

LA REPRESIÓN CATABÓLICA Y NarG COMO POSIBLES REGULADORES EN LA BIOSÍNTESIS DEL MOLIBDOCOFACOR DE *Escherichia coli* K12

Mariemma Ortega de López

Laboratorio Organización y Expresión del Gen. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela. E-mail: mol@ciens.ula.ve

Resumen

En *Escherichia coli* K12, la represión catabólica y la región nar regulan globalmente operones inducidos por anaerobiosis. En la respiración anaeróbica del nitrato, estudios previos evidenciaron a la glucosa como regulador del operón moa, que participa en la biosíntesis del molibdocofactor, MoCo, de la Nitrato Reductasa (NRA). Para identificar el papel regulador del operón narC(GHJI) y el AMPc se construyeron cepas isogénicas sólo presentando la fusión genómica (*moa::lac*)₂₅, o con mutaciones adicionales. La expresión de la fusión fue evaluada determinando la biosíntesis de la Gal, codificada por el gen lacZ fusionado al promotor Pmoa, en cultivos crecidos con medio sintético durante una noche. La presencia de una mutación *cya* disminuyó parcialmente los niveles de actividad específica Gal. Por el contrario, la mutación narC-8 resultó en la incapacidad de sintetizar Gal, en cepas *cya+* y *cya*. Este efecto no fue eliminado por crecimiento bajo condiciones de inducción del operón narC. El AMPc exógeno no abolió los efectos de la glucosa ni de la mutación narC-8. Los resultados apoyan la participación de más de un control positivo que actuaría regulando la expresión transcripcional del operón moa, y en consecuencia afectarían la biosíntesis del MoCo.

Palabras claves: *moa*; molibdocofactor; *cya*; represión catabólica; AMPc ; *nar*; *mol*; *Escherichia coli*

Abstract

The catabolite repression and narg as possible regulators in the molybdocofactor biosynthesis of *Escherichia coli* K12

In *Escherichia coli* K12, catabolite repression and nar region globally regulate operons induced by anaerobiosis. In the nitrate anaerobic respiration, previous studies evidenced to the glucose as regulator of the moa operon, which participates in the molybdocofactor biosynthesis, MoCo, of the nitrate reductase (NRA). To identify the regulator role of the narC(GHJI) operon and the cAMP, were constructed isogenic strains carrying either the (*moa::lac*)₂₅ genomic fusion, or plus additional mutations. The fusion expression was evaluated determining the Bgal biosynthesis, encoded by the gen lacZ united to the Pmoa promoter, in culture overnight growing with minimal medium. The presence of a *cya* mutation partially decreased the specific Gal activity levels. In contrast, a narC-8 resulted in the inability to synthesize Gal, in both *cya+* and *cya* strains. This effect was not eliminated by growing under conditions that induce the narC operon. The exogenous cAMP either did not abolish the glucose nor narC-8 mutation effects. The results support the participation of more than one positive control that should act on the transcriptional expression of the moa operon, in consequence it should affect the MoCo biosynthesis.

Key words: *moa*; molybdocofactor; *cya*; catabolite repression; cAMP; *nar*; *mol*; *E. coli*.

INTRODUCCIÓN

El fenómeno conocido como "efecto glucosa", frecuentemente se ha referido como represión catabólica, porque reprime la expresión de operones catabólicos inducibles, en respuesta a la presencia de un carbohidrato eficiente como es la glucosa (Dobrogosz 1965, Saier 1991, Botsford y Harman 1992). No obstante, muchos operones con funciones distintas, también son susceptibles a ese efecto (Jamieson et al. 1986, Uden y Duchene 1987, Bremer et al. 1988, Schultz et al. 1988, Saier 1991, Botsford y Harman 1992). El AMPc y su proteína receptora CRP (CAP) median la represión

catabólica, pero hay evidencias en microorganismos procariotas y eucariotas, sobre la participación de una diversidad de otros mecanismos reguladores (Saier 1991, Botsford y Harman 1992). El crecimiento a expensas de glucosa, disminuye los niveles intracelulares de AMPc, reduciendo la expresión de los operones catabólicos inducibles; el efecto es más drástico por mutaciones en alguno de los genes, bien sea *cya* (codifica la adenilato ciclasa, que cataliza la síntesis del AMPc) o *crp* (codificada la proteína CRP), pero cuando los operones no están relacionados directamente con el metabolismo energético, conservan un nivel sustancial de actividad basal de sus funciones (Saier 1991, Botsford y Harman

1992). El crecimiento anaeróbico elimina, parcial o totalmente, la represión catabólica en *E. coli*, mientras que la reducción anaeróbica del nitrato o nitrito la elimina totalmente (Dobrogosz 1965). La concentración intracelular de AMPc es mayor cuando las células crecen con limitaciones de oxígeno, bajo condiciones de fermentación o respiración anaeróbica (Unden y Duchene 1987). El AMPc juega un papel regulador importante en el catabolismo anaeróbico y posiblemente participa en otra función adicional a la de ser activador de la proteína CRP (Botsford y Harman 1992). Por su parte, el nitrato, el molibdato, el gen *frd* y ciertos genes *nar* regulan la transcripción de genes y operones que participan en la respiración anaeróbica del nitrato; también actúan como reguladores globales en otras funciones de oxidorreducción, que son inducibles anaeróbicamente (Griffiths y Cole 1987, Unden y Duchene 1987, Kalman y Gunsalus 1988, Li y Demos 1988, Spiro y Guest 1990, Chiang et al. 1992; Rabin y Stewart 1992, Walker y DeMoss 1993 y 1994, Schroder y Darie 1993, Stewart 1993, Green y Guest 1994, Rosentel et al. 1995).

