

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

REGULACION POST-TRANSCRIPCIONAL EN EL
OPERON LACTOSA DE ESCHERICHIA COLI K12

AUTOR: Beatriz Silvia Méndez

DIRECTOR: Dra. Carmen Sánchez de Rivas

LUGAR DE TRABAJO: Cátedra de Microbiología. Departamento
de Química Biológica.

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO
DE DOCTOR EN QUIMICA

1 9 7 8

A mis padres

Quiero testimoniar mi agradecimiento a la Dra. Carmen S. de Rivas por el generoso aliento que me ha brindado y por su guía constante y efectiva en la realización de este trabajo.

Al Dr. Osvaldo Peso y a la Dra. Celia Coto de Ravaschino por el apoyo prestado en todo momento. Hago extensivo el agradecimiento a mis compañeros del Departamento de Química Biológica por la cooperación demostrada.

INDICE

<u>CAPITULO I:</u>	INTRODUCCION	página	1
<u>CAPITULO II:</u>	MATERIALES Y METODOS		
II.1.	Cepas bacterianas	"	14
II.2.	Medios y tampones	"	14
II.3.	Aislamiento de mutantes supresoras de la polaridad	"	15
II.4.	Transferencia de F' <u>lac</u> ⁺	"	16
II.5.	Mapeo de las mutantes supresoras		16
II.6.	Eficiencia de la detención de la biosíntesis de proteínas	"	20
II.7.	Cinéticas de traducción	"	21
II.8.	Cinéticas de inducción	"	21
II.9.	Experimentos de inducción en distintas condiciones de ayuno	"	22
II.10.	Técnica de precipitación inmunológica	"	22
II.11.	Determinación de β -galactosidasa		24
II.12.	Determinación de β -galactósido permeasa	"	24

<u>CAPITULO III:</u>	RESULTADOS		
III. 1.	Traducción en diferentes medios	página	26
III. 2.	Mutantes supresoras de la polaridad	"	33
III. 3.	Cinéticas de traducción en la mutante supresora	"	36
III. 4.	Cinéticas de inducción	"	40
III. 5.	Inducción del mensajero lactosa en carencia de fuente de carbono y de aminoácidos	"	44
III. 6.	Inducción en carencia de aminoácidos	"	45
III. 7.	Cinéticas de traducción de genes <u>lac</u> cromosómicas y plasmídicos	"	49
<u>CAPITULO IV:</u>	RESUMEN, DISCUSION Y PERSPECTIVAS	"	56
<u>BIBLIOGRAFIA</u>		"	64

C A P I T U L O I

I N T R O D U C C I O N

I.1. Generalidades

La alta velocidad de crecimiento de las bacterias y el gran tamaño que alcanzan sus poblaciones las hacen especialmente sensibles a los cambios en el medio ambiente, es lógico suponer entonces que los organismos preservados a lo largo del proceso evolutivo han desarrollado numerosos y refinados mecanismos de control, que permitieron lograr una elevada economía celular. Estos mecanismos operan a distintos niveles, como ser la actividad enzimática, la velocidad de entrada de los metabolitos exógenos, la expresión genética. En este trabajo se ha estudiado un tipo de regulación que actúa en el último nivel mencionado.

La secuencia de aminoácidos de una proteína y por lo tanto su estructura final (1), está determinada por genes llamados estructurales. No son ellos los únicos que se encuentran en el ADN bacteriano. Existen genes para los ARN de transferencia y ribosomal. Regiones que indican la iniciación y la terminación de la síntesis del mensajero y también genes, llamados de control, que regulan la frecuencia a la cual los genes estructurales se expresan.

1.2. Sistemas regulables. Operones.

La concentración intracelular de una gran parte de las proteínas codificadas por los genes estructurales permanece constante ante una amplia gama de variaciones en el medio ambiente. Sin embargo, ciertas enzimas específicas necesarias para la utilización de una determinada fuente de carbono o la síntesis de un aminoácido aparecen en respuesta a una dada condición exógena.

Si se observa la posición en el mapa de E.coli (2) o de S.typhimurium (3) de los genes responsables de dichas enzimas, se puede constatar que están agrupados en una misma región cromosomal, como en el caso de lactosa, galactosa, triptofano, histidina. En los ejemplos señalados anteriormente, el nivel de todas las enzimas pertenecientes al mismo camino metabólico aumenta o decrece de acuerdo a un cambio en el ambiente: presencia del azúcar o aminoácido correspondiente.

Estos hechos pueden explicarse mediante el modelo del operón propuesto por Jacob y Monod(4).

Un operón consiste en una unidad de transcripción en la cual los genes estructurales se transcriben en un ARN policistrónico a partir de un punto fijo. Esto significa que cada operón posee un promotor al cual se fija la ARN polimerasa. En varios operones han sido identificados promotores

secundarios en el interior de los mismos, pero con una afinidad por la polimerasa muy reducido. Para regular la frecuencia a la cual la polimerasa transcriba los genes estructurales, hay una segunda región regulatoria que puede ser de dos tipos: en el caso en el cual el estado natural del operón es de permitir la transcripción, el gen regulador recibe el nombre de operador y de gen activador positivo cuando, por el contrario, el operón en sí mismo está cerrado. En el primer caso nos encontramos frente a un control negativo y en el segundo frente a un control positivo, en ambos casos están involucrados una proteína específica y un metabolito específico. En la inducción coordinada de enzimas (sistema lactosa), la proteína, producto de un gen regulador, llamada represor, se fija al operador y es inactivada por un determinado metabolito (lactosa y análogos); en la represión coordinada de enzimas (sistema triptofano) el producto del gen regulador es activado para convertirse en represor, por el producto final del camino biosintético (triptofano). Cuando la regulación es positiva, la transcripción del operón requiere una proteína regulatoria, activador, que por su unión al gen activador permite el pasaje de la polimera. Este activador necesita la presencia de un efector adecuado de manera que la inducción o represión del sistema pueda ocurrir (sistemas arabinosa y fosfatoso alealina).

La ventaja evolutiva que presentan los sistemas inducibles es que evitan a los microorganismos el gasto de energía que significa fabricar enzimas para metabolizar un sustrato no corriente. Los sistemas represibles, al ser regulados por el producto final, impiden la producción innecesaria de las enzimas de un determinado camino biosintético. En este último caso fue demostrado (5) que la presencia de un mecanismo represible concede una ventaja evolutiva. La pequeña cantidad de energía ahorrada por la represión de un operón puede ser crucial para la sobrevivencia de un organismo.

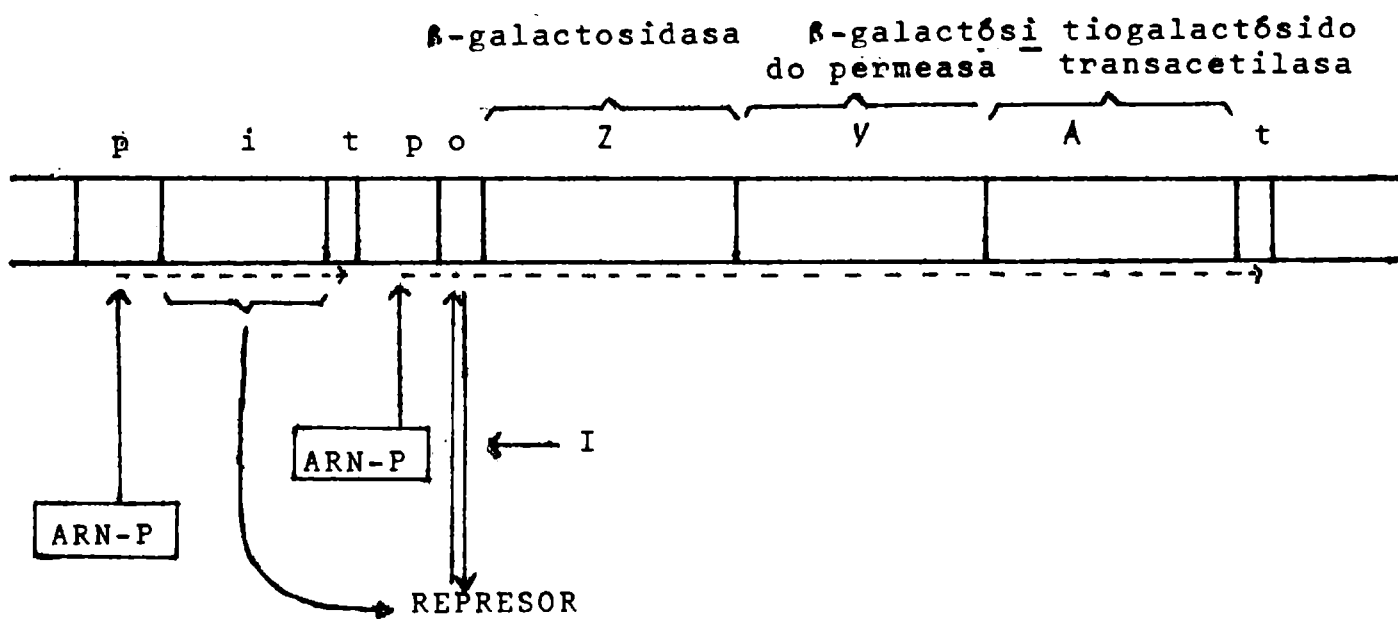
I.3. El operón lactosa en E.coli. (Fig.1)

El operón lactosa de E.coli está compuesto por tres genes estructurales. El gen Z codifica la enzima β -galactosidasa que hidroliza la lactosa en glucosa y galactosa. El gen Y especifica la β -galactosil permeasa involucrada en el transporte de la lactosa. El producto del gen a es la tiogalactósido transacetilasa cuya función es desconocida. La ARN polimerasa (ARN-P) se fija al promotor, p, e inicia la síntesis del mensajero en el sentido indicado por las flechas. La transcripción continúa hasta que la polimerasa

Figura 1

La región lactosa de E.coli

El operón lactosa y el gen regulador adyacente.



alcanza el terminador, t .

El gen i que codifica por el represor se transcribe en el mismo sentido que el operón lactosa (6). Pero la misma polimerasa no transcribe el operón. Existe una señal de terminación entre el gen i y el promotor (7). El represor impide la síntesis del mensajero uniéndose al operador. La interacción represor-operador no tiene lugar en presencia del inductor (I).

La inducción del operón por su inductor fisiológico aparente, sólo ocurre si la enzima β -galactosidasa es funcional. Esto se debe a que para provocar la inducción la lactosa debe ser convertida en allo-lactosa (8), además al menos que la β -galactósido permeasa sea activa, el nivel intracelular de la lactosa cae por debajo del nivel necesario para una inducción continua. Estos inconvenientes pueden evitarse utilizarse inductores gratuitos, que no son sustratos del sistema, como el isopropil- β -D. Tiogalactósido (IPTG).

I.4. Control a nivel de traducción

En los modelos discutidos anteriormente el control de la expresión genética se realiza a nivel de la síntesis de mensajero. Desde el punto de vista de la economía celular este tipo de control es de alto valor porque se evita el

gasto de energía que significa producir un mensajero que no será utilizable.

Sin embargo experiencias in vivo e in vitro señalan la existencia de un control a nivel de traducción en distintos sistemas.

