril 4) es la condición en la que es posible detectar una mayor cantidad de transcrito, mientras que en las condiciones de glutamato (carril 1) y limitación de amonio (carril 3) hay una ligera, pero reproducible; disminución del mismo, es importante hacer notar que no hay diferencia significativa en la cantidad de transcrito entre estas dos últimas condiciones.

En el caso de asparagina (carril 2) no se observa transcrito alguno lo que nos indica la represión que dicho aminoácido ejerce sobre este gen.

Análisis tipo Southern Blot de las cepas MX614 y MX4003.

Para poder detectar la transcripción de *asnB* por otro método, se decidió hacer una fusión transcripcional de *asnB* con el gen reportero *lacZ*.

Para esto, se remplazo en el laboratorio, en la cepa JF448 (*asnA31 asnB32*) (Felton, et al, 1980), el alelo *asnB32* por el alelo silvestre proveniente de la cepa CAG12077. Esto se realizó mediante la propagación del bacteriófago P1virA en esta última cepa, la cual es protótrofa de asparagina y portadora de un Tn10 en el minuto 15.75, y la posterior infección de JF448. Las transductantes fueron seleccionadas como Tc^R protótrofas de asparagina, una de ellas fue purificada y denominada JF448-P (*asnA31 asnB⁺ Tc^R*).

La cepa JF448-P fue utilizada para ser infectada con un lisado del bacteriófago *MudI1734* el cual tiene un cassette de resistencia a Kanamicina. El total de la población fue seleccionada en LKanTc. El bacteriófago P1 fue propagado a partir de una colonia auxótrofa de asparagina, seleccionada a partir de la población celular Tc^RKan^R. Ambos marcadores de resistencia fueron transducidos a fondo genético silvestre (cepa MX614). Una de las transductantes Tc^RKan^R se purificó. Se creció esta cepa en medio sólido con X-Gal, la cepa presentaba fenotipo azul, lo cual indicaba que sí había transcripción de *lacZ* en estas células. Utilizamos esta cepa para determinar si tenía la fusión de *lacZ* con *asnB* por medio de un ensayo de hibridación ADN-ADN tipo Southern Blot el cual revelamos con una sonda específica para *asnB* obtenida por PCR (Figura 6).

En la Figura 6 podemos observar que hay diferencia en la movilidad de las bandas entre ambos carriles. El gen *asnB* tiene un peso de 1662pb aproximadamente. En la cepa silvestre MX614 se espera ver, al digerir el ADN total con la enzima de restricción *BglII* una banda de 2.5Kb, la cual contendría gran parte del gen *asnB* (Scotfiel, et al, 1990).

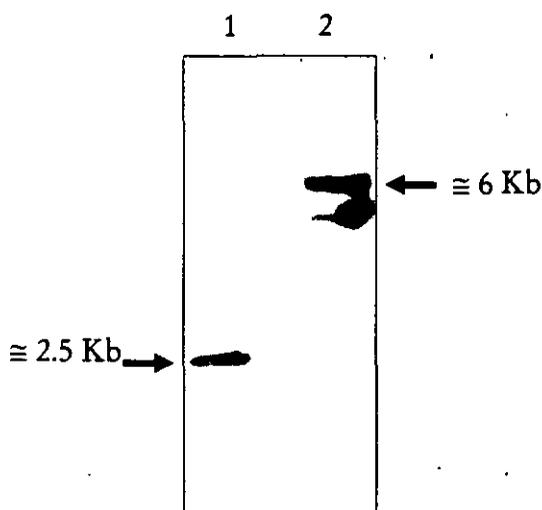


Figura 6. Hibridación ADN-ADN tipo Southern Blot, revelado con una sonda específica para *asnB* obtenida por PCR. El ADN total se obtuvo de la cepa MX614 (carril 1) y MX4003 (carril 2) crecidas en medio Luria. El ADN se digirió con la enzima *BglII* y se corrió en todos los carriles aproximadamente la misma cantidad de la digestión.

En el carril 1 (MX614) vemos una banda de aproximadamente 2.5Kb y en el carril de la cepa MX4003 (carril 2) hay una diferencia en la movilidad de aproximadamente 3.5Kb más (6Kb aproximadamente). Se hicieron dos ensayos más del mismo tipo pero se digirió en una ocasión con *PvuII* y en otra con *HinfI*, también en estos dos experimentos se pudo observar la diferencia en la movilidad de las bandas dando en la cepa MX4003 un aumento de aproximadamente 3.5Kb en total (datos no mostrados). Este resultado aunado

a la presencia de marcadores de resistencia a Tc y Kan, así como el fenotipo *lacZ⁺*, nos da cuenta de que el gen *asnB* de la cepa MX4003 lleva la inserción de *MudI1734*.

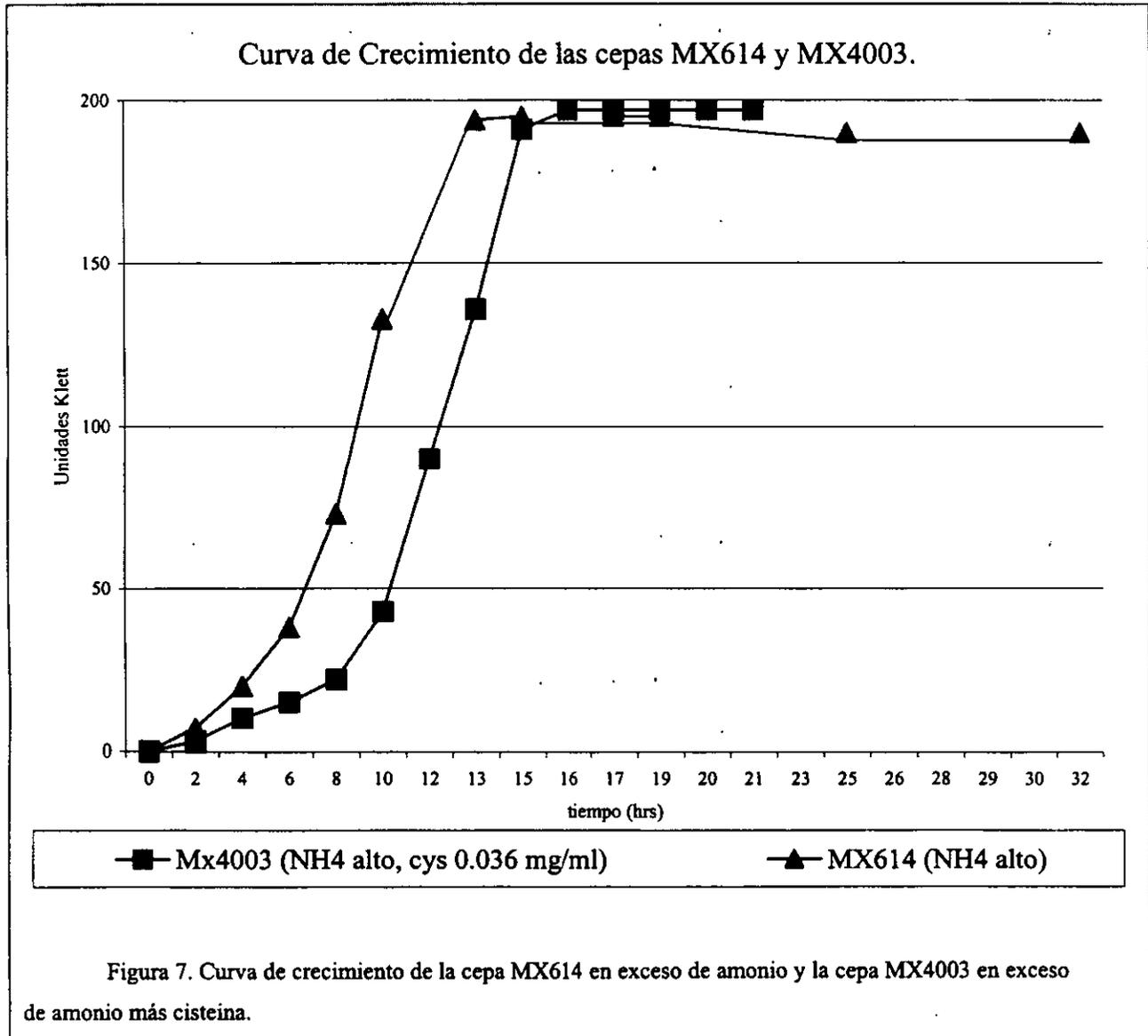
Determinación de auxotrofia de la cepa MX4003 y fenotipo *Aut* de la misma.