En *E. coli*, la Nitrato Reductasa A (NRA) cataliza la reducción del nitrato a nitrito, acoplada a un proceso de respiración anaeróbica (Stewart 1988). El operón *narC*(GHJI) codifica la apoNRA (Bonney-Orth et al. 1981, Stewart y MacGregor 1982, Sodergren y DeMoss 1988). Los genes *mol* (*moa*, *mob*, *mod*, *moe*, *mog* y *molR*) (Puig y Azoulay 1967, Miller y Amy 1982, Bachman 1990, Lee et al. 1990, Shanmugan et al. 1992) determinan la biosíntesis y procesamiento de un molibdocofactor, MoCo, requerido para la activación de la NRA, además de otras reductasas y enzimas deshidrogenasas, que también participan en procesos de oxidorreducción anaeróbicos (Miller y Amy 1982, Miller et al. 1987; Stewart 1988, Santini et al. 1989, Rajagopalan y Johnson 1992, Iobbi-Nivol et al. 1995, Maupin-Furrow et al. 1995, Rosentel et al. 1995).

Se requieren productos codificados por el operón *moa*(A-E) (Rivers et al. 1993) son requeridos para la síntesis de molibdopterina (MPT), en las etapas iniciales del proceso biosintético del MoCo (Johnson y Rajagopalan 1987, Stewart 1988, Pitterle y Rajagopalan 1989). Se han obtenido conocimientos sobre la regulación del operón *moa* estudiando la expresión de mutaciones de fusión, traduccional (Baker y Boxer 1991) y transcripcional. En este último caso, se observó que la cinética de expresión de una fusión (*moa::lac*)₂₅ mostró similitud con fenómenos de oscilaciones biológicas (Sassone-Corsi 1994) y posiblemente funciones del metabolismo celular están actuando como moduladores (Ortega de L 1985,1993-1996); las expresiones aeróbica y anaeróbica de la fusión fueron sensibles a las represiones transitoria y catabólica por glucosa (Ortega de L 1985,1994,1996), y

el AMPc exógeno sólo antagonizó parcialmente dicho efecto (Ortega de L 1993 y 1995).

En vista de lo anterior, fue considerado de importancia estudiar la regulación del operón *moa* de *E. coli*, evaluando el posible efecto de la región *nar+* y determinando el papel del AMPc como mediador en la represión catabólica por glucosa. En el presente trabajo, ambos factores se analizaron comparativamente sobre la expresión de una fusión transcripcional (*moa::lac*)₂₅, utilizando cepas isogénicas con la simple fusión y adicionalmente con las mutaciones *narC-8* y/o *cya*, construidas por transducción; la presencia de *Gal*, codificada por el gen *lacZ* fusionado al promotor *Pmoa*, fue detectada en presencia y ausencia de AMPc, mediante ensayos enzimáticos e inmunológicos.

METODOLOGÍA

1. Cepas utilizadas. Las cepas bacterianas de *E. coli* y de fagos están relacionadas en la Tabla 1. Se construyeron cepas bacterianas isogénicas derivadas inicialmente de la M120, que fue seleccionada por presentar marcadores genéticos apropiados, ligados a mutaciones en genes de interés. Las características de esas mutaciones son las siguientes:

a) *cya*, ligada a la región *ilv* (Bachman 1990), es una delección del gen estructural de la enzima adenilato ciclasa y el fenotipo es pleiotrópicamente negativo para el metabolismo de los azúcares, excepto la glucosa (Brickman et al. 1973);

b) *narC-8*, ligada en un 20 % a la región *trp* (Puig et al. 1969, Bachman 1990); es una mutación espontánea seleccionada como ChlR, conservó el 2,5% de la actividad específica NRA encontrada en a cepa silvestre, mientras que los niveles de actividad Formiato Hidrógeno Liasa (FHL) y Fumarato Reductasa no fueron afectados (Puig y Azoulay 1967), como tampoco la capacidad de asociar el ión molibdeno (Dubourdiou et al. 1976).

c) (*moa::lac*)₂₅, ligada en un 20% a la región *gal* (Ortega de L 1985, Bachman 1990), es una fusión transcripcional obtenida por mutagénesis biológica (Ortega de L 1982) con el fago Mud1(Casadaban y Cohen 1979) y seleccionada como ChlR. Confirió el carácter Lac+, ocasionó el fenotipo pleiotrópico Gas- (sistema FHL) Nit- (respiración del nitrato) y la pérdida total de actividad NRA pero conservando la capacidad de utilizar el fumarato (Ortega de L 1982). La expresión de la fusión fue más eficiente en aerobiosis, es sensible a la represión por glucosa y respondió parcialmente al efecto antagonico del AMPc (Ortega de L 1985,1993-1996).

Tabla 1. Lista de cepas utilizadas

Todas las cepas son F- y λ -. Las que presentan el fenotipo TNC+ son Nit- y las TNC- Nit+ (Ortega de L 1994).

OEG = Laboratorio Organización y Expresión del Gen

Cepa	Genotipo / Fenotipo relevantes	Referencia o procedencia
<i>Escherichia coli</i> K12		
MA25	PC90 Φ (<i>moa::lac</i>)25 / Chl^R Lac+ TNC+ Gas-	M. Ortega de L 1982
LCB426	<i>thi-1 leu-6 suc-10 galT-27 rpsL-129 chlC-8 / Chl^R</i> Nit-	J. Puig et al. 1969
GC4622 (VE819)	Δ <i>cya his</i>	Inst. Pasteur
PK27	Prototrofa	Colecc. J. DeMoss
MC4100	Δ (<i>argFlac</i>) <i>lac-169 araD-139 rpsL-150 relA-1 pstF rbsR fibB</i>	Silhavy et al. 1984
M124	M120 [Δ (<i>lac pro ilv met his gal rpsL</i>) <i>trp+</i>]	M. Ortega de L.
M128	M124 Φ (<i>moa::lac</i>)25 / Gal+ TNC+ Nit- Gas- Lac+	Este trabajo
M121	M120 <i>narC-8 / Trp+</i> TNC+ Gas+	Este trabajo
M136	M128 Δ <i>cya / Ilv+</i>	Este trabajo
M141	M121 Φ (<i>moa::lac</i>)25 / Gal+ TNC+ Nit- Gas- Lac-	Este trabajo
M154	M141 Δ <i>cya / Ilv+</i>	Este trabajo
Fagos		
P1vir		Colecc. OEG
Mucts		Colecc. OEG

2. Condiciones de crecimiento y medios de cultivo. Las bacterias se cultivaron a 30° C. La aerobiosis (Aer) se realizó agitando en fias de 250 ml con 10 ml de medio y la anaerobiosis (Ana) por inoculación en tubos totalmente llenos con el medio, sin agitación; para la anaerobiosis estricta se utilizó el sistema gas-pak. La composición de los medios fue descrita (Ortega de L 1985 y 1994). Cuando fue necesario se agregó 50 (g/ml de ampicilina (Ap), 40 (g/ml de 5-bromo-4-cloro-3 indolil(-D-galactósido (X-Gal) y 10 mM de AMPc. Para el crecimiento en los medios sintéticos, se utilizaron 2 g/l de glucosa (Glu), galactosa (Gal) o lactosa (Lac), y 4 g/l de glicerol.