La superinfección por T_4 de E.coli infectado por fagos ARN impide la traducción de su genoma. Esta inhibición tiene lugar a nivel de los factores de iniciación de la biosíntesis de proteínas, específicamente $F_3(9)$.

Los sistemas más detalladamente estudiados en cuanto a este tipo de control son los fagos ARN de E.coli QB, f_2 , R_{17} y MS_2 .

En estos fagos se observó un efecto de descoordinación, es decir las tres proteínas codificadas por el genoma no se sintetizan en el mismo número de moléculas. El análisis de la secuencia de bases de R_{17} señala la posibilidad de la formación de dobles cadenas parciales que impiden la fijación de los ribosomas, creando entonces sitios privilegiados de iniciación (10). Los fagos ARN han dado también la evidencia de la regulación de la traducción por proteínas específicas. En efecto, la proteína de la cápside se fija específicamente en la secuencia comprendida entre la terminación de su correspondiente cistron y la iniciación del siguiente, bloqueando la unión de los ribosomas (11).

Si bien en bacterias se presenta una situación distinta, hay diferentes líneas de trabajo que señalan una regulación de la traducción.

Cambios drásticos en las condiciones de represión de los sistemas triptofano y arginina evidenciaron que la presencia del producto final en esas condiciones provoca la detención de la traducción del mensajero preexistente (12,13). Los resultados señalaban la posible existencia de una molécula regulatoria activa a nivel de traducción.

Conclusiones similares fueron obtenidas por Mc Clellan et al (14) sobre el mismo operón arginina,

El análisis del modo de acción sobre E.coli, de un grupo de bactericidas, los nitrofuranos, permitió obtener resultados muy valiosos en lo que concierne a la traducción de mensajeros inducibles (15). Estos antibióticos bloquean la síntesis de proteínas en la iniciación de la traducción. El efecto es diferente en cuanto a concentración y período de latencia según se trate de enzimas inducibles (β -galactosidasa, galactoquinasa) o de otras enzimas o proteínas celulares. La maquinaria traductora podría entonces distinguir distintos mensajeros según las señales que los mismos llevasen.

Trabajos recientes indican la existencia de un control post-transcripcional en la expresión de los genes de transfe-

rencia del factor sexual F(16).

Elementos como la conformación del mensajero, posibles secuencias señales y ciertas proteínas específicas juegan un rol en la traducción del mensaje genético. Sin embargo todavía no está claro cual es el mecanismo que permita una selección específica de los mRNA o de un cistrón de un mensajero poligénico para provocar su traducción preferencial.

I.5. Represión catabólica

Estudiando la síntesis de aminoácidos deaminasas, Epps y Gale (17) señalaron por primera vez el efecto de represión ejercido por la glucosa.

El efecto inhibitor de este metabolito sobre la síntesis de β -galactosidasa fue puesto en evidencia por MONOD(18), a partir de sus experiencias sobre la diauxia. E.coli creciendo en un medio que posee glucosa y lactosa como fuente de carbono, produce muy poca β -galactosidasa. Al agotarse la glucosa del medio la velocidad diferencial de síntesis de la enzima alcanza su máximo, para luego producirse a una velocidad constante (19).

La fructosa manosa y otros compuestos ejercen también este efecto sobre una cierta cantidad de enzimas inducibles, fenómeno que se engloba bajo el nombre general de represión catabólica (20).

La adición de glucosa a E.coli, creciendo en presencia de otra fuente de carbono, provoca una fuerte represión temporal de las enzimas del operón lactosa; llamada represión transiente (21), la síntesis es luego reanudada a una velocidad menor, y nos encontramos entonces frente a la represión permanente, a la que se suele referir habitualmente con el nombre de represión catabólica. Ambos efectos pueden ser parcialmente suprimidos por el agregado de AMPc. La concentración de dicho nucleótido necesaria para eliminar la represión transiente, es menor que la requerida para la represión permanente (22).

I.6. Objetivos de este trabajo

Una de las primeras preguntas que se pueden hacer sobre esta regulación es a qué nivel de la biosíntesis de proteínas tiene lugar, ya sea en la transcripción del mensajero genético o en la traducción del mismo.

Estudios in vivo e in vitro sobre el efecto del AMPc (23,24) mostraron que su lugar genético de acción es el promotor lactosa y que existe una proteína llamada CRP(CAP) esencial para la misma. El complejo CRP-AMPc es necesario para la fijación de la polimerasa, fijación que sería impedida por la glucosa al disminuir los niveles intracelulares de AMPc. Trabajos recientes dan a la proteína RHO un rol

en esta regulación (25).

Del análisis de estos resultados un modelo de control transcripcional de la represión catabólica parece imponerse. Sin embargo algunas contradicciones importantes permitieron pensar que el control transcripcional no era el único, ni quizás el esencial en el mantenimiento de la represión catabólica:

1) Si bien el AMPc es indispensable para la transcripción del mensajero lactosa, y el agregado de AMPc exógeno suprime parcialmente la represión catabólica, no hay evidencias de cambios significativos en la concentración de AMPc endógeno cuando se comparan cultivos crecidos en distintas condiciones de represión (26), ni se ha demostrado una disminución drástica del mismo, por el agregado de glucosa, a un cultivo que crece en otra fuente de C (27).

2) Efectos a nivel de traducción en la regulación por catabolitos han sido encontrados en distintos sistemas (28,29) y en lactosa en particular (30,31).

3) Perlman y Pastan encontraron que el AMPc juega un papel a nivel de la traducción en la síntesis de Triptofanasa en E.coli (32).

4) Moses y Yudkin (33), en una aproximación genética del problema, observaron que cepas que llevan deleciones de distinto tamaño en cualquiera de los extremos del operón lactosa, seguían siendo sensibles a la represión catabólica,

lo que excluye la posibilidad de un único control a nivel de la síntesis del mensajero.

5) Aboud et al (34) mostraron que la presencia de glucosa detenía la traducción del mRNA lactosa y que el agregado de AMPc promovía la traducción de dicho mensajero

6) Las numerosas evidencias acumuladas en estos últimos años y discutidas anteriormente sobre el papel jugado por la traducción en la regulación de los procesos celulares.

Todos estos hechos nos llevaron a investigar en que medida existía una modulación a nivel de la traducción del mensajero lactosa en condiciones de represión catabólica.

Para ello se realizaron estudios cinéticos de la traducción de dicho mensajero en distintas condiciones de represión. Las condiciones experimentales se eligieron de manera de observar sólo el fenómeno de represión permanente. E.coli no presenta represión transiente cuando se transfiere de un medio con glicerol (o succínico) a un medio con glucosa (21), pero sí cuando se agrega glucosa a un cultivo en glicerol. Se postuló también una analogía con el fenómeno de polaridad, para el cual se analizó el comportamiento del mensajero en mutantes supresoras .

Los resultados obtenidos además de comprobar la existencia de ese tipo de control y similitudes con efectos polares señalaron una estabilidad inusual del mensajero. Al diseñar experimentos para aclarar esta observación

se puso en evidencia una nueva posibilidad regulatoria relacionada con la protección del mensajero en determinadas condiciones experimentales. En efecto, la traducción del mensajero lactosa sintetizado a partir de distintas unidades replicativas, y luego de diferentes condiciones de ayuno permitieron poner en evidencia que dicha estabilidad era debida a una localización especial del ARNm y que su proceso de traducción estaba ligado a la replicación de su matriz de ADN.

C A P I T U L O II

MATERIALES Y METODOS

II.1. Cepas bacterianas

Cepas de Escherichia coli K12

Tabla 1

Nombre	Genotipo	Origen
3.000	HfrC <u>thi</u>	Colección Jacob-Monod
2.001	F ⁻ <u>thi, leu, treo, lac Y₁, str^R</u>	" " "
2.000	F ⁻ <u>thi, his, arg, ade, lac Z, polar, str^R</u>	" " "
R _W /F' <u>lac⁺</u>	<u>thi, Δ lac/F'lac⁺</u>	" " "
2x74/F' <u>lac⁺</u>	<u>thi, his, arg, Δ lac /F'lac⁺</u>	" " "
37R8	<u>thi, his, arg, ade, lac Z polar, sup, str^R</u>	Este trabajo
37R8f	<u>thi, his, arg, ade, ilv, lac Z polar, sup, str^R</u>	" "

II.2 Medios Tampones

ML	triptona	1%
	extracto de levadura	0,5%
	CINa	0,5%
	p ^H = 7,3	

M ₉	ClNH ₄	0,1%
	ClNa	0,05%
	SO ₄ Mg·7H ₂ O	0,002%
	PO ₄ H ₂ K	0,03%
	PO ₄ HNa ₂ ·12H ₂ O	1,5%
	Aminoácidos	0,01% e hidratos de carbono
		0,2% fueron agregados según fuese necesario.

Los medios sólidos fueron preparados por el agregado de agar a una concentración final = 1,5%

PM ₂	Tampón fosfato de sodio (pH=7)	0,1M
	β -Mercaptoetanol	0.1M
	SO ₄ Mg	1.10 ⁻⁴ M
	SO ₄ M _n	2.10 ⁻⁴ M

II.3 Aislamiento de mutantes supresoras de la polaridad

Se utilizó el método de selección por melibiosa que permite el crecimiento a 42°C de aquellas bacterias que poseen β - galactósido permeasa activa ya que la α-galactósido permeasa es termosensible. La cepa utilizada posee una mutación polar en Z .

10⁸ células de un cultivo de una semana a temperatura ambiente de 20°C, fueron sembradas en placas de medio mínimo M₉ adicionadas de 0,2% de melibiosa y los aminoácidos necesarios. Las placas fueron incubadas cinco días a 42°C.

Las colonias se purificaron dos veces en el mismo medio y en las mismas condiciones. A partir de cultivos en medio mínimo de las mismas se realizaron las mediciones de β -galactosidasa, C.R.M. (material de reacción cruzada contra un suero anti- β -galactosidasa) y permeasa. Como 20w0 posee una mutación polar extrema en el gen Z, sólo aquellas colonias que presentaron β -galactosidasa y C.R.M. negativos y permeasa positiva fueron consideradas como mutantes supresoras de la polaridad. (35)

II.4. Transferencia de F'lac⁺

Cultivos de una noche en ML de 20w0, 37R8 2x74 y RV/F'lac⁺ fueron diluidos cinco veces en el mismo medio e incubados a 37°C durante dos horas con agitación suave.

El cruce se realizó mezclando la cepa dadora, RV/F'lac⁺, con cada una de las cepas receptoras en relación 1/20 e incubando diez minutos a la misma temperatura sin agitación.

Los transconjugantes fermentadores de lactosa fueron seleccionados en placas de medio mínimo adicionadas de lactosa, los aminoácidos necesarios y estreptomina.