Durante el transcurso de los experimentos para determinar el fenotipo *Aut* de la cepa MX4003, se observó que el crecimiento de dicha cepa en medio mínimo no era adecuado, independientemente de la fuente de nitrógeno. Sin embargo dado que la cepa crecía bien tanto en medio rico (medio luria), como en medio mínimo suplementado con casaminoácidos, hecho que concordaba con todos los reportes anteriores (Felton, et al, 1980), se consideró que la razón del mal crecimiento de esta cepa, podría deberse, a que la mutación en *asnB* causara el mal funcionamiento de la síntesis o asimilación de algún requerimiento diferente de asparagina.

Se decidió realizar una prueba de auxotrofia con el propósito de determinar la razón por la cual el crecimiento de esta cepa no era normal -para evitar así el uso de casaminoácidos- por la necesidad de nuestros experimentos (medir la actividad de las enzimas GS, GDH y GOGAT, así como la transcripción de *asnA* y *asnB* en diferentes condiciones de nitrógeno en el medio) de tener un medio definido, en el cual las células no tomaran el nitrógeno de ninguna otra fuente, salvo la que le proporcionáramos.

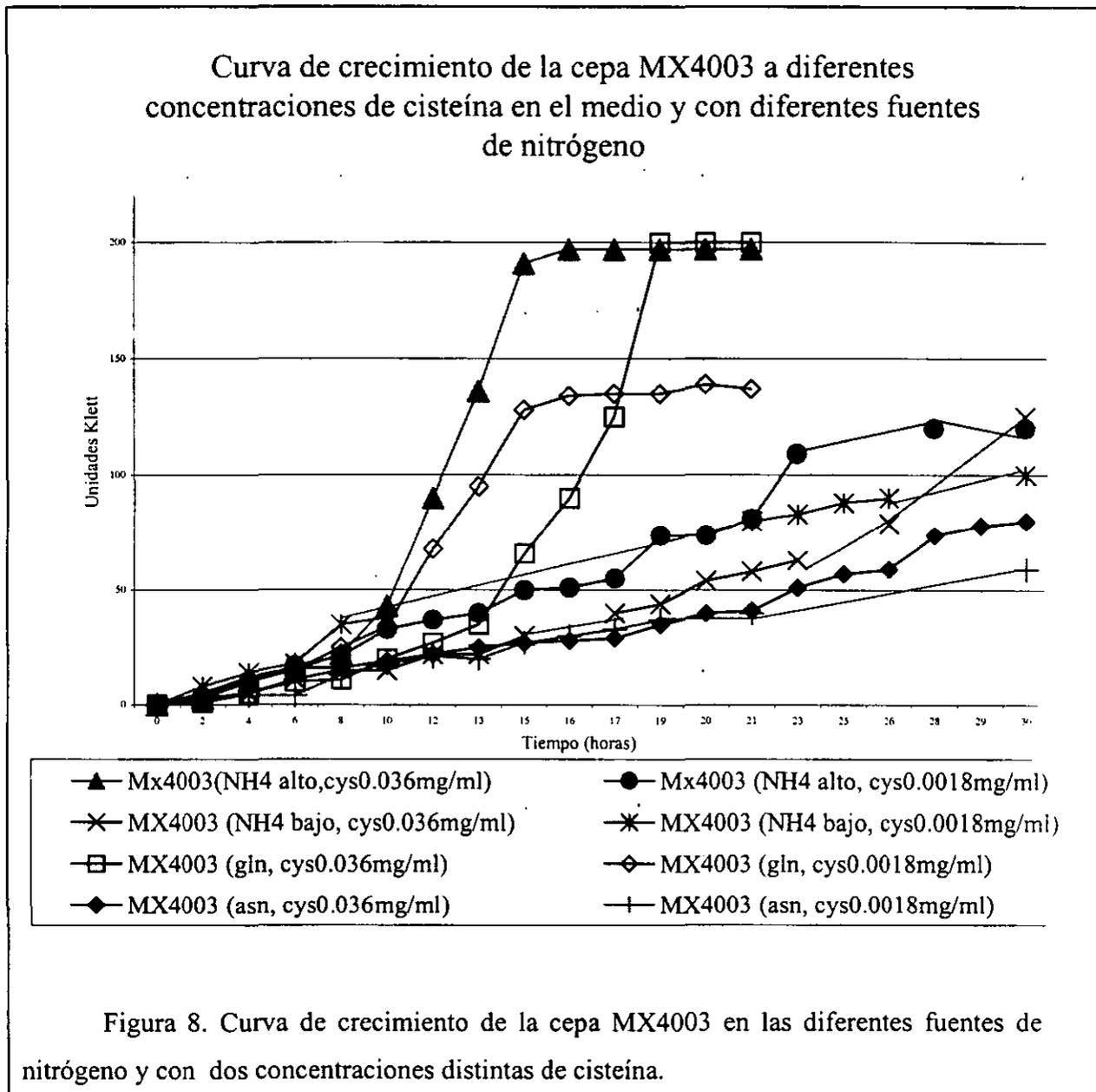
Se hicieron pruebas de auxotrofia y una vez que se probaron todos los requerimientos del medio (ver material y métodos), el resultado indicó que la

cepa necesitaba cisteína (cys) para tener un crecimiento normal. Como se observa en la Figura 7 el crecimiento de la cepa mutante (MX4003) con exceso de amonio (15mM) y cisteína (36µg/ml) en el medio, es análogo al crecimiento de la cepa silvestre en exceso de amonio.



La concentración mínima de cisteína para el crecimiento normal, fue determinada por curvas de crecimiento de la cepa MX4003 en medio mínimo NN-glucosa, con las distintas fuentes de nitrógeno, añadiendo cisteína a

distintas diluciones que fueron 36 μ g/ml, (concentración que se utilizó para la prueba de auxotrofia según el protocolo) 18 μ g/ml, 3.6 μ g/ml, hasta 1.8 μ g/ml.