3. Ensayos fenotípicos y fisiológicos. Los requerimientos nutricionales, fermentación de azúcares, resistencia a drogas y sensibilidad a fagos fueron ensayados según descrito (Miller 1972). Los fenotipos mutantes Nit- (incapacidad de reducir fisiológicamente el nitrato a nitrito), Gas- (incapacidad de producir gas a través del sistema FHL) y TNC+ (colonias rojas de los mutantes

Nit-, por crecimiento en el medio TNC) fueron valorados según se indicó (Ortega de L 1982 y 1994).

4. Técnicas genéticas. La transducción generalizada mediada por el fago P1vir se realizó siguiendo el procedimiento de Lennox previamente descrito (Miller 1972), y según las condiciones indicadas (Ortega de L 1985).

5. Análisis por inmunotransferencia. Células cultivadas en medio LB (Miller, 1972) durante una noche, previamente lisadas y calentadas 1 min. fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida al 7,5% con SDS, según metodología descrita (Laemmli 1970). Luego, transferidas por electroforesis a una membrana de nitrocelulosa, donde se trataron con antisero contra *Gal* de *E. coli* obtenido a partir de conejos inmunizados, y el análisis fue realizado por la técnica de "Western blotting" (Towbin et al. 1979), bajo las condiciones descritas (Iobbi-Nivol et al. 1990); la reacción de inmuoadsorción se detectó por la técnica de ELISA, con anti-IgG conjugada a la perodixasa y el 4 alfa-naftol como sustrato (Sambrook et al. 1989).

6. Ensayos enzimáticos.

6.1. Actividad (galactosidasa (*Gal*)). Células cultivadas en medio sintético durante una noche, fueron tratadas con cloranfenicol (50 (g/ml), mantenidas en frío y luego permeabilizadas (SDS+cloroformo) al momento del ensayo; se siguió la hidrólisis del o-nitro fenil(-D-galactopiranosido (ONPG) y los valores se expresaron en términos de actividad total y Unidades Miller (Miller 1972), pero el crecimiento celular se medió utilizando A550.

6.2. Actividad específica NRA (Glu-NRA). Los nitritos acumulados en una noche de crecimiento, bajo condiciones de inducción, fueron estimados espectrofotométricamente (A540) (Puig y Azoulay 1967); las proteínas se determinaron según lo descrito (Markwell et al. 1978), y la actividad específica se expresó en mmoles nitritos/ml/mg proteínas.

RESULTADOS

Construcción y caracterización de cepas isogénicas (*moa::lac*)25. La construcción de cepas bacterianas isogénicas permite que, los factores objeto del presente estudio, sean evaluados y sus efectos analizados comparativamente sobre la base de un fondo genético común. Para ello, las mutaciones (*moa::lac*)25, *cya* y *narC-8*, cuyas características se describieron (Metodología), fueron cotransferidas por transducción con el fago P1vir, originando los derivados isogénicos siguientes:

1. M128, contiene la fusión transcripcional (*moa::lac*)25 cotransferida desde la cepa MA25 a la M124 por ligamiento con el marcador *gal+*. Se obtuvieron transductantes *Gal+* *TNC+* que presentaban las características de una fusión única y estabilizada: *Gas-Nit-*, ausencia total de actividad enzimática *NRA*, *Lac+* y habían perdido los fenotipos *Ts+* *ApR* *ImmMu+*, indicando una delección del extremo c terminal en el genoma del fago *Mud1*.

2. M136, contiene las dos mutaciones (*moa::lac*)25 *cya*. Esta última fue cotransferida desde la cepa GC4622 a la M128 por ligamiento con el marcador *ilv+*; su adquisición fue confirmada por la pérdida de las capacidades para crecer en medio sintético a expensas de glicerol, bajo anaerobiosis estricta (Jamieson et al. 1986), y de fermentar la galactosa. La permanencia de la fusión fue verificada porque los transductantes conservaron las características de la cepa receptora M128, excepto que, la mutación *cya* transferida ocasionó un retardo en la manifestación del fenotipo *Lac+* hasta después de 36 h de crecimiento en medio diferencial y a las 24 h con X-Gal.

3. M141, contiene las dos mutaciones (*moa::lac*)25 *narC-8*. Las mutaciones *moa-* confieren el fenotipo pleiotrópico *Gas- Nit-* (Puig y Azoulay 1967), en consecuencia fue necesario primeramente cotransducir la mutación *narC-8* desde la cepa LCB426 a la receptora M120, por ligamiento con el marcador *trp+*. Todos los transductantes *Trp+* *TNC+* presentaron las características esperadas: *Gas+* *Nit-* y un nivel residual de actividad enzimática *NRA*; uno de ellos se identificó como M121 y su nivel de actividad fue de 0,45 mmoles de nitritos/ml/mg proteínas, que respondió al 0,12 % de la cepa parental receptora (M120) y fue similar al valor de 0,40 mmoles de nitritos/ml/mg proteínas en la cepa parental donante (LCB426). La fusión (*moa::lac*)25 de la cepa MA25 fue luego cotransferida a la M121, por ligamiento con el marcador *gal+*; se obtuvieron transductantes *Gal+* con las características conferidas por la fusión de la cepa M128, pero en todos ellos la mutación *narC-8* ocasionó la pérdida del fenotipo *Lac+* en medio diferencial y un retardo muy prolongado de tres días para dar reacción positiva con X-Gal.