II.5 Mapeo de las mutantes supresoras

Se realizó midiendo la frecuencia de cotransducción con respecto al marcador isoleucina-valina.

a) Obtención de mutantes ilv

5 ml. de un cultivo en fase exponencial de 37R8 en caldo

nutritivo fueron centrifugados y resuspendidos en el mismo volumen de medio fresco. Se agregó 0.1 ml de dietil sulfonato (D.E.S) y la mezcla se incubó 30' a 37°C. Luego de separar el D.E.S por decantación, el cultivo se centrifugó y el pellet fue resuspendido en 5ml de M₉; 0,2ml de dicha resuspensión se transfirieron a 10 ml de caldo nutritivo y se procedió a la incubación durante 18 hs. con agitación a 37°C. El cultivo de una noche fue diluído diez veces y 0.1ml se transfirieron a 10 ml de M₉ adicionados de glucosa, histidina, arginina y adenina, más penicilina a una concentración final de 200 U/ml. Se incubó 6 hs. con agitación a 37°C y luego se procedió a la siembra en placas de M₉, glucosa, los requerimientos mencionados anteriormente, isoleucina y valina, de 0.1 ml de las diluciones : 10⁰, 10⁻¹, 10⁻² . Las placas fueron incubadas 48 hs. a 37°C.

Las placas que contenían entre 200 y 50 colonias fueron replicadas sobre M₉, glucosa, histidina, arginina, adenina e incubadas 24 hs a 37°C.

Las clones que no dieron colonias en las placas sin isoleucina y valina, fueron purificadas dos veces sobre medio completo, puestos en grilla y replicados sobre:

- i) M₉ glucosa, histidina, arginina, adenina, isoleucina, valina.
- ii) M₉ glucosa, histidina, arginina, adenina
- iii) M₉ melibiosa, histidina, arginina, adenina, isoleucina, valina.
- iv) M₉ melibiosa, histidina, arginina, adenina

Las dos primeras placas fueron incubadas a 37°C y las dos últimas a 42°C. Los clones que continuaron a ser ilv y capaces de fermentar la melibiosa, fueron comprobados en sus otros caracteres y guardados en agar nutritivo punción. Uno de dichos clones 37R8f se eligió para continuar las experiencias.

b) Preparación de un lisado transductor del fago P₁vir

E. coli K₁₂ 3000 protótrofa cultivada en ML adicionado de Cl₂Ca a una concentración 5.10⁻³M, hasta comienzo de la fase estacionaria. Se procedió luego a la infección por un lisado de P₁ en una relación 10⁶ fagos/10⁸ bacterias durante 10 minutos a 30°C. Las bacterias infectadas se sembraron en sobrecapa de agar blando en placas de triptona adicionadas de Cl₂Ca a una concentración final de 5.10⁻³ M. Luego de 8 hs de incubación a 37°C, se recolectó la sobrecapa, se adicionaron algunas gotas de CHCl₃ y se procedió a su centrifugación 10 minutos a 5.000 r.p.m. El sobrenadante fue titulado y guardado en

presencia de CHCl_3 .

c) Transducción de 37R8f

La cepa 37R8f se cultivó en ML adicionado de Cl_2Ca concentración final $5 \cdot 10^{-3}$ M hasta comienzo de la fase estacionaria. 0,5 ml del cultivo se incubaron con el lisado preparado anteriormente, a multiplicidades de infección: 10; $1; 10^{-1}$; 10^{-2} ; diez minutos a 30°C al final de los cuales 0,5 ml de citrato de sodio 20% fueron agregados para impedir la absorción de más partículas de fago. Los cuatro cultivos infectados fueron sembrados en placas de M_9 , glucosa, histidina, arginina, citrato de sodio (2 %) e incubados a 37°C durante 48 hs. Dos controles con el lisado y el cultivo bacteriano únicamente fueron realizados al mismo tiempo.

El número de colonias por placa resultó proporcional a la multiplicidad de infección, 248 colonias fueron purificadas en el mismo medio.

d) Frecuencia de marcadores no seleccionados

Los clones elegidos fueron puestos en grilla en el mismo medio y se replicaron sobre:

- i) M_9 melibiosa, histidina, arginina, adenina
- ii) M_9 glucosa, adenina, histidina
- iii) M_9 glucosa, adenina, arginina

La primera placa se incubó a 42°C y las siguientes a 37°C durante 24 hs, procediéndose luego a contar las colonias para determinar la frecuencia

II.6. Eficiencia de la detención de la biosíntesis de proteínas

Se midió por la incorporación de aminoácidos radioactivos en los cultivos: a) hambreados en aminoácidos, b) adicionados de cloranfenicol.

a) Un cultivo de 25 ml en fase exponencial de 200i en M₉ glucosa, treonina y leucina, se centrifugó, lavó en frío dos veces con medio mínimo y se resuspendió en M₉ glucosa. A una alícuota de 10 ml se agregó 0.1 ml de una solución de: 0,1 ml de L-leucina ¹⁴C(50 uC) en 0.75 ml de solución de L-leucina (450 ug/ml). La mezcla se incubó a 37°C y muestras de 1 ml fueron tomadas durante 20 minutos a intervalos de 5.

Las muestras fueron precipitadas por 0.1 ml de TCA 50%, calentadas 15 minutos a 90°C, colocadas en filtros millipore, lavadas dos veces con TCA 5% y secadas. La radioactividad en la fracción insoluble se midió en un contador Nuclear Chicago a flujo gaseoso.

Un experimento control fue realizado en un cultivo con los aminoácidos necesarios

b) De 25 ml de un cultivo de 3000 en M₉ glucosa, se tomaron dos alícuotas de 10 ml, a una de las cuales se

agregó clorafenicol a concentración final de 5ug/ml y la otra se utilizó como control. Se incubaron 5 minutos a 37°C y se procedió al agregado de L-leucina ¹⁴C siguiéndose el mismo procedimiento descrito en a).

II.7 Cinéticas de traducción

Se prepararon cultivos en medio mínimo con glucosa o glicerol como fuente de carbono. Durante la fase de crecimiento exponencial, la síntesis de proteínas y el crecimiento fueron detenidos ya sea por ayuno en aminoácidos o adición de cloranfenicol (5 ug/ml / $3 \cdot 10^8$ células). El cultivo fue entonces inducido por la adición de IPTG (iso-propol β - D Tiogalactósido) a una concentración final de $5 \cdot 10^{-4}$ M. Después de un período entre 2 a 5 minutos según los casos, el cultivo fue rápidamente enfriado, centrifugado, resuspendido en medio fresco y separado en dos fracciones. A cada uno de ellas se agregaron diferentes fuentes de carbono y se incubaron a 37°C. Se tomaron muestras a distintos intervalos para la medición del crecimiento y de β - galactosidasa.

II.8 Cinéticas de inducción

Dos cultivos separados fueron precrecidos en glicerol y glucosa como fuentes de carbono respectivamente, recolectados durante la fase exponencial y cada pellet dividido en dos

fracciones y luego resuspendido en dos medios conteniendo las fuentes de carbono mencionadas anteriormente e IPTG (10^{-4} M concentración final). Los cultivos se agitaron a 37°C y se tomaron muestras a distintos intervalos para medición del crecimiento y de β -galactosidasa.

II.9 Experimentos de inducción en distintas condiciones de ayuno.

Las distintas cepas de E. coli K_{12} fueron cultivadas en M_9 con glicerol y los aminoácidos necesarios. Durante la fase de crecimiento exponencial, las células fueron centrifugadas a 5°C y resuspendidas en medio M_9 libre de aminoácidos y glicerol (condición AC^-) o sólomente de aminoácidos (condición A^-). Los cultivos fueron llevados a 37°C e inducidos por adición de IPTG, $5 \cdot 10^{-4}$ M concentración final, durante 5 minutos. El inductor fue eliminado por una nueva centrifugación a 5°C y el pellet fue lavado una vez con M_9 con (condición A^-) o sin glicerol. Las bacterias fueron resuspendidas en medio de crecimiento precalentado y agitadas a 37°C . A tiempos diferentes se tomaron muestras para medida del crecimiento y ensayo de β -galactosidasa. Cuando las condiciones del experimento lo reclamaban la eliminación del inductor se realizó por filtración por millipora a temperatura ambiente.

II.10 Técnica de precipitación inmunológica

Todas las diluciones se hicieron en tampon PM_2 , y el

volumen final de la reacción se ajustó a 1 ml. El suero anti- β -galactosidasa de E.coli (suero de cabra), se agregó en 0,25 ml de la dilución conveniente (depende de su título) y se agrega la cantidad de β - galactosidasa en estudio. Los tubos se taparon se agitaron y se incubaron 72 hs. a 4°C. Después de la incubación se centrifugaron, se decantó el sobrenadante y se midió en este la actividad enzimática residual por ml. Los controles consistieron en tubos con diferentes cantidades de enzima y sin suero anti- β -galactosidasa.

Los resultados se representaron en un gráfico en el cual en ordenadas se colocó la actividad residual por ml y en abcisas las unidades de enzima agregadas por ml. Por extrapolación en las abcisas se determinó el punto de precipitación máxima.

Para preparar los extractos enzimáticos, se inocularon 100 ml de M_9 adicionado de glicerol y los aminoácidos necesarios e IPTG 10^{-4} M. Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación durante la noche. Las suspensiones bacterianas se centrifugaron 10 minutos a 10.000g a 4°C y los pellets se resuspendieron en 5ml de PM_2 . Las células se rompieron por tratamiento con el oscilador sónico.

Beanson a máxima salida, por períodos no mayores de 45 segundos a 4°C.

Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 15000 g 5 minutos y se determinó la actividad de β -galactosidasa en los extractos.

II.11 Determinación de β -galactosidasa

Los extractos enzimáticos se obtuvieron en tampón PM_2 luego de 30 segundos de sonicación en un oscilador sónico Beanson a máxima salida. La reacción se llevó a cabo a $28^\circ C$ agregando a 1 ml de muestra en PM_2 , 0,25 ml de ONPG (o-nitrofenil - β - D-galactosido) disuelto en fosfato de sodio (pH=7) para alcanzar en ONPG y fosfato una concentración final de $2 \cdot 10^{-3} M$ y 0,1M respectivamente. La reacción se detuvo al tiempo adecuado, por la adición de 0.5 ml de carbonato de sodio 1M, y la densidad óptica fue medida a 420 nm en un espectrofotómetro (36).

Una unidad de enzima se iguala a 1 nm de ONPG hidrolizado/ min a $28^\circ C$, pH= 7 y 0,5 cm de camino óptico. Las absorbancias fueron corregidas para un camino óptico de 1 cm y el aumento de la absorbancia del ONP a pH = 11 .

II-12 Determinación de β -galactósido permeasa

El método que se usó es el descrito por Kepes (77) ^{14}C - trimetil- β - D-galactósido (TMG) se agregó a células creciendo en fase logarítmica y a las cuales se preincubó con clorafenicol (100 $\mu g/ml$), a intervalos se tomaron muestras

que se filtraron en frío a través de filtros millipore, lavando con medio M_9 frío. Los filtros una vez secos se contaron en un espectrofotómetro de centelleo ~~Scintillation~~ Packard Tri-Carb.

C A P I T U L O I I I

RESULTADOS

III.1. Traducción en diferentes medios

A fin de determinar a que nivel de la biosíntesis de proteínas se produce la regulación por la glucosa el primer paso a realizar consistió en separar las etapas de transcripción y traducción y observar la acción de dicho catabolito cuando está presente en sólo una de las mismas. Para ello se procedió a inducir al mensajero lactosa durante un paro de la biosíntesis de proteínas. Dos métodos fueron utilizados para producir dicho bloqueo:

- 1) El agregado de un antibiótico , cloranfenicol
- 2) Hambreado en aminoácidos de una cepa auxótrofa

En ambos casos se midió la eficiencia del bloqueo por la incorporación de L-leucina ^{14}C (II.6). El experimento se realizó en medio mínimo y se obtuvo en ambos casos 90% en la inhibición de la incorporación . Como era de esperarse la utilización de distintas fuentes de carbono: glucosa, glicerol o succínico , no produjo ninguna variación sobre el resultado (fig.2 y 3).