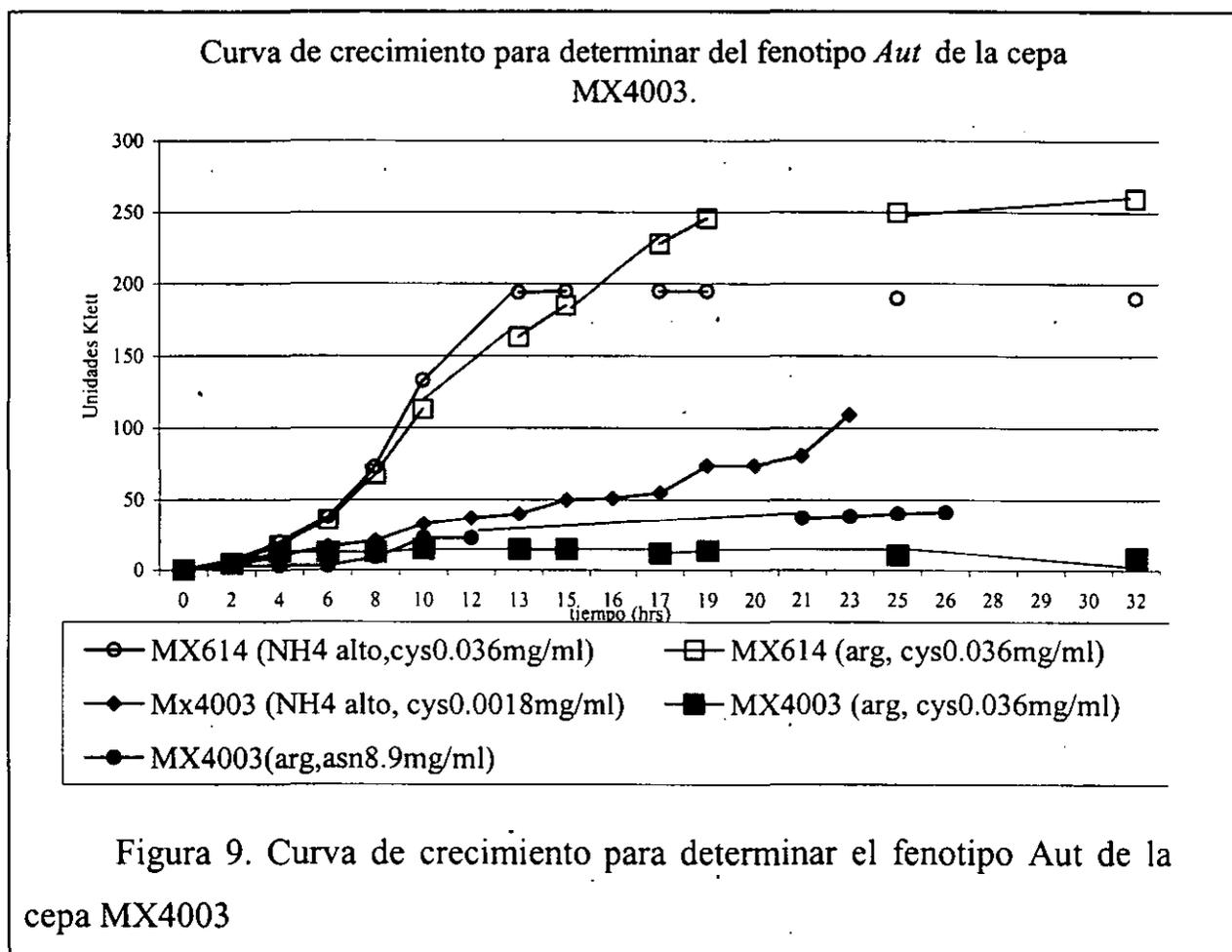
En adelante las células se crecieron a una concentración de 1.8 μ g/ml ya que como se muestra en la Figura 8, el crecimiento a esta concentración era lento pero si lograba llegar a niveles adecuados en la fase estacionaria. Este

experimento permitió observar, que el crecimiento de la cepa MX4003 era dependiente de la concentración de cisteína en el medio es decir: a mayor concentración de cisteína mejor crecimiento, es importante hacer notar que la cisteína sola no funciona como fuente de nitrógeno ya que la cepa MX4003 no crece con cisteína (36µg/ml) como fuente única de nitrógeno en el medio (Dato no mostrado). Se puede observar, si comparamos los datos de la Figuras 8 y 9, que el crecimiento de la cepa mutante en contraste con el de la silvestre es mucho más lento, sobre todo en las condiciones de limitación de nitrógeno (limitación de amonio y asparagina). La experiencia al trabajar con la cepa mostró que si inoculábamos con un mayor número de células, sobre todo en las condiciones de limitación de nitrógeno, la cepa MX4003 crecía mucho mejor pero no llegaba a crecer como la cepa silvestre en ninguna de las condiciones.

Se hicieron también algunas curvas de crecimiento con el propósito de detectar si la cepa tenía la capacidad de utilizar aminoácidos como fuente de nitrógeno, los cuales son considerados fuentes limitantes de nitrógeno (Figura 9). Esta prueba nos da cuenta de la capacidad de las bacterias para utilizar fuentes alternativas de nitrógeno como en este caso el aminoácido arginina, este fenotipo que se encuentra relacionado con la capacidad de inducir la repuesta Ntr. Las curvas de crecimiento se realizaron creciendo a las cepas MX614 y MX4003 en medio mínimo NN-glucosa con cisteína, utilizando exceso de amonio (15mM) y arginina (0.1mg/ml) como fuentes de nitrógeno.

Como se observa en la Figura 9 la cepa mutante fue incapaz de crecer en un medio con arginina como única fuente de nitrógeno, lo cual correlaciona con los resultados obtenidos por el grupo de Reitzer, L.J. (1982) en *Klebsiella*

aerogenes. También se puede observar, en la Figura 9, que la adición de asparagina en una concentración de 8.9 mg/ml, al medio con arginina como fuente de nitrógeno sólo restablece un poco el crecimiento en la cepa MX4003.