4. M154, contiene las tres mutaciones (*moa::lac*)25 *narC-8 cya*. Esta última fue cotransferida desde la cepa GC4622 a la M141 por ligamiento con el marcador *ilv+* y su adquisición fue confirmada al igual que en la cepa M136; todos esos transductantes conservaron las fenotipo *Lac-* se manifestara establemente, aún en presencia de X-Gal.

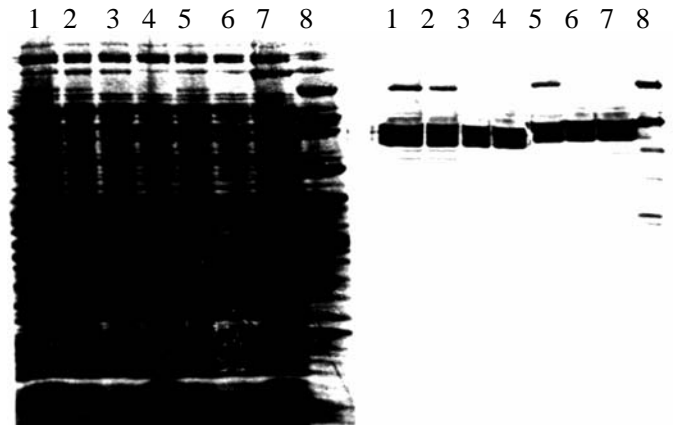


Figura 1. Análisis por inmunotransferencia (Foto del autor). Se utilizaron lisados celulares de las cepas a ensayar. (A) Electroforesis en gel (PAGE + SDS) de las muestras sin diluir. (B) Análisis por inmunotransferencia ("Western blotting") y detección por ELISA de la reacción de inmunoabsorción con el suero anti- β Gal. Los canales del 1 al 7 corresponden secuencialmente a las cepas: PK27 (control *Lac+*), M136 [Φ (*moa::lac*)25 Δ *cya*, *Lac+*], M141 [Φ (*moa::lac*)25 *narG-8*, *Lac-*], M154 [Φ (*moa::lac*)25 Δ *cya narG-8*, *Lac-*], M128 (Φ (*moa::lac*)25, *Lac+*), M154 [Φ (*moa::lac*)25 Δ *cya narG-8*, *Lac-*] y MC4.100 [Δ (*argF lac*), *Lac-*], el canal 8 representa la enzima β Gal purificada. La flecha indica la banda de dicha proteína en el gel PAGE (A) y la reacción de inmunoabsorción con suero anti- β Gal (B), respectivamente

Regulación de la expresión transcripcional de la fusión (*moa::lac*)25 en cepas isogénicas.

i. Influencia de las mutaciones *narC-8* y *cya*, bajo diferentes condiciones de aeración. Ambas mutaciones afectaron la manifestación del fenotipo *Lac+*, influyendo sobre la capacidad de fermentar la lactosa conferida por la fusión transcripcional (*moa::lac*)25. Por lo tanto, fue de interés cuantificar esos efectos, evaluando el crecimiento a expensas de lactosa y la presencia de *Gal*, codificada por el gen *lacZ* fusionado al promotor *Pmoa* (Tabla 2); esto último permitió estimar los niveles de expresión transcripcional de la referida fusión, considerando los valores de actividad enzimática *Gal*. Cuando la cepa bacteriana sólo contenía la mutación de fusión (M128), fue capaz de crecer a expensas de lactosa y alcanzar valores comparables a los del crecimiento con galactosa; los niveles acumulativos de expresión (Unidades Miller (*Gal*)) también fueron similares, e incrementaron alrededor de 3 veces en los cultivos anaeróbicos. Como era de esperar, la mutación secundaria *cya* (cepa M136), disminuyó en forma drástica el crecimiento celular a expensas de galactosa (Brickman et al. 1973) y lactosa, respectivamente. Los

niveles acumulativos de expresión de la fusión, considerando las unidades totales *Gal*, también se vieron marcadamente reducidos (alrededor de diez veces); sin embargo, al considerar las Unidades Miller, los niveles se redujeron levemente en aerobiosis y de 2-3 veces en anaerobiosis, respecto a la isogénica *cya+* (M128).

Tabla 2. Efectos de las mutaciones Δcya y *narC-8* sobre las expresiones aeróbica y anaeróbica de la fusión $\Phi(moa::lac)25$

^a Las cepas fueron crecidas en medio sintético durante una noche, bajo las condiciones indicadas. Los valores se expresaron como A550.

^b Los valores de actividad fueron calculados según se indicó (Miller 1972), pero el crecimiento fue referido como A550.

^c ND = no detectable

Cepas isogénicas $\Phi(moa::lac)25$		Crecimiento ^a Totales				Actividad βGal^b Unidades Miller			
		Azúcar		Aer		Aer		Ana	
		Aer	Ana	Aer	Ana	Aer	Ana	Aer	Ana
M128	Lac	0,85	0,28	750	1.300	882	4.643		
	Gal	0,95	0,30	890	1.250	937	4.167		
M136 Δcya	Lac	0,15	0,10	98	180	653	1.800		
	Gal	0,11	0,08	110	160	1.000	2.000		
M141 <i>narC-8</i>	Lac	0,02	0,01	ND ^c	ND	ND	ND		
	Gal	0,19	0,14	ND	ND	ND	ND		
M154 Δcya <i>narC-8</i>	Lac	0,01	0,01	ND	ND	ND	ND		
	Gal	0,50	0,14	ND	ND	ND	ND		

Igualmente a lo esperado, la mutación *narC-8* bien sea secundaria (cepa M141) o acompañada con (*cya* (cepa M154), ocasionó la incapacidad de crecer a expensas de lactosa, que se correspondió con la falta de expresión de la fusión, aún bajo condiciones de crecimiento a expensas de galactosa. Esta falta de expresión fue confirmada físicamente mediante ensayos de inmunotransferencia (Fig. 1), evidenciando un bloqueo en la expresión transcripcional de la fusión, al no poder detectarse reacción positiva de inmunoadsorción con un suero anti-*Gal*. ii. Influencias del nitrato y el AMPc exógeno. Como se refirió en la Introducción, el AMPc y el nitrato son reguladores globales importantes en el metabolismo anaeróbico. Además, este último es un inductor transcripcional del operón *narC* (Stewart 1988). El posible efecto del nitrato sobre la expresión de la fusión (*moa::lac*)25, fue evaluado cuantificando el crecimiento a

expensas de lactosa y los niveles acumulativos de actividad *Gal*; sin embargo, los resultados obtenidos (Tabla 3) no mostraron diferencias considerables, respecto a los observados en ausencia de nitrato (Tabla 2).