La concentración de cloranfenicol demostró ser crítica.

Figura 2: Bloqueo de la biosíntesis de proteínas mediante el agregado de un antibiótico (cepa 3000):
▲ sin cloranfenicol ; ● con cloranfenicol
(5 ug/ml).

Figura 2

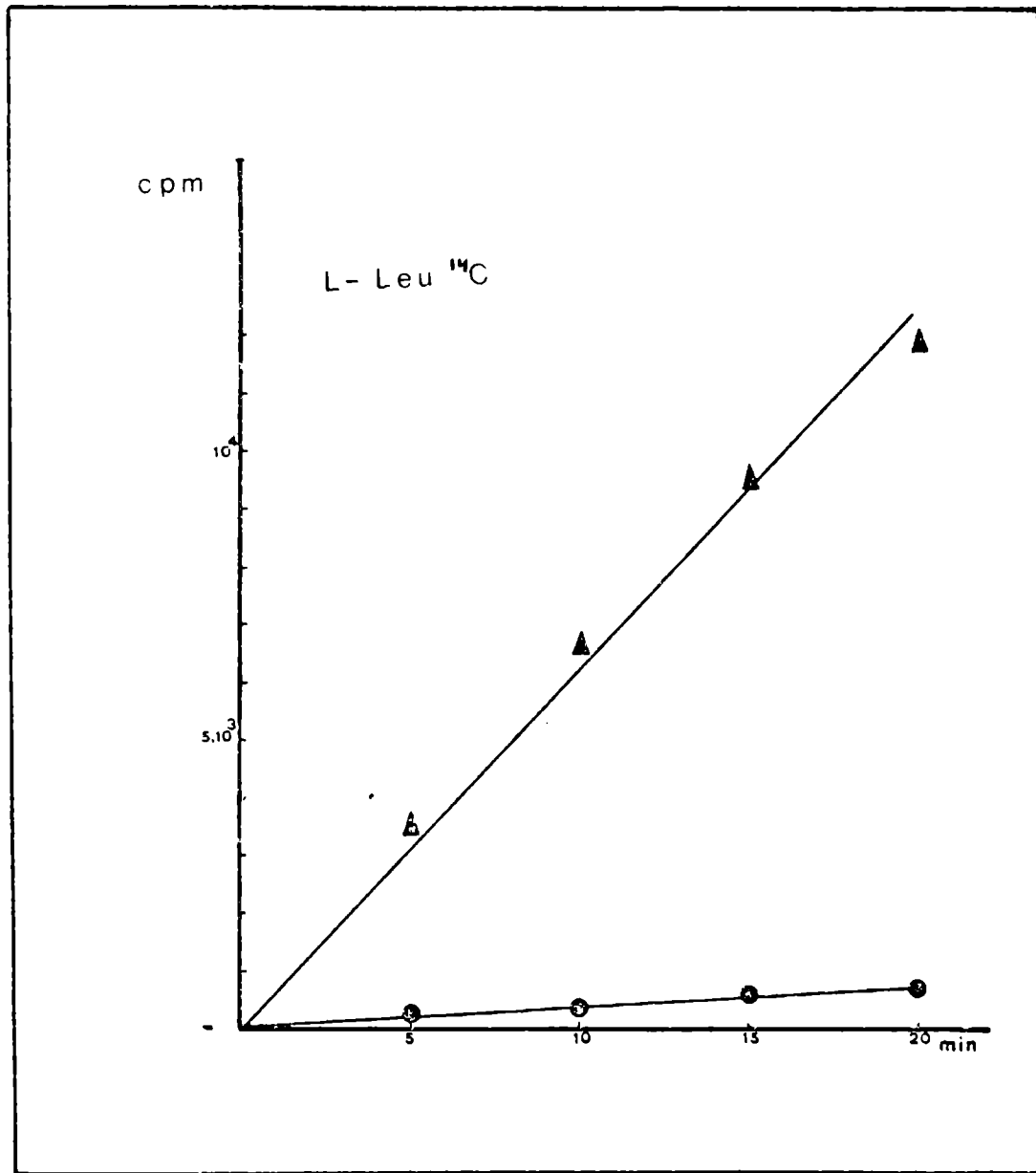
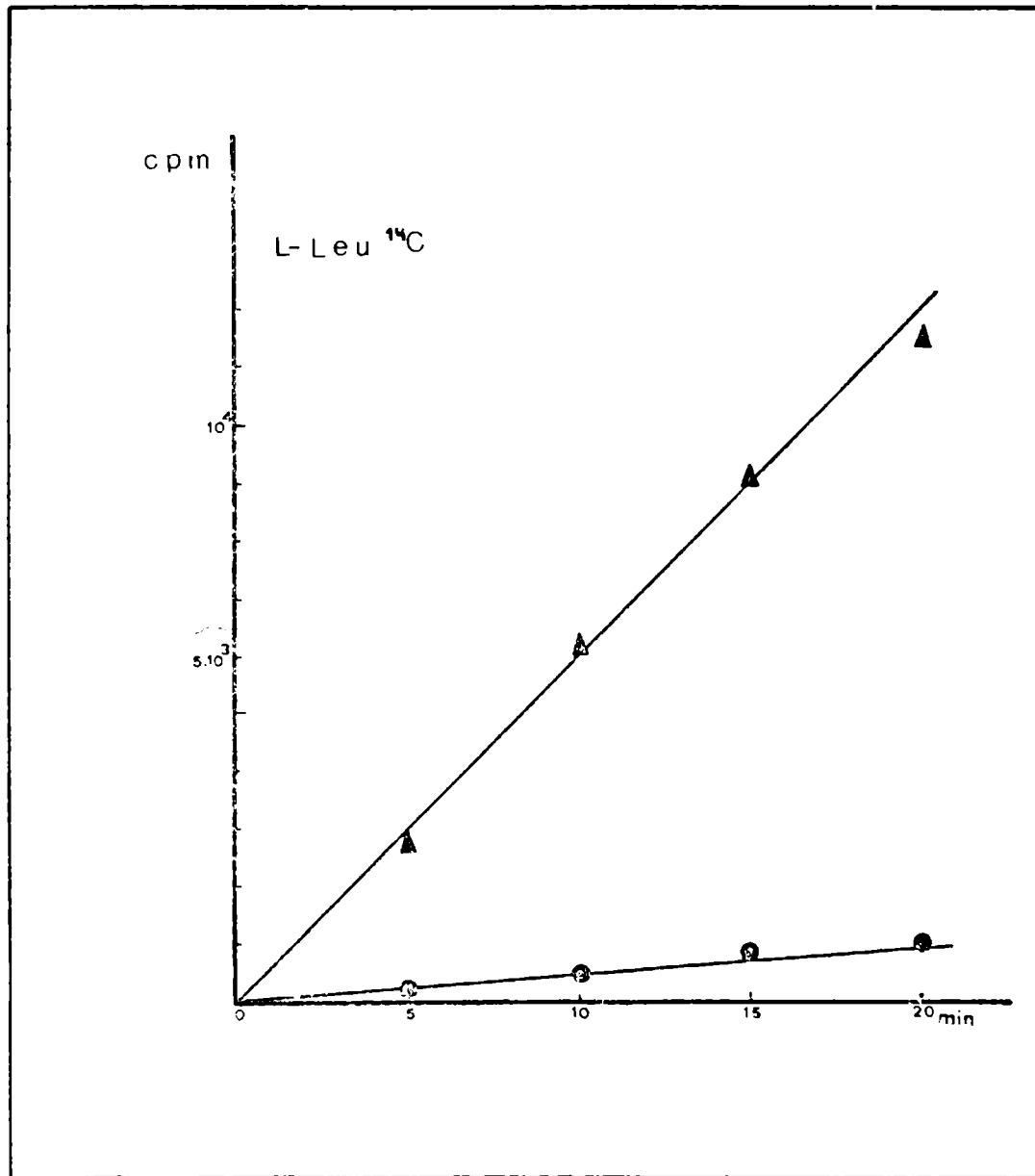


Figura 3: Bloqueo de la biosíntesis de proteínas mediante
el hambreado en aminoácidos (cepa 2001) :
▲ con L-treonina; ● sin L-treonina.

Figura 3



En efecto, si bien la eficiencia en el paro de la biosíntesis de proteínas para una gama comprendida entre 5 y 100 ug/ml era la misma, para concentraciones mayores que 10 ug/ml, una vez reanudado el crecimiento la detección de β -galactosidasa era prácticamente nula. Esto puede deberse, entre otras causas, a una acción secundaria del cloranfenicol a dichas concentraciones sobre el mensajero preformado o a la modificación de un posible sitio específico en los ribosomas u otros componentes celulares para el reconocimiento de ciertos mensajeros.

Como con concentraciones entre 5 y 10 ug/ml se obtenían condiciones de bloqueo correctas se decidió limitarse a las mismas para observar la traducción del mensajero lactosa en medios que ejercen distinta represión catabólica.