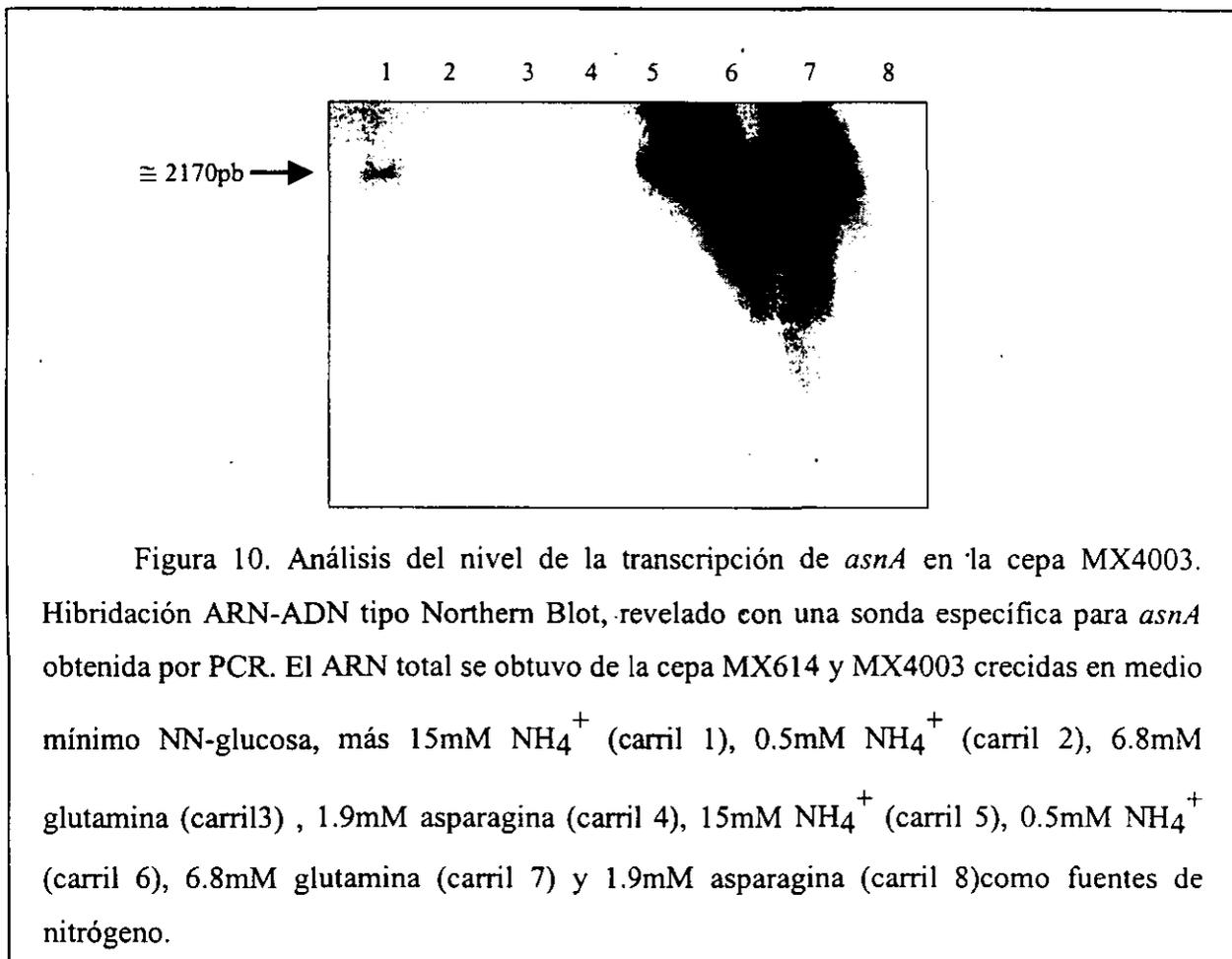


Análisis de la transcripción del gen *asnA* de la cepa MX4003 por medio de un ensayo de hibridación ARN-ADN tipo Northern Blot.

Con el objeto de analizar la transcripción del gen *asnA* cuando *asnB* no estaba presente, se decidió hacer una análisis de hibridación ARN-ADN tipo

Northern Blot de la cepa MX4003 y MX614, crecida en exceso de amonio (15mM), limitación de amonio (0.5mM), glutamina (6.8mM) y asparagina (1.9mM) como diferentes fuentes de nitrógeno y revelado con una sonda específica para *asnA* obtenida por PCR (Figura 10).

En la Figura 10 se muestra, que la falta de *asnB* provoca un aumento dramático en la expresión de *asnA* cuando se utiliza glutamina como fuente de nitrógeno.



Las concentraciones de ARN total por carril son aproximadamente similares (dato no mostrado). La concentración del transcrito de *asnA* en

exceso de amonio en la cepa MX614 es similar a la observada para la cepa MX4003 en esta misma condición, también se puede observar un ligero aumento en el nivel de la transcripción de *asnB* en la condición de limitación de amonio. Finalmente, se muestra que la represión por asparagina, de la cual es objeto *asnA*, se mantiene inalterada en la cepa MX4003.

Determinación de la actividad de β -galactosidasa de la cepa MX4003

Dado que la cepa MX4003 tenía la fusión transcripcional de *asnB* con *lacZ*, se midió la actividad de β -galactosidasa de esta cepa en medio mínimo NN-glucosa suplementado con cuatro fuentes de nitrógeno distintas: exceso de amonio (15mM), limitación de amonio (0.5mM), glutamina (6.8mM) y asparagina (1.9mM). La siguiente Tabla muestra los promedios de los datos obtenidos de 21 experimentos independientes y por duplicado. La cepa MX614 no tiene gen para β -galactosidasa por lo que las actividades de esta enzima en esta cepa son menores a 1.

Actividad de β -galactosidasa en la cepa MX4003.

	NH ₄ ⁺ (15mM)	NH ₄ ⁺ (0.5mM)	Gln(6.8mM)	Asn(1.3mM)
MX4003aerobica	392.229±97	146.21 ±42	410.203 ±101	98.9 ±28
MX4003anaerobica	41.32 ±11	19.129 ±6	13.995 ±7	3.113 ±1

Tabla I. Las fuentes de nitrógeno fueron agregadas al medio mínimo NN-glucosa para aerobiosis y anaerobiosis respectivamente. Las actividades están reportadas en μ moles de ONPG hidrolizado /min. / mg de proteína.

Como se puede ver en la Tabla I, La actividad de β -galactosidasa en glutamina y exceso de amonio es aproximadamente cuatro veces mayor que actividad en limitación de amonio o asparagina.

Determinación de las actividades específicas de las enzimas GS, GDH y GOGAT de las cepas MX4003 y MX614.

Con la intención de ver si existía una relación entre el sistema Ntr y la ausencia del gen *asnB* se midió la actividad de las principales enzimas de este sistema en la cepa MX4003, en comparación con la cepa silvestre MX614.

Los ensayos para determinar la actividad específica de la enzima GDH, tanto para la cepa silvestre (MX614) como para la cepa MX4003, se hicieron en medio mínimo NN-glucosa suplementado con exceso de amonio (15mM), limitación de amonio (0.5mM), glutamina (6.8mM), y asparagina (1.9mM) (Tabla II). Los datos que se muestran son promedios de 6 experimentos independientes por duplicado.

Actividad de GDH en las cepas MX614 y MX4003.

	NH ₄ (15mM)	NH ₄ (0.5mM)	Gln(6.8mM)	Asn(1.3mM)
MX614	553.77 ±177	269.09 ±100	587.47 ±153	77.82 ±24
MX4003	317.58 ±98	290.61 ±84	494.94 ±84	126.26 ±38

Tabla II. Las fuentes de nitrógeno fueron añadidas al medio mínimo NN-glucosa. Las actividades están reportadas en nmoles de NADPH oxidado /min. /mg de proteína.

Como se muestra en la Tabla II, no hay una diferencia importante entre las actividades que encontramos para la cepa MX614 en comparación con la cepa MX4003.

Posteriormente se midió la actividad específica de la enzima GOGAT en las mismas condiciones que la GDH. En la Tabla III se muestran los promedios de 5 experimentos independientes y por duplicado.

En la Tabla III se puede observar que en la actividad de GOGAT existe una variación significativa en las condiciones de exceso de amonio y glutamina. La actividad de la enzima, en estas condiciones, en la cepa mutante (MX4003) es aproximadamente unas 4 veces menor con respecto a la silvestre.

Lo anterior puede deberse a la existencia de una regulación por la ausencia de *asnB*, que induce la represión de GOGAT, aunque también podría ser que esta variación se debiese a la respuesta estricta provocada por la falta de suficiente asparagina para crecer adecuadamente.

Actividad de GOGAT en las cepas MX614 y MX4003.

	NH ₄ (15mM)	NH ₄ (0.5mM)	Gln(6.8mM)	Asn(1.3mM)
MX614	135.32 ±11	48.33 ±20	174.36 ±70	31.32 ±18
MX4003	19.36 ±9	37.74 ±15	40.64 ±20	19.22 ±10

Tabla III. Las fuentes de nitrógeno fueron añadidas al medio mínimo NN-glucosa. Las actividades están reportadas en nmoles de NADPH oxidado /min. / mg de proteína.

Se decidió también medir la actividad de GS, que es una de las enzimas de más importancia para el sistema Ntr, en las cepas MX614 y MX4003 en medio mínimo NN-glucosa suplementado con diferentes fuentes de nitrógeno como son: exceso de amonio (15mM), limitación de amonio (0.5mM), glutamina (6.8mM) y asparagina (1.9mM). En la Tabla IV se muestran los promedios de 6 experimentos independientes y por duplicado.