Tabla 3. Efectos de las mutaciones Δcya y *narC-8* sobre las expresiones aeróbica y anaeróbica de la fusión $\Phi(moa::lac)25$, en presencia de nitrato

^a Las cepas fueron crecidas en medio sintético durante una noche, bajo las condiciones indicadas. Los valores se expresaron como A550.

^b Los valores de actividad fueron calculados según se indicó (Miller 1972), pero el crecimiento fue referido como A550.

^c ND = no detectable

Cepas isogénicas $\Phi(moa::lac)25$	Crecimiento ^a Total				Actividad βGal^b Unidades Miller			
	Aer		Ana		Aer		Ana	
	Aer	Ana	Aer	Ana	Aer	Ana	Aer	Ana
M128	1,00	0,50	850	1.430	850	3.000		
M136 Δcya	0,13	0,08	100	150	769	1.875		
M141 <i>narC-8</i>	0,01	0,01	ND ^c	ND	ND	ND		
M154 Δcya <i>narC-8</i>	0,01	0,01	ND	ND	ND	ND		

Experimentos anteriores mostraron que la expresión de la fusión bajo estudio fue sensible a la represión por glucosa (transitoria y catabólica) y al efecto antagónico del AMPc exógeno (Ortega de L 1985,1993-1996). Para obtener mayor información sobre el papel del AMPc como mediador en la represión por glucosa, se escogieron condiciones experimentales donde la expresión de la fusión estuviese deprimida y bajo concentraciones imitantes de AMPc intracelular: anaerobiosis (Unden y Duchene 1987) y en presencia de la mutación conjunta *cya narC-8* (Cepa M154); se cuantificaron el crecimiento a expensas de glucosa y los niveles acumulativos de actividad (*Gal*) (Tabla 4). Como era de esperar, la glucosa no afectó drásticamente la expresión y el AMPc exógeno antagonizó dicho efecto en un 50%, en la cepa con la simple mutación de fusión (M128); sin embargo, este último no restituyó la expresión, siendo así incapaz de liberar el bloqueo ocasionado por la doble mutación

Tabla 4. Efectos de las mutaciones Δcya y $narC-8$, la glucosa y el AMPc sobre las expresiones aeróbica y anaeróbica de la fusión $\Phi(moa::lac)25$.

^a Las cepas se cultivaron en medio sintético durante una noche, bajo las condiciones indicadas. Los valores se expresaron como A550.

^b Los valores de actividad fueron calculados según se indicó (Miller 1972), pero el crecimiento fue referido como A550.

^c ND = no detectable

Los valores entre paréntesis corresponden al porcentaje de efecto ejercido por la represión catabólica y el antagonismo mediado por el AMPc exógeno, respectivamente.

Cepas isogénicas $\Phi(moa::lac)25$	Crecimiento ^a		Actividad β Gal ^b Unidades Miller
	AMPc	Aer	
M128	-	1,0	420 (50%)
	+	1,0	630 (75%)
M154 Δcya $narC-8$	-	0,68	ND ^c
	+	0,70	ND

DISCUSIÓN

Productos codificados por el operón *moa* participan en la biosíntesis de un MoCo, que es común a diferentes enzimas de oxidorreducción inducibles anaeróbicamente y, una de ellas, es la Nitrito Reductasa Respiratoria (NRA = apoNRA+ MoCo) (Stewart 1988). En experimentos anteriores se ha venido estudiando la regulación del operón *moa* de *E. coli* K12, cuantificando para ello la expresión de una fusión transcripcional (*moa::lac*)25 (Ortega de L 1982, 1985, 1993-1996). No obstante, para continuar con estos estudios se consideró conveniente trabajar con una línea de cepas isogénicas, ya que, diferencias en el genotipo pueden variar el grado de manifestación de los caracteres biológicos, y afectar el metabolismo celular. Cepas isogénicas fueron construidas por transferencia de mutaciones previamente caracterizadas, y todas ellas tenían en común la fusión transcripcional (*moa::lac*)25.

Papel de la represión catabólica y las condiciones de aeración.

La glucosa controla negativamente la expresión de la fusión transcripcional (*moa::lac*)25 y el complejo AMPc-CAP pudiera participar como un elemento de control positivo (Ortega de L 1985, 1993 y 1996).

Resultados experimentales aquí obtenidos confirmaron el efecto parcialmente represivo de la glucosa y el parcialmente antagonístico del AMPc exógeno, en una cepa que sólo contenía la simple mutación de fusión; resultados similares se han reportado comúnmente para funciones que no están relacionadas con el metabolismo de los azúcares (Jamieson et al. 1986, Unden y Duchene 1987, Bremer et al. 1988, Schultz et al. 1988, Saier 1991, Botsford y Harman 1992).

La participación del AMPc también se evidenció, en presencia de una mutación secundaria *cya* (defectiva en la síntesis de AMPc). Esa mutación redujo drásticamente el crecimiento y ocasionó una disminución sustancial en los niveles de expresión de la fusión, representada como Unidades totales *Gal*, pero el efecto fue parcial con respecto a las Unidades Miller. Estos resultados argumentan a favor de que el crecimiento celular afecta la expresión de la fusión (Ortega de L 1985, 1993-1996). En anaerobiosis, la concentración intracelular de AMPc es mayor que en aerobiosis (Unden y Duchene 1987). Similarmente, los niveles de expresión de la fusión fueron favorecidos de 2-3 veces, por crecimiento anaeróbico a expensas de lactosa o galactosa. Esto estaría acorde con la participación del AMPc como regulador.