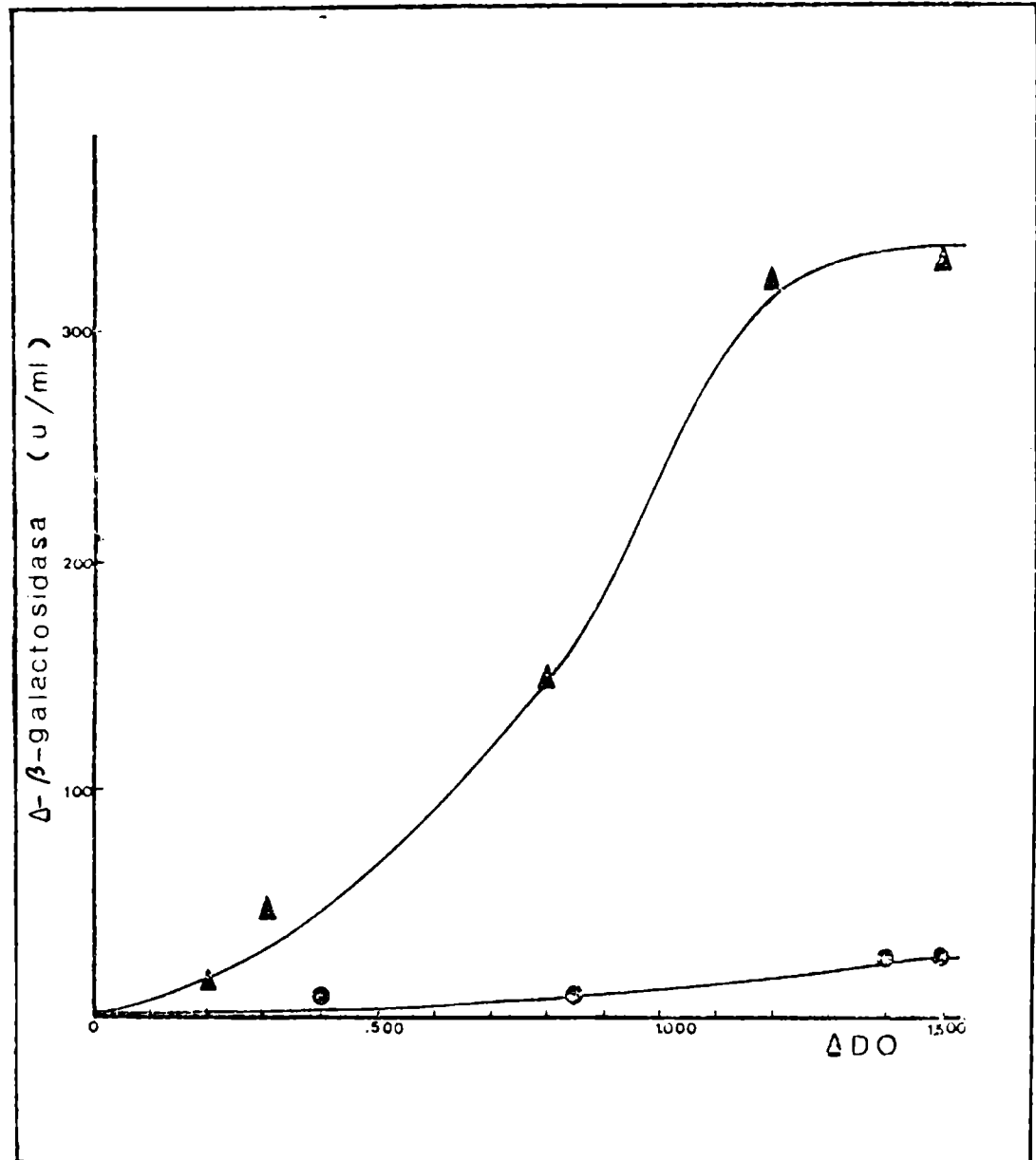
La primera experiencia fue llevada a cabo con la cepa 3000, protótrofa. Un cultivo de la misma fue inducido durante un bloqueo de la síntesis de proteínas por cloranfenicol y la producción de β -galactosidasa fue medida en dos medios diferentes que ejercen alta y baja represión catabólica, glucosa y succínico respectivamente (II- 7).

El resultado de dicho experimento puede verse en la figura 4. Vemos que la eficiencia de la traducción es diferente según sea la fuente de carbono utilizada en el medio. En el caso en que la misma tiene un efecto catabólico bajo, ácido

Figura 4: Traducción diferencial del mensajero lactosa inducido durante 3 minutos en células bloqueadas por cloranfenicol (cepa 3000); después de eliminación del inductor (IPTG $5 \cdot 10^{-4} M$) y del cloranfenicol (5 ug/ml). La experiencia se realizó en medio mínimo conteniendo :

▲ ácido suacínico; ● glucosa.

Figura 4



succínico, la producción de β -galactosidasa alcanza niveles más elevados que cuando se utiliza glucosa (alta represión). Experimentos en los cuales se reemplazó el ácido succínico por glicerol condujeron a resultados similares.

Para evaluar en que medida el método utilizado para detener la síntesis de proteínas influía en los resultados obtenidos, se realizó el mismo experimento utilizando esta vez la cepa 2001, Auxótrofa e induciendo durante el hambreado de aminoácidos (II.7).

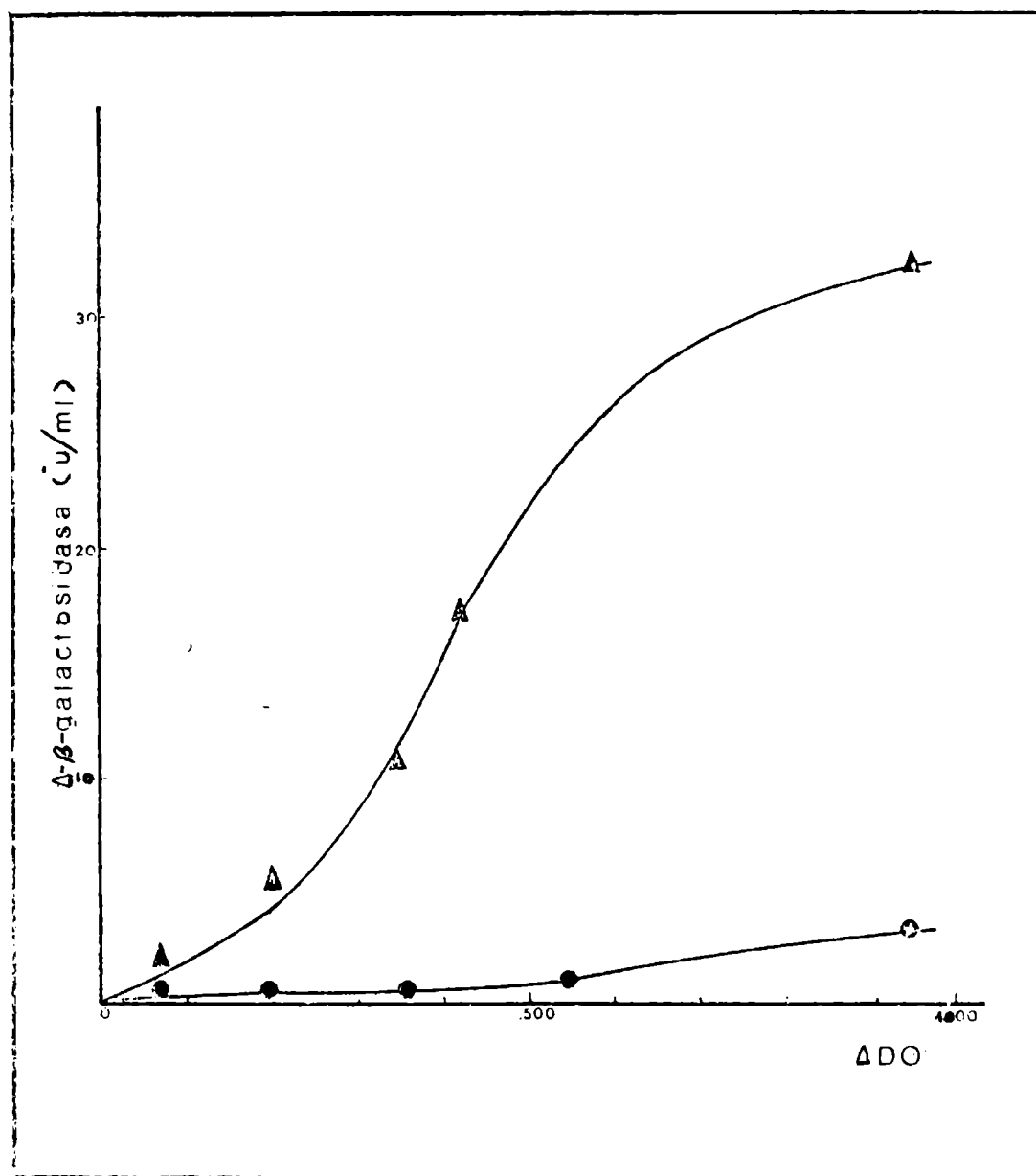
El mismo resultado que en el caso de la cepa protótrofa fue obtenido (fig.5).

Dos conclusiones surgen de esta última experiencia, primero que la traducción diferencial obtenida no depende del método utilizado para bloquear la síntesis de proteínas y segundo que la síntesis de β -galactosidasa no se debe a una inducción residual. En efecto, existe la posibilidad, que a pesar de eliminar el inductor por centrifugación, exista IPTG intracelular incorporado por transporte activo. Esta posibilidad es desechada por la última experiencia descrita, ya que la cepa utilizada es mutante de β -galactósido permeasa, no permitiendo la acumulación activa de IPTG.

Trabajos de Kaempfer et al (38) han demostrado que cuando se eliminó el inductor mediante filtración por millipore, se impide una reiniciación de la síntesis del mensajero lactosa. Experiencias paralelas realizadas utilizando esta técnica

Figura 5: Traducción diferencial del mensajero lactosa inducido durante 3 minutos en células hambreadas en L-treonina (cepa 2001), después de eliminación del inductor (IPTG 5.10^{-4} M) y el agregado de L-treonina. La experiencia se realizó en medio mínimo conteniendo :
▲ glicerol ; ● glucosa

Figura 5



permitieron constatar que el método de centrifugación utilizado en este trabajo reproduce las mismas condiciones.

III.2 Mutantes supresoras de la polaridad

De los experimentos anteriores se desprende, que en nuestras condiciones experimentales, la regulación por catabolitos actúa a nivel de la traducción del mensajero lactosa .

Trabajos anteriores (39) señalaron una descoordinación en la síntesis de las enzimas del operón lactosa en condiciones de represión catabólica máxima, producida por un aporte constantemente limitante de la fuente de nitrógeno (crecimiento lineal); la relación β -galactosidasa/transacetilasa se ve alterada en comparación a condiciones de crecimiento exponencial, o crecimiento lineal limitado por la fuente de carbono.

Un posible mecanismo para explicar este fenómeno puede ser similar al postulado para explicar la polaridad Morse et al (40), Hiraga et al (41). En los operones bacterianos la aparición de un codón sin sentido o la inserción de un segmento de ADN reduce la expresión de los genes distales del mismo operón. Según los autores señalados precedentemente la terminación prematura de la síntesis de un polipéptido originada por esas mutaciones, es debida al desprendimiento de los ribosomas a nivel de las mismas. Dentro

de un gen estructural, el mensajero queda entonces expuesto a la degradación por nucleasas, al menos que la presencia cercana de un codón de iniciación permita la fijación de los ribosomas y por consiguiente la protección del mensajero distal.

En cierta clase de mutantes, llamadas su A (35,42), la polaridad puede ser suprimida. El gen su A es considerado responsable de la síntesis de una endonucleasa esencial para la degradación del mensajero no traducido, pero dispensable para el crecimiento normal (38,32).

En vista de comprobar si en ambos fenómenos estaban involucrados mecanismos similares, se aislaron mutantes supresoras de la polaridad (II.3) y se observó en las mismas el comportamiento del mensajero lactosa en distintas condiciones de represión.

El principio utilizado para aislar este tipo de mutantes es que siendo la α -galactósido permeasa termosensible, sólo, la presencia de β -galactósido permeasa permite el crecimiento de E.coli en melibiosa a temperaturas superiores a 37°C. Siendo 20w0 una mutante polar extrema en Z la expresión de β -galactósido permeasa se ve fuertemente disminuída con respecto a la cepa protótrofa. Mutantes supresoras de dicha mutación, al restaurar la expresión de los genes distales, permite al mismo tiempo el crecimiento en melibiosa.

Para distinguir entre los clones seleccionados los revertantes de los supresores se procedió a la determinación de β -galactosidasa, C.R.M. y β -galactósido permeaso

Un clon, entre los 48 analizados que presenta 12% de restauración de la actividad de permeasa respecto a la cepa original, C.R.M. y β -galactosidasa negativos, 37R8, fue considerada como mutante supresora y elegida para continuar las experiencias.

La localización de la mutación fue realizada en la forma descripta (II.5), obteniéndose por transducción con el fago P_1 los siguientes resultados.