Como muestra la Tabla IV las actividades de GS se vieron afectadas por la ausencia de *asnB* ya que se redujo un 50% la actividad de GS en las condiciones donde esta se encuentra más activa que es en limitación de amonio, glutamina y asparagina.

Actividad de GS en las cepas MX614 y MX4003.

	NH ₄ (15mM)	NH ₄ (0.5mM)	Gln(6.8mM)	Asn(1.3mM)
MX614aeróbica	0.14 ±0.044	1.294 ±0.342	1.561 ±0.44	1.069 ±0.278
MX4003aeróbica	0.101±0.014	0.74 ±0.122	0.606±0.14	0.796 ±0.097
MX614anaeróbica	0.165 ±0.073	0.716 ±0.192	ND	0.485 ±0.075
MX4003anaeróbica	0.138±0.031	0.591 ±0.091	ND	0.433 ±0.181

Tabla IV. Las fuentes de nitrógeno fueron añadidas al medio mínimo NN-glucosa para aerobiosis y anaerobiosis respectivamente. Las actividades están reportadas en mmoles de γ -glutamihidroxamato /min. /mg de proteína. ND, no determinada.

Estos datos sugieren que *asnB* esta relacionado directa o indirectamente con la regulación de GS.

Determinación de síntesis de β -galactosidasa en la cepa MX4003 en anaerobiosis.

Al constatar que la cepa MX4003, como ya habíamos dicho antes, no crecía adecuadamente en algunas condiciones y una vez que se determinó que se requería la presencia de cisteína en el medio para poder crecer, encontramos que existían algunas cepas en *E. coli* que eran bradítrofas (característica que indica una aparente auxotrofia, que desaparece en condiciones específicas) de cisteína y esta característica se perdía cuando la cepa se crecía en algunas condiciones específicas de crecimiento, como lo es la anaerobiosis (Imlay, et. al., 1991), por lo tanto este requerimiento era sólo para poder disminuir el estado de estrés oxidativo en el que se encontraban estas células.

Basándonos en esos resultados se decidió hacer mediciones de β -galactosidasa, pero en condiciones de anaerobiosis, que sería otra forma (en lugar de la cisteína) de reducir el supuesto estrés oxidativo al que estarían expuestas las células.

A diferencia de las condiciones de crecimiento aeróbicas, donde la cepa MX4003 requería de cisteína para tener un buen crecimiento en medio mínimo, en condiciones anaeróbicas creció perfectamente bien sin este requerimiento.

Se midió la D.O. de los cultivos de ambas cepas (MX614 y MX4003) en las distintas condiciones de crecimiento (exceso y limitación de amonio, glutamina y asparagina), a las 12 y 18 hrs después de haber inoculado, con el mismo número de células, e incubado a 37°C. Las lecturas tanto para la cepa

MX614 y como para la cepa MX4003 fueron iguales (datos no mostrados). Por esta razón podemos decir que la cepa MX4003 ya no necesita cisteína para crecer. Es decir: aún en medio mínimo suplementado con limitación de amonio (0.5mM) o asparagina, la cepa tiene un crecimiento análogo al de la cepa silvestre.

Se midió la actividad de β -galactosidasa en medio mínimo suplementado con: exceso de amonio (15mM), limitación de amonio (0.5mM), glutamina (6.8mM) y asparagina (1.9mM) como diferentes fuentes de nitrógeno. Los resultados que se muestran en la Tabla I son los promedios de 6 experimentos independientes y por duplicado.

Como se puede ver la actividad de β -galactosidasa de la cepa MX4003 en anaerobiosis es muy baja en todas las condiciones de crecimiento y al compararla con las actividades de β -galactosidasa en condiciones aerobias (Tabla I), se observa que hay una disminución de más de 10 veces en la actividad en anaerobiosis que en aerobiosis. Estos datos sugieren que la expresión de *asnB* está regulada por la disponibilidad de oxígeno.

Actividad específica de la enzima GS en las cepas MX4003 y MX614 en anaerobiosis

Debido a los resultados de la actividad de β -galactosidasa de la cepa mutante en anaerobiosis, se decidió analizar la actividad específica de GS en esas mismas condiciones y así ver si se seguía manteniendo el efecto observado en aerobiosis.

Se realizaron experimentos con las cepas MX614 y MX4003 crecidas en anaerobiosis en medio mínimo NN-glucosa, más exceso de amonio (15mM), limitación de amonio (0.5mM) y asparagina (1.9mM). Los resultados que se muestran en la Tabla IV son los promedios de 6 experimentos independientes y por duplicado.

Como se muestra en la Tabla IV no hay diferencia alguna entre las dos cepas en cualquiera de las condiciones de crecimiento probadas.

La comparación de los datos de la cepa silvestre MX614 de la Tabla IV con los de la misma cepa en aerobiosis (Tabla IV), nos muestra que hay una disminución de 50% de las actividades de la enzima GS en las condiciones en las que se encuentra más activa como son limitación de amonio y asparagina.

Tabla de Resumen de Resultados

Figura	Analiza	Cepa		NH4 15mN	NH4 0.5mM	gln	asn	glt	arg	inserción	Explicación
3	<i>asnA</i>	MX614		+	-	-	-				transcripción dependiente de fuente de nitrógeno
4	<i>asnA</i>	MX902		+	++	++	-				des-regulación por ausencia de <i>glnG</i>
5	<i>asnB</i>	MX614		++	+		-	+			transcripción dependiente de fuente de nitrógeno
6	<i>asnB::MudII1734</i>	MX4003								+	inserto presente
7	crecimiento	MX614		+++							requerimiento por cys
		MX4003		+++							
8	[cys]	MX4003	36mg/ml	++++	+++	++++	+++				relación [cys] vs. Crecimiento
			1.8mg/ml	+++	++	+++	++				
9	<i>Aut</i>	MX614		++++					++++		fenotipo <i>Aut-</i>
		MX4003	cys 36mg/ml						-		
			cys 1.8mg/ml	+++							
10	<i>AsnA</i>	MX614		+	-	-	-				<i>asnA</i> trata de suplir a <i>asnB</i>
		MX4003		+	+	++	-				
Tabla I	β -galactosidasa	MX4003	aeróbica	++++	++	++++	+				Transcripción dependiente de fuente de nitrógeno y de [de oxígeno]
			anaeróbica	+	+	+	-				No hay efecto
Tabla II	GDH	MX614		++++	++	++++	+				
		MX4003		++++	++	++++	+				
Tabla III	GOGAT	MX614		++++	+	++++	+				Disminución en MX4003
		MX4003		+	+	+	+				
Tabla IV	GS	MX614	aeróbica	+	++++	++++	++++				Disminución en MX4003 en aerobiosis,
			anaeróbica	+	++	++	++				MX614 y MX4003 disminuyen en aerobiosis.
		MX4003	aeróbica	+	++	++	++				
			anaeróbica	+	++	++	++				

DISCUSIÓN

En la cepa silvestre de *Escherichia coli* MX614 se encontró por medio de un ensayo de hibridación ARN-ADN tipo Northern que *asnA* sólo se transcribe a niveles detectables en la condición de exceso de amonio (Figura 3) y no así en las condiciones de limitación de nitrógeno (glutamina, limitación de amonio) y asparagina.