Un incremento en la expresión anaeróbica frente a la aeróbica también fue reportado para fusiones traduccionales (*moa::lacZ*), no obstante, el factor fue alrededor de 28 veces (Baker y Boxer 1991). Por el contrario, cuando la simple fusión (*moa::lac*)25 se encuentra en la cepa prototrofa no isogénica OM86, la expresión aeróbica superó alrededor de 1.6 veces la anaeróbica. Un efecto muy similar a este último fue reportado para fusiones traduccionales en genes que participan en el transporte del molibdeno [fusiones (*mod::lacZ*)](Rosentel et al. 1995).

Estudios comparativos entre fusiones transcripcional y traduccional del operón *moa*, están siendo realizados para dilucidar las diferencias antes señaladas (Ortega de L 1994). Efectos mediados por la región *nar* y el nitrato. La respiración del nitrato juega un papel clave en la regulación global de funciones de oxidorreducción anaeróbicas; además el nitrato es un inductor transcripcional del operón *narC*(GHJI) (Griffiths et al 1987, Kalman y Gunsalus 1988; Li y Demos 1988, Spiro y Guest 1990, Chiang et al. 1992, Rabin y Stewart 1992, Walker y DeMoss 1993 y 1994, Schroder y Darie 1993, Stewart 1993, Green y Guest 1994, Rosentel et al. 1995). El presente trabajo permitió evidenciar la participación de la región *nar* sobre la expresión de la fusión transcripcional (*moa::lac*)25. Se obtuvieron pruebas enzimáticas e inmunológicas sobre el efecto sustancialmente negativo de una mutación secundaria *narC-8*, relacionado con la pérdida simultánea de actividad y el bloqueo en la biosíntesis de *Gal*, bajo el

control del promotor *Pmoa*. Este efecto drásticamente negativo no fue eliminado aún por crecimiento bajo condiciones fisiológicas de inducción máxima de la enzima NRA (anaerobiosis + nitrato). En conclusión, la mutación *narC-8* está ejerciendo un efecto pleiotrópico porque afectó tanto, la actividad NRA como la expresión de *moa*. Una liberación muy leve de ese efecto pudo observarse cuando las células se encontraban en fase estacionaria muy prolongada (después de las 72 h de incubación); sin embargo, ese valor residual de expresión detectable quedó totalmente eliminado cuando la mutación *narC-8* se encontraba conjuntamente con *cya* (cepa triple mutante M154) y el AMPc exógeno no fue capaz de restituirlo, indicando un efecto aditivo de ambas mutaciones. Las expresiones aeróbica y anaeróbica de la fusión bajo estudio fueron insensibles al control por nitrato (2 mM), igual a lo reportado para la cepa prototrofa no isogénica OM86 (Ortega de L 1985).

Metabolismo celular y expresión de *moa*.

Resultados anteriores, estudiando la expresión de la fusión transcripcional (*moa::lac*)²⁵, argumentaron a favor de que el metabolismo celular participa como un factor modulador de ese proceso: patrones de expresión similares a oscilaciones biológicas, así como la influencia ejercida por las condiciones de crecimiento (composición de los medios de cultivo, grado de aeración, edad del cultivo) (Ortega de L 1985, 1993-1996). Por lo tanto, se esperaba que el genotipo influyera sobre los niveles de expresión de la fusión, por tratarse de un factor importante que puede introducir variabilidad en el grado de manifestación de los caracteres biológicos y a nivel del metabolismo celular. De hecho en el caso de la respiración anaeróbica del nitrato en *E. coli*, se pueden citar los siguientes ejemplos: el grado de manifestación de mutaciones *mog* (anteriormente *chlG*) (Stewart 1988, Shanmugan et al. 1992), la expresión de fusiones transcripcionales (*moe::lac*) [anteriormente (*moe::lac*)] (Pascal et al. 1982, Shanmugan et al. 1992), y la variabilidad comúnmente observada en los niveles de actividad NRA en cultivos de cepas no isogénicas, crecidas bajo las mismas condiciones de inducción.

Resultados derivados del presente trabajo, también han permitido observar diferencias en los niveles de expresión de la fusión transcripcional (*moa::lac*)²⁵, entre la cepa M128 (Tabla y la prototrofa no isogénica OM86 (Ortega de L 1985, 1993-1996); en el primer caso, los niveles acumulativos son superiores y la expresión anaeróbica se vio favorecida frente a la aeróbica. Estas diferencias pudiesen ser atribuidas al metabolismo celular, así ambas cepas muestran variaciones notorias en sus cinéticas de crecimiento (datos no presentados). En un trabajo anterior se observó que el efecto antagónico del AMPc frente a la represión catabólica de la glucosa sobre la expresión de la

fusión sólo se hizo evidente cuando los cultivos alcanzaron la fase estacionaria tardía (Ortega de L 1993 y 1995); en este trabajo se observó que una mutación *cya* redujo drásticamente el crecimiento y disminuyó sustancialmente los niveles de expresión (Unidades Miller). Estos resultados están a favor de que la edad del cultivo y el crecimiento celular, respectivamente, son factores que influyen sobre la expresión del operón *moa*. Se puede suponer que la llamada regulación redox, anteriormente propuesta en la regulación de la NRA (Showe y Demos 1968), está asociada con el control de la expresión del operón *moa*, así como otros factores del metabolismo anaeróbico; la regulación redox, fue propuesta sobre la base de parámetros fisiológicos que participan en la regulación de varios aspectos de dicho metabolismo. Con base en esta última consideración, el efecto de la glucosa y el AMPc sobre la expresión del operón *moa*, pudiese ser explicado presumiendo que el metabolismo de la glucosa por se resultaría en un cambio de equilibrio de la regulación redox.