TABLA 2

Marcador seleccionado	Porcentaje marcador no seleccionado		
	<u>mel</u>	<u>his</u> ⁺	<u>arg</u> ⁺
<u>ilv</u> ⁺	78%	-	-

La mutación supresora es contransducibile con ilv, lo que le sitúa en las proximidades del minuto 73 en el mapa de Taylor (2), análogamente a su A.

III.3. Cinéticas de traducción en las mutantes supresoras.

Para estudiar la expresión de los genes lactosa en la cepa 37R8 un episoma $F'lac^+$ fue introducido (II.4).

La traducción del mensajero lactosa en función del tiempo fue analizada como en los casos anteriores, y los resultados pueden verse en la figura 6. En condiciones de períodos de inducción cortos, eficiencias similares en la producción de β -galactosidasa fueron obtenidos. Tanto que la traducción del mensajero se realizase en glucosa como en glicerol. El resultado no se ve alterado por el método de bloqueo de la síntesis de proteínas. El experimento control realizado con la cepa parental 20w0/ $F'lac^+$ coincide con el de la cepa protótrofa (fig.7).

37R8 se comporta entonces como una mutante resistente a la represión catabólica. Sin embargo cuando se utilizan períodos de inducción más largos los resultados difieren. En efecto, la cinética de traducción luego de una inducción de dos minutos (fig.8) muestra que si bien durante el tiempo correspondiente a una duplicación de la DC 37R8 se comporta como resistente a la represión catabólica, pasado ese límite la síntesis de β -galactosidasa sólo tiene lugar en glicerol.

El comportamiento particular de esta cepa llevó a la necesidad de analizar en más detalle la producción de enzima para lo cual se analizaron cinéticas de inducción.

Figura 6: Traducción del ARN m lactosa producido durante 1 minuto de inducción, con diferentes bloqueos de la síntesis de proteínas, en la cepa 37R8/F'lac⁺. I agregado de cloranfenicol; II hambreado en aminoácidos (arginina, histidina); ▲ glicerol y ● glucosa fueron las fuentes de carbono utilizadas durante el período de traducción.

Figura 6

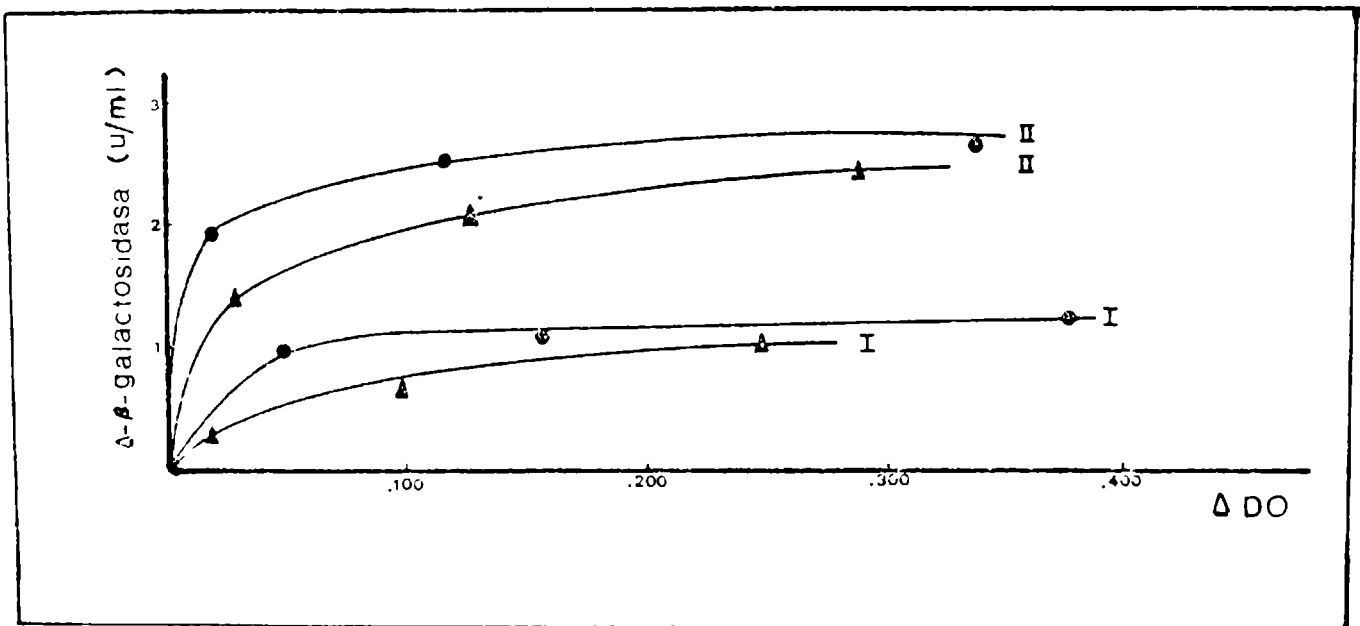


Figura 7: Traducción del ARN m lactoso producido durante 1 minuto de inducción, con diferentes bloqueos de la síntesis de proteínas, en la cepa 20w0/F'lac⁺. I agregado de cloranfenicol; II hambreado en aminoácidos (arginina, his, tidina); ▲ glicerol y ● glucosa fueron las fuentes de carbono utilizadas durante el período de traducción.

Figura 7

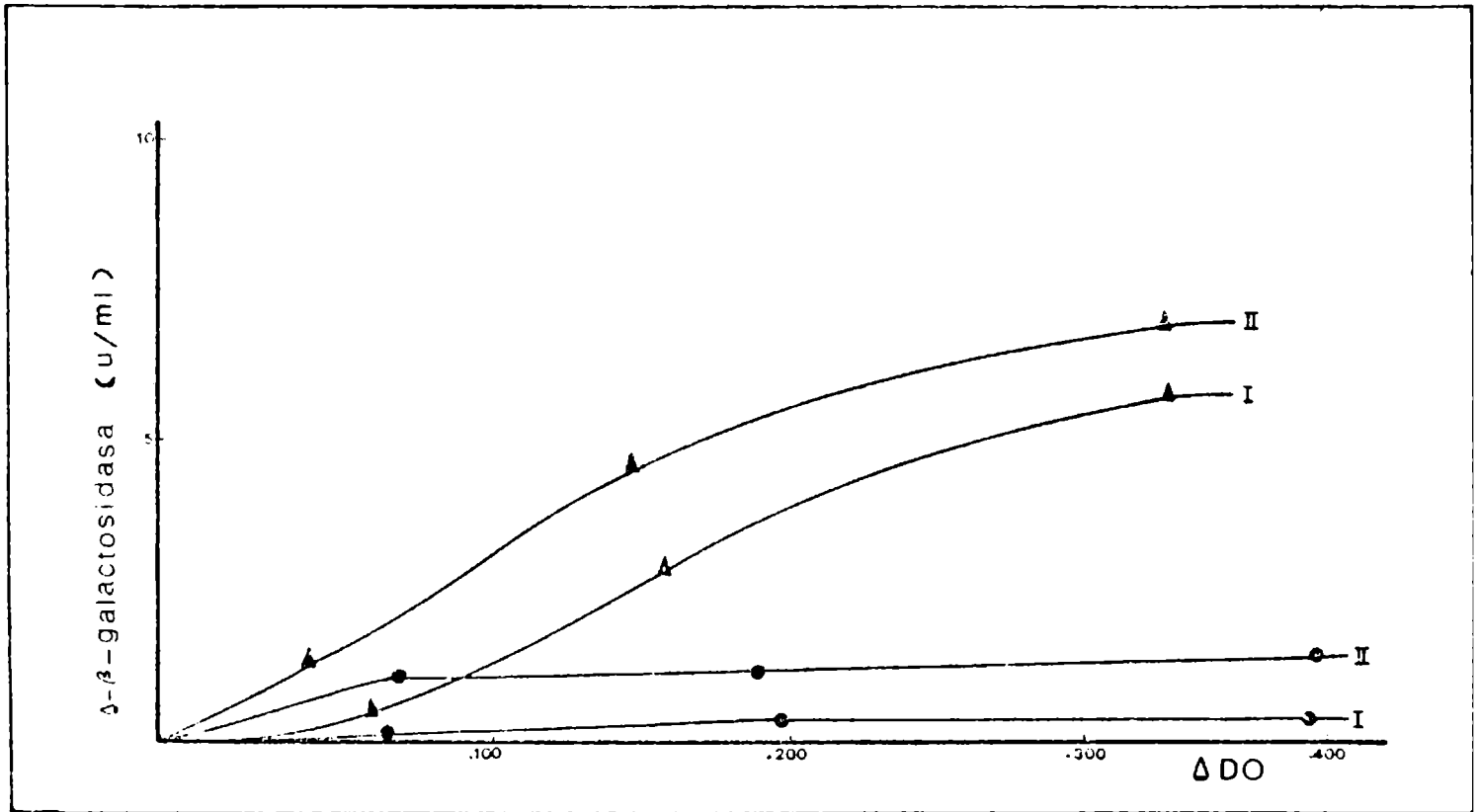
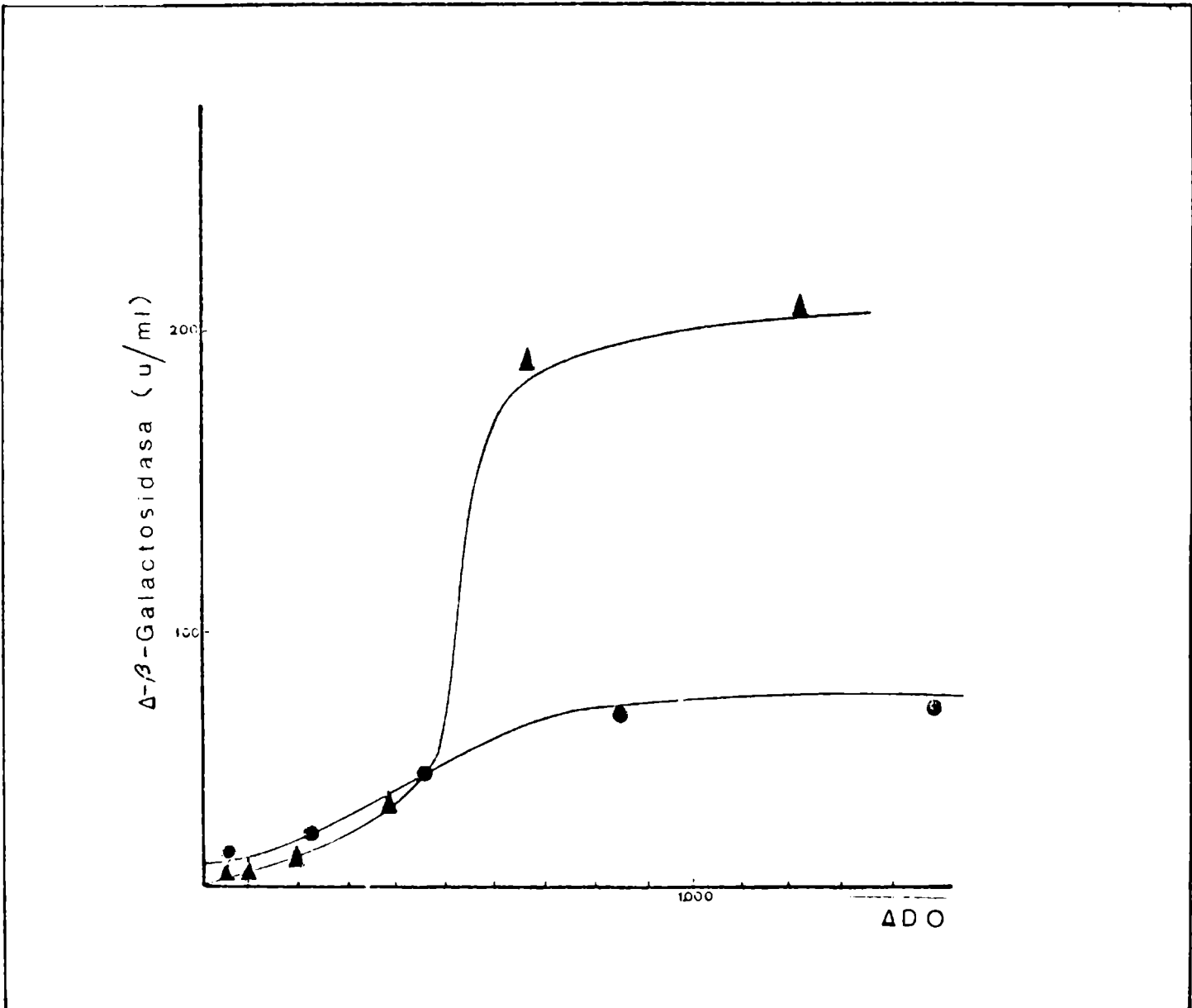