Dado que se había reportado con anterioridad la existencia de una posible regulación entre el producto de *glnG* y la síntesis de asparagina en *K. aerogenes* (Reitzer, et. al., 1982); se planteó la hipótesis de que dicho fenómeno podría observarse de igual manera en *E. coli*. Al analizar la transcripción del gen *asnA* en una cepa *glnG* de *E. coli*, observamos que había una des-regulación de la transcripción del gen *asnA* en ausencia de *glnG* (Figura 4). La transcripción de *asnA* en exceso de amonio se mantiene; sin embargo, a diferencia de lo observado en la cepa silvestre, se encontró transcrito en las condiciones de glutamina y limitación de amonio; lo que permite sugerir que de alguna forma el producto del gen *glnG* está reprimiendo la expresión de *asnA*. Debemos mencionar, de manera sobresaliente, que los transcritos observados en las condiciones de glutamina y limitación de amonio (Figura 4, carril 1) son más abundantes en comparación a la cantidad encontrada en la cepa silvestre. Este resultado sugiere, que la ausencia de NR_I no sólo podría estar desreprimiendo la transcripción de *asnA* en limitación de amonio y glutamina, sino que su ausencia probablemente activa de alguna manera la transcripción del mismo.

Sin embargo, se sabe que en la región promotora del gen *asnA* de *E. coli* no se encuentra ninguna secuencia consenso para la unión de NR_I (producto de *glnG*); lo cual nos hace pensar que probablemente la regulación que ejerce NR_I sobre *asnA* podría ser de forma indirecta, tal vez actuando sobre la transcripción de *asnC*, y este último sobre *asnA*. Por otro lado, en la secuencia del promotor de *asnC* tampoco se encuentra un sitio de unión para NR_I, por lo que el efecto observado sobre *asnA* por la mutación en *glnG* tiene que estar dado por otra proteína relacionada con NR_I. Para tal efecto la proteína Nac que se transcribe o activa gracias a la presencia de NR_I, podría estar involucrada en este fenómeno, dado que es una proteína que activa y reprime la transcripción de genes involucrados con la asimilación y metabolismo de algunos compuestos nitrogenados. El análisis de la secuencia de la región reguladora de *asnA-asnC* mostró una secuencia que se parece a la secuencia consenso para la unión de Nac (Figura 11). Para saber si en realidad este último es directamente el responsable, podríamos en una mutante *nac* ver el fenotipo presente en esta cepa con respecto a *asnA*. Estos son experimentos que no hemos realizado pero que están contemplados en un futuro cercano.

Se usó la cepa *asnB::MudI*, la cual fusiona *lacZ* al promotor de *asnB*, la cual se denominó MX4003 (Figura 6). Con esta se realizó un ensayo tipo Northern revelado para *asnA* (Figura 10). Podemos ver en dicha figura el aumento evidente de la transcripción en la condición de glutamina, situación en la que normalmente no hay ningún transcrito. Esto nos dice que la falta de *asnB* está siendo compensada por *asnA*, aunque el dato que tenemos no es cuantitativo, el aumento en la densidad de la banda en glutamina aparenta ser aproximadamente dos veces mayor que la banda de exceso de amonio. La

activación de *asnA* en ausencia de *asnB* puede ser mediada simplemente por la concentración de asparagina intracelular.

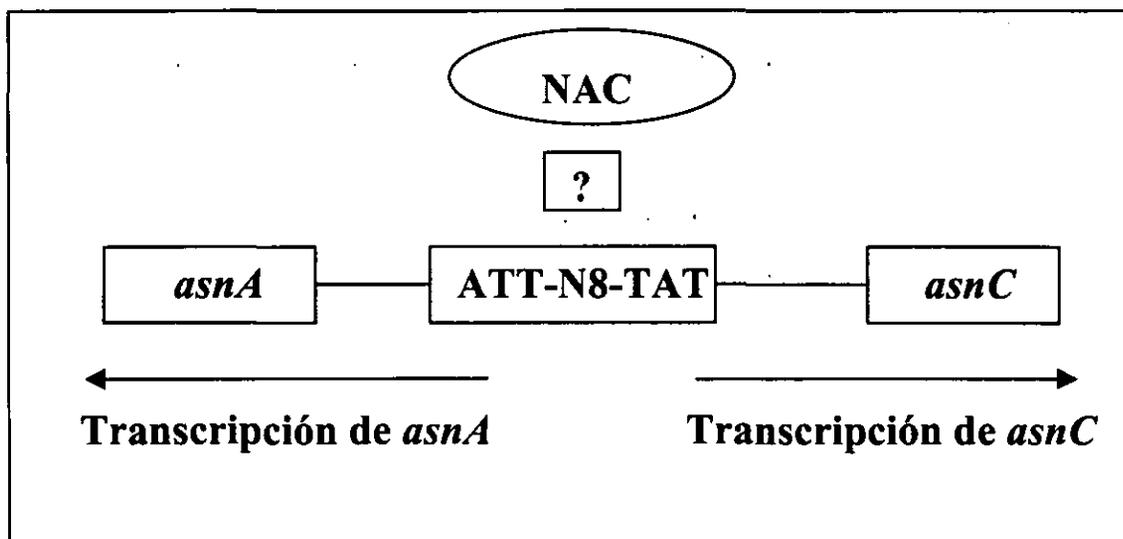


Figura 11.- Probable sitio de unión a NAC en el promotor de *asnC*.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

El nivel de transcripción del gen *asnB* se midió por medio del gen reportero *lacZ* en la cepa MX4003. Se encontró (Tabla I), que *asnB* se transcribía tanto en exceso de amonio como en glutamina. Sorprendentemente los resultados obtenidos en exceso de amonio contrastan con lo previamente reportado tanto en *E. coli* como en *K. aerogenes* (Reitzer, et. al., 1982, Felton, et. al., 1980); donde se estableció que en dicha condición, la enzima activa era exclusivamente la AsnA. Una posibilidad para explicar la discrepancia en los resultados en la condición de exceso de amonio, podría ser la existencia de una fuerte demanda de asparagina para la síntesis de proteínas que AsnA no pudiera subvencionar, por lo que AsnB tendría que actuar en esta misma condición. Esto llevaría a una mayor activación de *asnB*. Sería interesante por

lo tanto medir las pozas de asparagina en diferentes fuentes de cultivo y en diferentes fondos genéticos.

Una explicación alternativa puede estar dada por la regulación de la poza de glutamina intracelular, es decir, la elevada transcripción de *asnB* en exceso de amonio puede ser una forma de regular la concentración de glutamina dentro de la célula, ya que en exceso de amonio la relación glutamina/ α -cetoglutarato favorece a glutamina, por lo tanto la actividad de *asnB* puede ser importante para mantener la poza de este aminoácido a niveles adecuados. El aumento de la transcripción en exceso de amonio se corroboró por medio de un ensayo Northern Blot de la cepa silvestre revelado con una sonda específica para *asnB* (Figura 5, carril 4).

Con respecto a la regulación de las enzimas GS, GDH y GOGAT en la cepa mutante *asnB* observamos que la actividad de GDH, no presentó variación alguna con respecto a la cepa silvestre bajo ninguna de las condiciones de crecimiento ensayadas (Tabla II).

En cuanto a GOGAT, su actividad disminuye aproximadamente cuatro veces en las condiciones de exceso de amonio y glutamina (Tabla III), condiciones en las que la cepa silvestre presenta una actividad elevada de GOGAT. La razón por la cual existe una des-regulación de la enzima GOGAT, pudiese ser, debido a que *AsnB* incide -de alguna forma- en la actividad de GOGAT. Otra opción sería que la ausencia de *AsnB* provocara una disminución de asparagina (que hipotéticamente *asnA* no podría compensar) y por lo tanto desencadenara la respuesta estricta, induciendo una disminución en la actividad de GOGAT.