Las implicaciones del metabolismo celular como factor de regulación global sobre la respiración anaeróbica del nitrato, deben ser consideradas al momento de escoger las cepas bacterianas apropiadas para estudiar aspectos fisiológicos y de regulación relacionados con ese proceso respiratorio; igualmente, deben establecerse muy bien las condiciones de crecimiento (composición de los medios de cultivo, grado de aeración, edad del cultivo). Sólo de esa manera, se podrían realizar estudios comparativos entre los grupos de investigación.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. John DeMoss (Universidad de Texas, Houston, USA) y a su grupo de investigación, el apoyo técnico en los ensayos de inmunotransferencia. Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes por el financiamiento de la presente investigación.

REFERENCIAS

- Bachmann B.** 1990. Linkage Map of *Escherichia coli* K-12. Edition 8. Microbiol. Rev. 54: 130-197.
- Baker K, Boxer D.** 1991. Regulation of the *chlA* locus of *Escherichia coli* K12: Involvement of the molybdenum cofactor. Mol. Microbiol. 5: 901-907.
- Bonnefoy-Orth V, Lepelletier M, Pascal MC, Chipaux M.** 1981. Nitrate reductase and cytochrome b-nitrate reductase structural genes as parts of the nitrate reductase operon. Mol. Gen. Genet. 181: 535-540.
- Botsford J, Harman J.** 1992. Cyclic AMP in procaryotes. Microbiol. Rev. 56:100-122.

- Bremer E, Gerlach P, Middendorf A.** 1988. Double negative and positive control of *tsx* expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 170: 108-116.
- Brickman E, Soll L, Beckwith J.** 1973. Genetic characterization of mutations which affect catabolite-sensitive operons in *Escherichia coli* including deletions of the gene for adenylyl cyclase. J. Bacteriol. 116: 582-586.
- Casadaban M, Cohen S.** 1979. Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-*lac* bacteriophage: *in vivo* probe for transcriptional control signals. Proc. Natl. Aca. Sci. U.S.A. 76: 4530-4533.
- Chiang R, Cavicchioli R, Gunsalus R.** 1992. Identification and characterization of NarQ, a second nitrate sensor for nitrate dependent gene regulation in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 6: 1913-1923.
- Chippaux M, Bonnefoy-Orth V, Ratouchniack J, Pascal M-C.** 1981. Operon fusions in the nitrate reductase operon and study of the control gene *nir R* in *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 182: 477-479.
- Dobrogosz W.** 1965. The influence of nitrate and nitrite reduction on catabolite repression in *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta 100: 553-566.
- Dubourdiou M, Abdrade E, Puig J.** 1976. Molybdenum and chlorate resistant mutants in *Escherichia coli* K12. Biochem. Biophys. Res. Commun. 70: 766-773.
- Edwards E, Rondeau S, DeMoss J.** 1983. *chlC* (*nar*) Operon of *Escherichia coli* includes structural genes for and subunits of nitrate reductase. J. Bacteriol. 153: 1513-1520.
- Fimmel A, Haddock B.** 1979. Use of *chlC-lac* fusions to determine regulation of gene *chlC* in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 138: 726-730.
- Giordano G, Boxer D, Pommier J.** 1990. Molybdenum cofactor requirement for *in vitro* activation of apomolybdoenzymes of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 4: 645-650.
- Graham A, Jenkins H, Smith N, Mandrand-Berthelot M, Haddock B, Boxer D.** 1980. The synthesis of formate dehydrogenase and nitrate reductase proteins in various *fdh* and *chl* mutants of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 7: 145-151.
- Green J, Guest J.** 1994. Regulation of transcription at the *ndh* promoter of *Escherichia coli* by FNR and novel factors. Mol. Microbiol. 12: 433-444.
- Griffiths L, Cole J.** 1987. Lack of redox control of the anaerobically-induced *nirB+* gene of *Escherichia coli* K-12. Arch. Microbiol. 147: 364-369.
- Iobbi N, Palmer T, Whitty P, McNairn E, Boxer D.** 1995. The *mob* locus of *Escherichia coli* K-12 required for molybdenum cofactor biosynthesis is expressed at very low levels. Microbiol. 141: 1663-1671.
- Iuchi S, Lin E.** 1987. The *narL* gene product activates the nitrate reductase operon and represses the fumarate reductase and trimethylamine N-oxide reductase operons in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3901-3905.
- Jamieson D, Gary R, Rugman P, Boxer D, Higgins Ch.** 1986. Effects of anaerobic regulatory mutations and catabolite repression on regulation of hydrogen metabolism and hydrogenase isoenzyme composition in *Salmonella tyhimurium*. J. Bacteriol., 168: 405-411.
- Johnson M, Rajagopalan K. 1987. Involvement of *chlA*, *E*, *M*, and *N* loci in *Escherichia coli* molybdopterin synthesis. J. Bacteriol. 169: 117-125.
- Kalman L, Gunsalus R.** 1988. The *frdR* gene of *Escherichia coli* globally regulates several operons involved in anaerobic growth in response to nitrate. J. Bacteriol. 170: 623-629.
- Laemmli U.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Lee J, Wendt J, Shanmugan K.** 1990. Identification of a new gene *molR* essential for utilization of molybdate by *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 172: 2079-2087.
- Li J, Kustu S, Stewart V.** 1994. *In vitro* interaction of nitrate-responsive regulatory protein NarL with DNA target sequences in the *fdnG*, *narG*, *narK* and *frdA* operon control regions of *Escherichia coli* K-12. J. Mol. Biol. 241: 150-165.
- Li S, DeMoss J.** 1988. Location of sequences in the *nar* promoter of *Escherichia coli* required for regulation by *fnr* and *narL*. J. Biol. Chem. 263:13700-13705.
- Markwell et al.** 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Analyt. Biochem. 87: 206-210.
- Miller J.** 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. New York.
- Miller J, Amy N.** 1983. Molybdenum cofactor in chlorate resistant and nitrate reductase-deficient insertion mutants of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 155: 793-801.
- Miller J, Scott D, Amy N.** 1987. Molybdenum-sensitive transcriptional regulation of the *chlD* locus of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 169: 1853-1860.
- Ortega de L M.** 1982. Obtención y caracterización preliminar de clones transductantes de *Escherichia coli* K12 llevando fusiones *chl::MudI*, seleccionados utilizando tres métodos diferentes. Tesis de Maestría en Biología Molecular. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.
- Ortega de L M .**1985. Regulación fisiológica de los genes *chl* de *Escherichia coli* K12, llevando mutaciones espontáneas y de fusión *chl::lac*. Trabajo de Ascenso Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.
- Ortega de L M.** 1993. Cuantificación de la represión por glucosa sobre la expresión del locus *moa* (*chlA*) de *Escherichia coli* K12. Acta Científica Venezolana 44(Supl): 172.