Figura 8: Traducción del ARN m lactosa (cepa 37R8/F'lac⁺ producido durante un pulso de inducción de 2 minutos. Durante el período de inducción la síntesis de proteínas fue parada por el agregado de clorafenicol. La traducción tuvo lugar en : ▲ glicerol, ● glucosa.

Figura 8



III.4 Cinéticas de inducción

Las cinéticas de inducción de 37R8 fueron comparadas en diferentes condiciones, tanto en los períodos ~~pre~~ pre como postinducción (II 8). Los resultados se encuentran en la figura 9.

Si los precultivos fueron realizados en glicerol la síntesis diferencial de β -galactosidasa no varía significativamente con las distintas fuentes de carbono adicionadas junto con el inductor. Por el contrario, si el precrecimiento tiene lugar en glucosa, una diferencia mucho más apreciable tiene lugar en la velocidad de síntesis enzimática.

El experimento control fue realizado con 20w0/F'lac⁺ (fig.10) y la síntesis diferencial de β -galactosidasa en diferentes condiciones y diferentes cepas, tabuladas en la tabla 3.

Tabla 3: Síntesis diferencial de β -galactosidasa ($\Delta Z/\Delta B$) en glucosa y glicerol luego de condiciones de precrecimiento diferentes.

Cepas	<u>Precrecimiento en glucosa</u>		<u>Precrecimiento en glicerol</u>	
	Inducción en glucosa	Inducción en glicerol	Inducción en glucosa	Inducción en glicerol
20w0/F' <u>lac</u> ⁺	50	1.000	100	1.700
37R8/F' <u>lac</u> ⁺	1.000	4.000	3.000	4.100

Se deduce de esta tabla que si bien 37R8 presenta un elevado nivel de resistencia a la represión catabólica, los resultados obtenidos luego de precrecimiento en glucosa señalan una resistencia sólo parcial, indicando que ciertos elementos citoplásmaticos que no son rápidamente recuperados o sintetizados participan en esta regulación.

Los resultados obtenidos con la mutante 37R8, en lo que concierne a cinéticas de inducción y de traducción, prueban que, evidentemente, debe haber similitud entre los mecanismos actuantes en polaridad y en represión catabólica.

Figura 9: Cinéticas de inducción de la cepa 37R8/F'lac⁺ después de precrecimiento en glicerol (símbolos abiertos) o glucosa (símbolos plenos). Precrecimiento en glicerol: Δ inducción en glicerol \circ inducción en glucosa; \times inductor agregado luego de un tiempo de generación de crecimiento en glucosa. Precrecimiento en glucosa: \blacktriangle inducción en glicerol; \bullet inducción en glucosa.

Figura 9

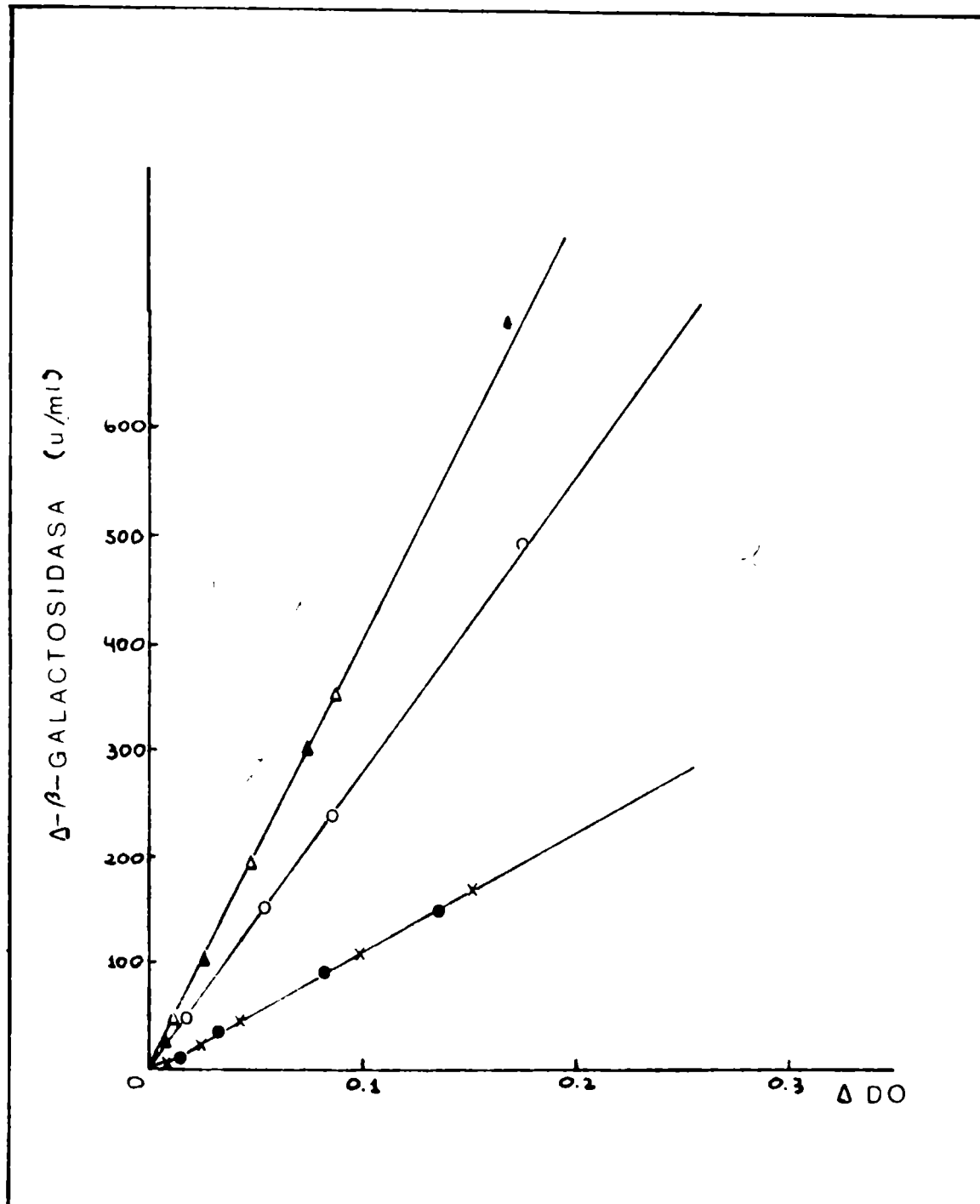
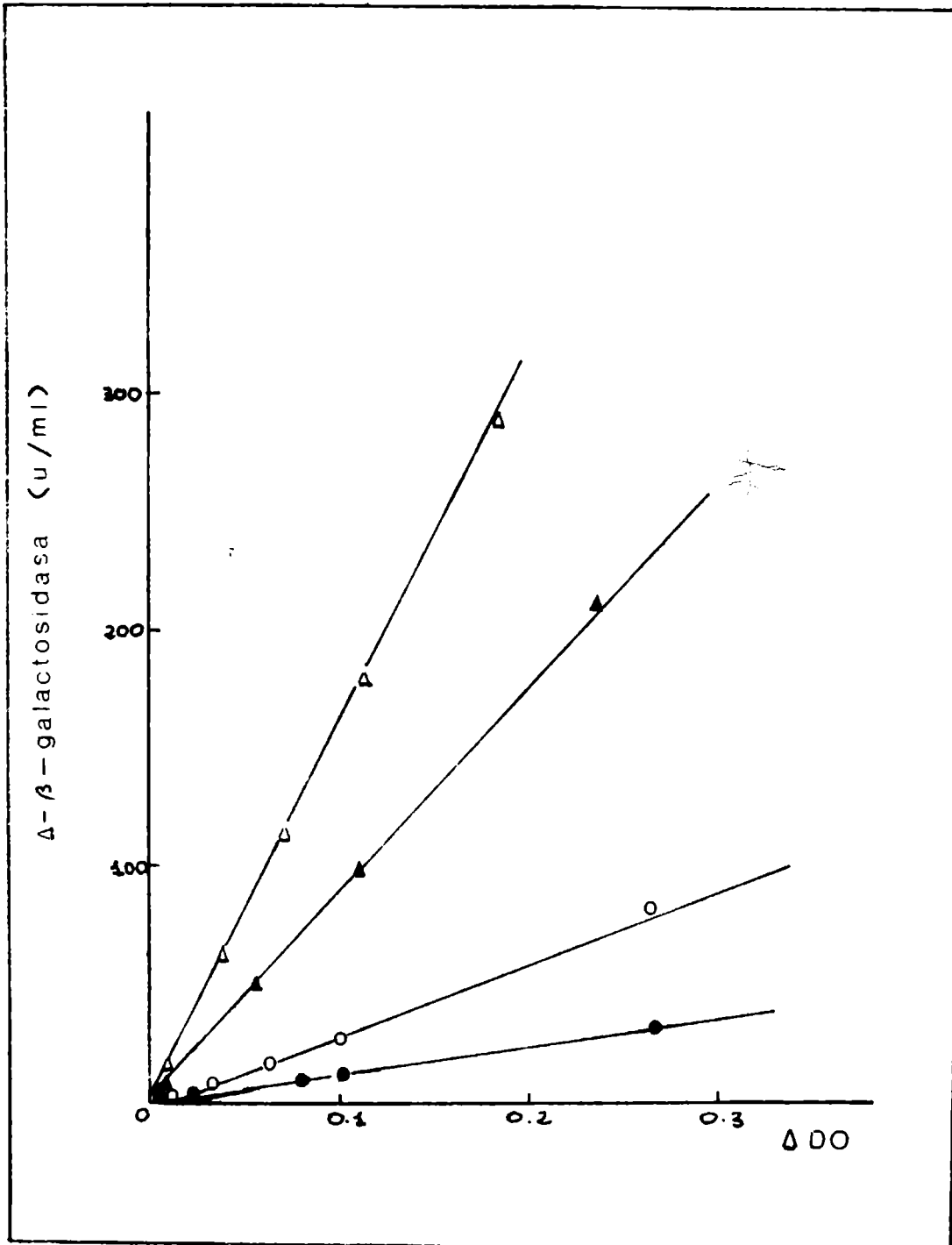


Figura 10: Cinéticas de inducción de 20ω0/F'lac⁺, después de precrecimiento en glicerol (símbolos abiertos) o glucosa (símbolos plenos). Precrecimiento en glicerol : Δ inducción en glicerol; ○ inducción en glucosa. Precrecimiento en glucosa : ● inducción en glicerol; ▲ inducción en glucosa.