En cuanto a la actividad de GS, se observó una disminución de aproximadamente la mitad de la actividad en limitación de amonio, glutamina y asparagina (Tabla IV); todas ellas en condiciones en las cuales GS se encuentra muy activa, normalmente. Esto nos dice que la ausencia de *asnB* afecta la actividad de GS en las condiciones de limitación de nitrógeno aeróbicas. La razón por la cual la actividad de GS se encuentra baja en estas condiciones, puede deberse a la baja actividad de GOGAT de esta misma cepa, tal vez debida -como ya habíamos dicho- a la activación de la respuesta estricta. En este sentido sería interesante elucidar si la expresión de *gltD* y *gltF* en la cepa MX4003 permiten la inducción de GS, tal y como ocurre en las cepas *gltB225:: Ω /gltD⁺F⁺* (MX3002/pPRSP24) (Castaño, et al., 1992).

La cepa MX4003 presenta fenotipo *Aut-* (Figura 9) lo cual concuerda con lo encontrado por Reitzer para *K. aerogenes* (1982). Además esta cepa presenta braditrofia por cisteína. Se ve en la Figura 8 la dependencia de la cepa por cisteína para crecer, además de que la rapidez de crecimiento del cultivo depende de la concentración de cisteína en el medio. Estas características desaparecen cuando la cepa mutante es crecida en condiciones anaeróbicas donde sin ningún requerimiento adicional crece igual que la cepa silvestre.

Ludmil, B. Et. al., (1996) reportaron que la braditrofia por cisteína estaba relacionada con la ausencia de uno o de ambos genes *sodA* y *sodB*, los cuales codifican para las proteínas superóxido dismutasa dependiente de Mn y la superóxido dismutasa dependiente de Fe. Se ha visto, que el aparente requerimiento por cisteína puede deberse a que los radicales del oxígeno

debilitan la pared de la bacteria, impidiendo la acumulación intracelular de ácidos sulfónicos α -hidroxilados que son necesarios para la síntesis de cisteína (Ludmil, et. al., 1997).

Por otro lado, también se ha visto que en condiciones de oxígeno hiperbárico la ausencia de algunos aminoácidos -tales como asparagina-, en el medio provocan un alto estado de estrés oxidativo (Draczynska-Lusiak, et. al., 1994). Por otro lado sabemos que la cisteína así como el glutatión, tienen el poder de reducir el estado de óxido reducción de las células expuestas al mismo (Grant, et. al., 1995). Con estos antecedentes podemos plantear la hipótesis de que como la mutante *asnB* es incapaz de sintetizar suficiente asparagina, se encuentra en un estado de oxidación elevado, que resulta tóxico para las células. Por esta razón al agregar nosotros cisteína al medio estamos ayudando a contrarrestar dicho estado, y por lo tanto favoreciendo su crecimiento. Esta hipótesis explicaría el hecho de que en anaerobiosis la cepa *asnB* no requiere cisteína para crecer. Sabemos que la inserción de la mutación de *asnB* por la inserción del *MudII734* no es el que causa este efecto ya que la mutación puntual de este gen también suprime la capacidad de crecer sin cisteína en esta cepa.

Se midió la actividad de β -galactosidasa en la cepa MX4003 en anaerobiosis. En dicho experimento se observó una severa reducción de la actividad de esta enzima en cualquiera de las fuentes de nitrógeno probadas, estableciendo que *asnB* es transcrito a niveles muy bajos en estas condiciones (Tabla I). Con este resultado podemos decir, que la síntesis de asparagina vía asparagino sintetasa-dependiente de glutamina es dependiente de la concentración de oxígeno en el medio. Es probable que en condiciones

anaeróbicas *asnA* sea la enzima encargada de proveer a la célula con asparagina. Alternativamente, el bajo nivel de *asnB*, detectado por el ensayo, podría ser suficiente para sustentar el crecimiento celular en esta condición. Esta última hipótesis podría dilucidarse obteniendo una cepa *asnA* y viendo su capacidad o incapacidad de crecer en anaerobiosis.

Finalmente, cabe resaltar que la actividad de GS en anaerobiosis siempre es baja como vemos en el experimento de la Tabla IV; es decir, la actividad de GS en condiciones anaeróbicas es igual de baja tanto en la cepa silvestre como en la cepa mutante (Tabla IV). Es importante hacer notar que la actividad que muestran las dos cepas se parece mucho a las actividades de la cepa MX4003 en aerobiosis (Tabla IV, segundo renglón), por lo que podríamos considerar que el efecto descrito para la actividad de GS en la cepa MX4003 en aerobiosis, es causado por la ausencia de *asnB*, ya que cuando se elimina de forma natural la expresión de *asnB* (cultivo en anaerobiosis de la cepa silvestre), se ve exactamente el mismo fenotipo para GS que en la cepa MX4003. No descartamos la posibilidad, de que lo que estemos viendo en el caso de la anaerobiosis fuera la actividad normal de GS adaptada a estas condiciones de crecimiento y que nada tenga que ver con *asnB*.

CONCLUSIONES

- La transcripción de *asnA* y *asnB* de *Escherichia coli* varía según la calidad y cantidad de la fuente de nitrógeno.
- La falta del gen *glnG* produce en *Escherichia coli* la des-regulación del gen *asnA* en fuentes limitantes de nitrógeno.
- La ausencia de *asnB* en *Escherichia coli* provoca un aumento en la expresión de *asnA* en las condiciones de crecimiento de limitación de nitrógeno.
- La ausencia del gen *asnB* da como resultado un fenotipo *Aut⁻* y braditrofia por cisteína.
- La ausencia de *asnB* no tiene ningún efecto sobre la actividad de la enzima GDH, pero sí sobre la actividad de la enzima GS y de GOGAT disminuyendo su actividad. En el caso de GS la actividad disminuye en un 50% y en el caso de GOGAT su actividad disminuye 10 veces, con respecto a la cepa silvestre (MX614).
- El nivel de expresión de *asnB* es afectado por la presencia o ausencia de oxígeno en el medio.