- Ortega de L M.** 1994. Un método nuevo para aislar e identificar directamente mutantes Nit- de *Escherichia coli* K12. Jornadas Venezolanas de Microbiología. Mérida. Venezuela.
- Ortega de L M.** 1994. Control en nivel de transcripción de una fusión de operón *moa::lac* de *Escherichia coli* K12: Efectos de diferentes condiciones de cultivo y del operón *moa*. Acta Científica Venezolana 45(Supl).
- Ortega de L M.** 1996. Efecto de la glucosa sobre la expresión aeróbica de una fusión de operón genómica *moa::lac* en *Escherichia coli* K12. MedULA 5: 1-4.
- Pascal M-C, Burini J, Ratouchniak J, Chippaux M.** 1982. Regulation of the nitrate reductase operon effect of mutations in *chlA*, *B*, *D* and *E* genes. Mol. Gen. Genet. 188: 103-106.
- Pitterle D, Rajagopalan K.** 1989. Two proteins encoded at the *chlA locus* constitute the converting factor of *Escherichia coli chlA1*. J. Bacteriol. 171: 3373-3378.
- Puig J, Azoulay E.** 1967. Etude génétique et biochimique des mutans resistant au ClO_3 (gènes *chlA*, *chlB*, *chlC*). C. R. Acad. Sci. (Paris) 264: 1916-1918.
- Puig J, Azoulay E, Pichinoty F, Gendre J.** 1969. Genetic mapping of the *chlC* gene of the nitrate reductase A system in *Escherichia coli* K12. Biochem. Biophys. Res. Comm. 35: 659-662.
- Rabin R, Stewart V.** 1992. Either of two functionally redundant sensor proteins, NarX and NarQ, is sufficient for nitrate regulation in *Escherichia coli* K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 8419-8423.
- Rajagopalan L, Johnson J.** 1992. The pterin molybdenum cofactors. J. Biol. Chem. 267: 10199-10202.
- Rivers S, McNairn E, Blasco F, Giordano G, Boxer D.** 1993. Molecular genetics analysis of the *moa* operon of *Escherichia coli* K-12 required for molybdenum cofactor biosynthesis. Mol. Microbiol. 8: 1071-1081.
- Rosentel J, Healy F, Maupin-Furlow J, Lee J, Shanmugan K.** 1995. Molybdate and regulation of *mod* (molybdate transport), *fdhF* and *hyc* (formate hydrogenlyase) operons in *Escherichia coli* K12. J. Bacteriol. 177: 4857-4864.
- Saier M. Jr.** 1991. A multiplicity of potential carbon catabolite repression mechanisms in prokaryotic and eukaryotic microorganisms. The New Biologist 3: 1137-1147.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T.** 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.
- Santini C, Karibian D, Vasishta A, Boxer D, Giordano G.** 1989. *Escherichia coli* molybdoenzymes can be activated by protein FA from several gram-negative bacteria. J. Gen. Microbiol. 135: 3467-3475.
- Sassone-Corsi P.** 1994. Rhythmic transcription and autoregulatory loops: winding up the biological clock. Cell 78: 361-364.
- Schroder I, Darie S.** 1993. Activation of the *Escherichia coli* nitrate reductase (*narGHJ*) operon by NarL and FNR requires integration host factor. J. Biol. Chem. 268: 771-774.
- Schultz J, Latter G, Matin A.** 1988. Differential regulation by cyclic AMP of starvation protein synthesis in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 170: 3903-3909.
- Shanmugan K, Boxer D, Cole, J, Chippaux M, DeMoss J, Giordano G, Guest J, Gunsalus R, Lin, E.C.C. Rajagopalan, K, Stewart V.** 1992. Proposed nomenclature for the genes involved in molybdenum metabolism in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Mol. Microbiol. 6: 3452-3454.
- Showe M, DeMoss J.** 1968. Localization and regulation of synthesis of nitrate reductase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 95: 1303-1313.
- Silhavy T, Berman M, Enquist L.** 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
- Sodergren E, DeMoss J.** 1988. *NarI* region of the *Escherichia coli* nitrate reductase (*nar*) Operon contains two genes. J. Bacteriol. 170: 1721-1729.
- Spiro S, Guest J.** 1990. FNR and its role in oxygen regulated gene expression in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Rev. 75: 399-428.
- Stewart V.** 1988. Nitrate Respiration in relation to Facultative Metabolism in *Enterobacteria*. Microbiol. Rev. 52: 190-232.
- Stewart V.** 1993. Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 9: 425-434.
- Stewart V, MacGregor C.** 1982. Nitrate Reductase in *Escherichia coli* K12: involvement of *chlC*, *chlE* and *chlG loci*. J. Bacteriol. 151: 788-799.
- Towbin H, Stachelin T, Gordon J.** 1979. Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4356.
- Unden G, Duchene A.** 1987. On the role of cyclic AMP and the FNR protein in *Escherichia coli* growing anaerobically. Arch. Microbiol. 147: 195-200.
- Walker M, DeMoss J.** 1993. Phosphorylation and dephosphorylation catalyzed *in vitro* by purified components of the nitrate sensing system, NarX and NarL. J. Biol. Chem. 268: 8391-8393.
- Walker M, DeMoss J.** 1994. NarL phosphate must bind to multiple upstream sites to activated transcription from the *narG* promoter of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 14: 633-641.