BIBLIOGRAFÍA

- Bender, R. A. 1991. The role of the NAC protein in the nitrogen regulation of *Klebsiella aerogenes* (Micro Review). *Molecular Microbiology*. 5(11): 2575-2580.
- Bender, R. A., Macaluso, A., Magasanik, B. 1976. Glutamate deshydrogenase: Gentic mapping and isolation of regulatory mutants of *Klebsiella aerogenes*. *Journal of Bacteriology*. 127: 141-148
- Benov Ludmil , Irwin Fridovich. 1997. Superoxide Imposes Leakage of Sulfite from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 347(2) Nov:271-274.
- Benov Ludmil, Nicholas m. Kerdich, Irwin Fridovich. 1996. The Mechanism of the Auxotrophy for Sulfur-containing Amino Acids Imposed upon *Escherichia coli* by Superoxide. *The Journal of Biological Chemistry*. 271(35):21037-21040.
- Beste, E. A., Bender, R. A. 1990. Cloning of the *Klebsiella aerogenes nac* gene, which encodes a factor required for nitrogen regulation of the histidine utilization (*hut*) operons in *Sallmonela typhmurium*. *Journal of Bacteriology*. 172: 7043-7048.
- Boehlein. S. K., Richards, N. G. J., Schuser, S. M. 1994. Glutamine dependent nitrogen transfer in *Escherichia coli* asparagine synthetase B. *The Journal of Biological Chemistry*. 269: 7450-7457.
- Brandi, G., Iorena Luzzi, Aolo Giacomoni, Amedeo Albano, Flaminio Cattabeni, Orazio Cantoni. 1992. Differential effect of the amino acid cystine in cultured mammalian and bacterial cells exposed to oxidative stress. *Mutation Research*. 281(1992):157-161.
- Castaño, I., Bastarrachea, F., Covarrubias, A., 1988. gltBDF Operon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 270 (2): 821-827.
- Castaño, I., Flores, N., Valle, F., Covarrubias, A., Bolivar, F. 1992. gltF, a member of the glt bdf operon of *Escherichia coli*, is involved in nitrogen-regulated gene expression. *Molecular Microbiology*. 7(18): 2733-2741.
- Cedar, H., Schwartz, J. H. 1969. The Asparagine Synthtase of *Escherichia coli*. I.- Biosynthetic role of the enzyme, purification and characterization of the reaction products. *The Journal of Biological Chemistry*. 244(15):4112-4121.
- Cedar, H., Schwartz, J. H. 1969. The Asparagine Synthtase of *Escherichia coli*. II.- studies on mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*. 244(15):4122-4127.
- Draczynska-Lusiak, B., Brown, O. R. 1994. Asparagine synthetase: an oxidant-sensitive enzyme in *Escherichia coli*. *Microbios*. 77:141-152.

- Felton, J., Michaelis, S., Wright A. 1980. Mutations in two unlinked genes are required to produce asparagine auxotrophy in *Escherichia coli*. 142: 221-228.
- Feng, J., Goss, T. J., Bender, R. A., Ninfa, . J. 1995. Repression of the *Klebsiella aerogenes nac* promoter. Journal of Bacteriology. 177: 5535-5538.
- Feng, J., Goss, T. J., Bender, R. A., Ninfa, A. J. 1995. Activation of transcription initiation from the *nac* promoter of *Klebsiella aerogenes*. Journal of Bacteriology. 177: 5223-5534.
- Grant, Christ M., Fiona, H. MacIver, Ian W. Dawes. 1996. Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet. 29:511-515.
- Helling, R. B. 1994. Why does *Escherichia coli* have two primary pathways for synthesis of glutamate?. Journal of Bacteriology.170(15):4664-4668.
- Humbert, R., Simoni, R. D. 1980. Genetic and biochemical studies demonstrating a second gene coding for asparagine synthetase in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 142: 212-220.
- Imlay, J. A., Irwin Fridovich. 1991. Isolation and genetic analysis of a mutation that supresses the auxotrophies of superoxide dismutase-deficient *Escherichia coli* K12. Mol Gen Genet. 228:410-416.
- Kölling, R., Lothar, H. 1985. AsnC: an autogenously regulated activator of asparagine synthtase A transcription in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 164: 310-315.
- Lowry, O. H., N.J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193:265-275.
- Macaluso, A., Best, E. A., Bender, R. A. 1990. Role of the *nac* gene product in the nitrogen regulation of some NTR-regulated operons of *Klebsiella aerogenes*. Journal of Bacteriology. 172: 7249-7255.
- Magasanik, B. 1982. Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria, Annu. Rev. Genet. 16:135-168.
- Magasanik, B. 1993. The regulation of nitrogen utilization in enteric bacteria, Journal of Cellular Biochemistry. 51:34-40.
- Magasanik, B. 1998. Reversible phosphorylation of an enhancer binding protein regulates the transcription of the bacterial nitrogen utilization genes. TIBS. 13:475-479.
- Magasanik, B. 1998. Regulation of nitrogen Utilization. p. 1344-1356. Salmonella, *Escherichia coli*.

McFarland, N., McCarter, L., Artz, S., Kutsu, S. 1981. Nitrogen regulatory locus "*glnR*" of enteric bacteria is composed of cistrons *ntrB* and *ntrC*: Identification of their protein products. Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 2135-2139.

Merrick, M. J., Edwards, R. A. 1995. Nitrogen Control in Bacteria. Microbiological Reviews. 59(4): 604-622.

Mitchel Singer, Tania A. Baker, Gavin Schnitzler, Shawn M. Beischel, Manju Goel, William Dove, Kathryn J. Jaacks, Alan D. Grossman, James W. Erickson, Carol A. Gross. 1989. A collection of strains containing genetically linked alternating antibiotic resistance elements for genetic mapping of *Escherichia coli*. Microbiological Reviews. Mar, 53(1):1-24.

Muse, W. B., Bender, R. A. 1998. The *nac* (nitrogen assimilation control) gene from *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 180: 1166-1173.

Nakamura, M., Yamada, M., Hirota, Y., Sugimoto, K., Oka, A., Takanami, M. 1981. Nucleotide Sequence of the *asnA* gene coding for Asparagine Synthetase of *E. coli* K-12. Nucleic Acids Res. 9(18), 4669-4676.

Nifa, A. J., Magasanik, B., 1986. Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 5909-5913.

Pompiosello, P., Jnaes, B. K., Bender, R. A. 1998. Two roles for the DNA recognition site of the *Klebsiella aerogenes* nitrogen assimilation control protein. Journal of Bacteriology. 180: 578-585.

Reitzer, L. J. 1998. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, y D-alanine. p.391-407. Salmonella, *Escherichia coli*.

Reitzer, L. J., B. Magasanik. 1982. Asparagine synthetases of *Klebsiella aerogenes*: properties and regulation of synthesis. J. Bacteriol. 151: 1299-313.

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

Richards, N. G. J., Schuster, S. M. 1992. An alternative mechanism for the nitrogen transfer reaction in asparagine synthetase. FEBS. 313: 98-102.

Ronald W. Davis, David Bostein, John R. Roth. 1980. Appendix 2, Diagnosis of Auxotrophs (Auxanography), pp. 207-210, Advanced Bacterial Genetics, a manual for genetic engineering. Cold Spring Harbor Laboratory

Rosenfeld, S. A., Brenchley, J. E. 1980. Regulation of nitrogen utilization in *hisT* mutants of *Salmonella typhimurium*. Journal of Bacteriology. 143: 801-807.

Scofield, M. A., Lewis, W. S., Schuster, S. M. 1990. Nucleotide Sequence of *Escherichia coli asnB* and Deduced amino acid sequence of asparagine synthetase B. *The Journal of Biological Chemistry*. 265: 12895-12902.

Schwacha, A., Bender, R. A. 1993. The product of the *Klebsiella aerogenes nac* (nitrogen assimilation control) gene is sufficient for activation of the hut operons and repression of the *gdh* operon. *Journal of Bacteriology*. 175: 2116-2124.

Shiau, S.-P., Schneider, B. L., Gu, W., Reitzer, L. J. 1992. Role of nitrogen regulator I (NtrC), the transcriptional activator of *glnA* in enteric bacteria, in reducing expression of *glnA* during nitrogen-limited growth. *Journal of Bacteriology*. 174: 179-185.

Siau, S.-P., Chen, P., Reitzer, L. J. 1993. Effects of the insertion and deletions in *glnG* (*ntrC*) of *Escherichia coli* on nitrogen Regulator I-dependent DNA binding and transcriptional activation. *Journal of Bacteriology*. 175: 190-199.

Ueno-Nishio, S., Mango, S., Reitzer, L. J., Magasanik, B. 1984. Identification and regulation of the complex *gln ALG* operon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 160: 379-384.