Figura 10



III. 5 Inducción del mensajero lactosa en carencia de fuente de carbono y de aminoácidos.

Desde las primeras cinéticas de traducción realizadas, un hecho que llamó particularmente la atención, fue la gran estabilidad del mensajero lactosa. Dicho mensajero fue sintetizado en ausencia de síntesis de proteínas lograda por hambreado en aminoácidos o por la adición de un antibiótico. En esas condiciones, si bien la síntesis de macromoléculas se reduce la transcripción continúa tanto en cepas relajadas para la síntesis de ARNm como en cepas a control restringido (45). De esta manera se produce acumulación de mensajero, cuya traducción se reanuda con el crecimiento.

Nakada et al (46) señalaron que la presencia de una fuente de carbono, en condiciones de ayuno en aminoácidos, impide la transcripción de los genes lactosa. Como en nuestras experiencias, llevadas a cabo con fuente de carbono, la transcripción tuvo lugar, se procedió a variar las condiciones de ayuno para observar el comportamiento del mensajero durante su posterior traducción, con vista a aclarar estos resultados diferentes y hallar una explicación a la alta estabilidad observada.

La inducción de la cepa auxótrofa 2001 en condiciones de doble ayuno, se realizó de la forma descrita (II.9) y el

resultado que se observa en la figura 11, coincide con los descriptos anteriormente (46). La traducción del mensajero lactosa, medida como actividad de β -galactosidasa en función del tiempo alcanza el plateau en 20 minutos.

III.6 Inducción en carencia de aminoácidos

E.coli 2001 se cultivó en medio mínimo suplementado con treonina leucina, y glicerol y la inducción se realizó esta vez sólo en carencia de aminoácidos (condición A⁻). En la figura 12 se observa el resultado de esta experiencia, la síntesis enzimática se detiene luego de dos tiempos de generación. El mismo experimento fue llevado a cabo reemplazando treonina y leucina por ácidos casamino, y un resultado similar fue obtenida (fig.13).

La observación de ambos resultados, en condiciones de doble ayuno (fig.11) y ayuno simple (fig.12), lleva a las siguientes conclusiones : 1) al plateau se alcanza en un período de tiempo del orden de diez veces menor cuando la fuente de carbono está ausente. 2) La cantidad total de enzima producida es equivalente, sugiriendo que cantidades similares de mensajero han sido transcriptas en los dos casos.

Evidentemente, en el primer caso, la traducción ocurre inmediatamente una vez que el crecimiento se reanuda, mientras

Figura 11: Cinética de traducción del mensajero lactosa sintetizado en condiciones de ayuno en fuente de carbono y aminoácidos (condición AC^-). 2001 fue precrecido en M_1 -glicerol y los aminoácidos necesarios. Después de resuspensión en medio de crecimiento se graficó β -galactosidasa en función del tiempo.

Figura 11

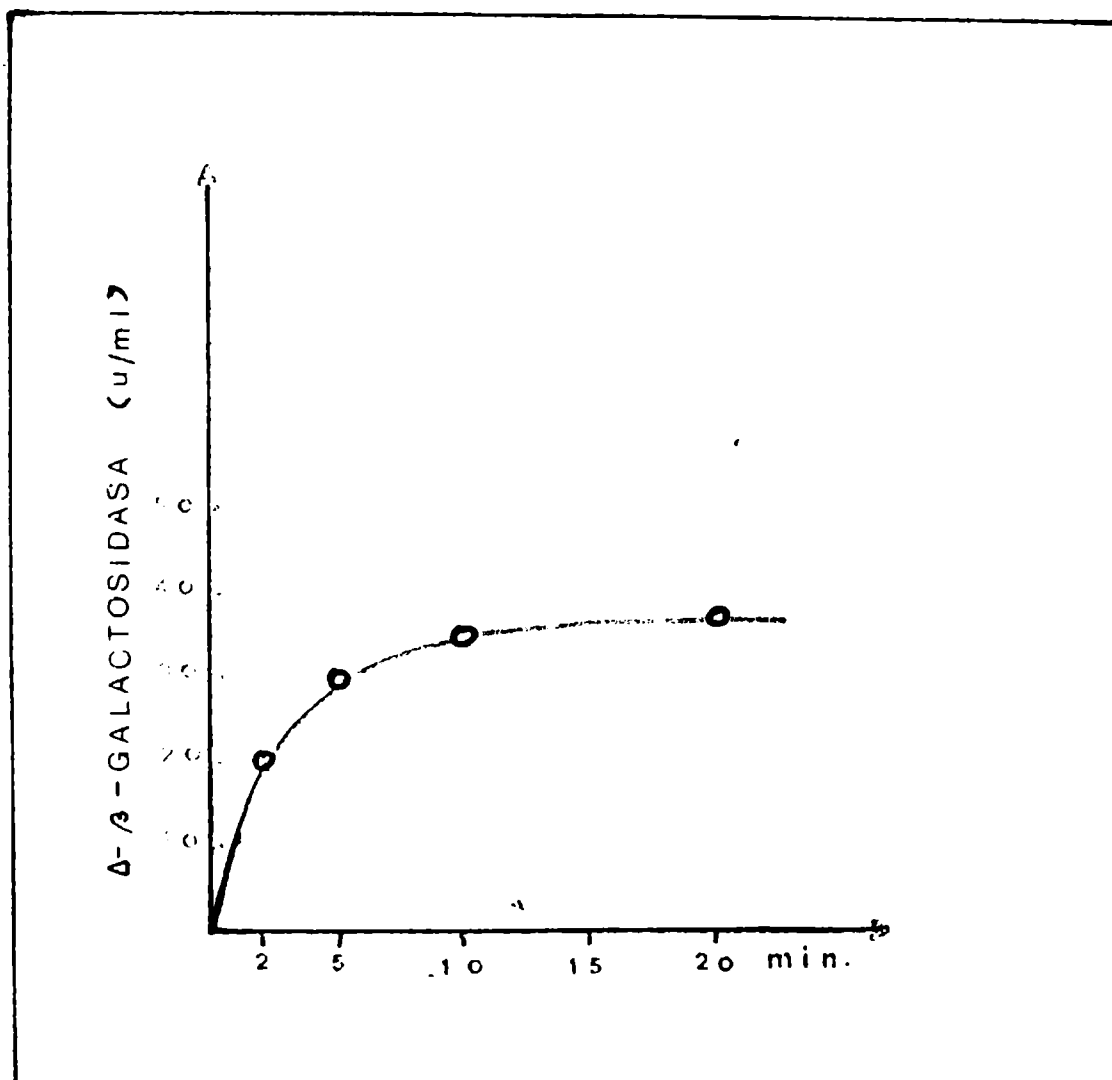


Figura 12: Traducción del mensajero lactosa sintetizado durante condiciones de ayuno simple (condición Λ^-). La misma cepa y procedimiento que en la figura 11 fueron utilizados, β -galactosidasa se graficó en función del tiempo luego de resuspensión en medio de crecimiento.

Figura 12

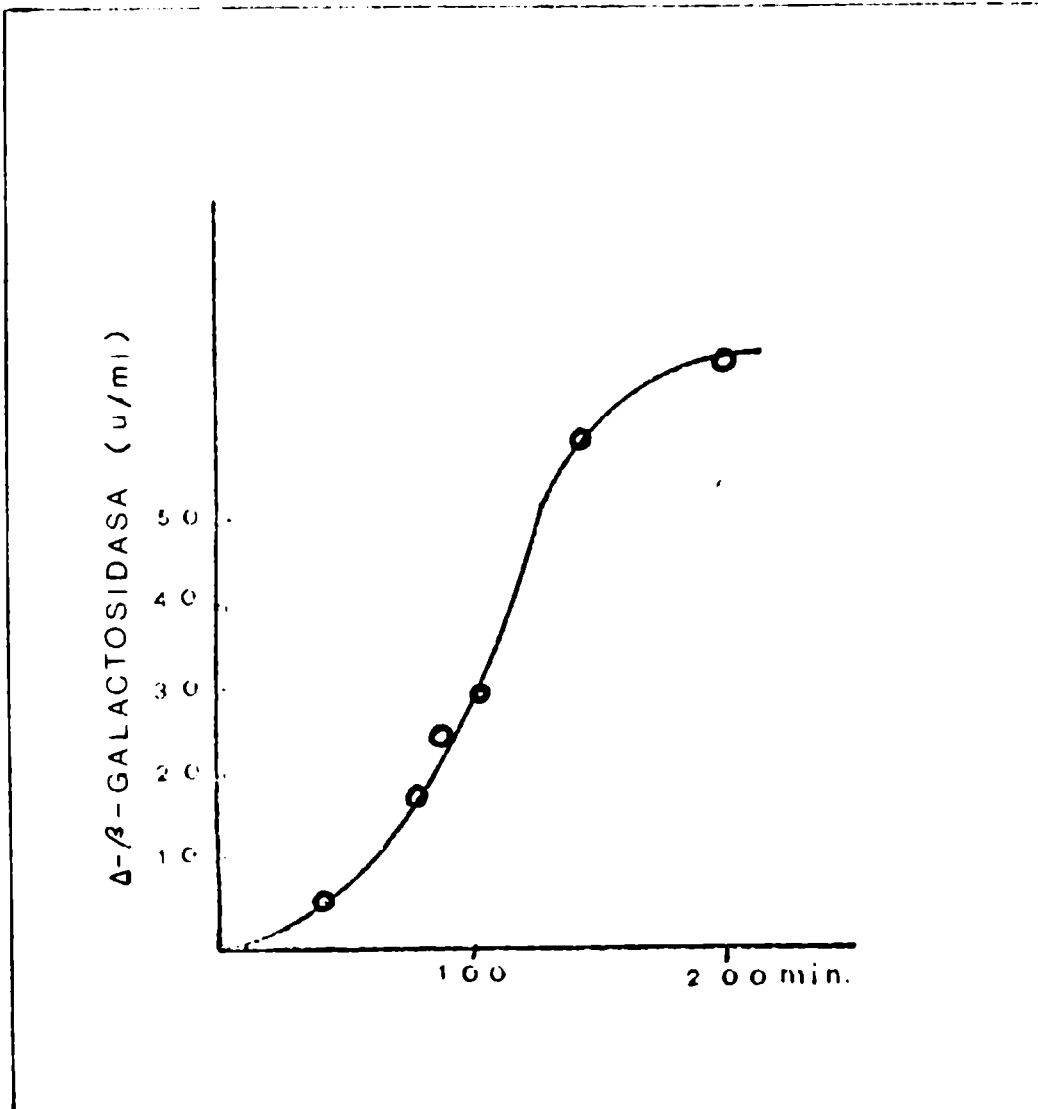
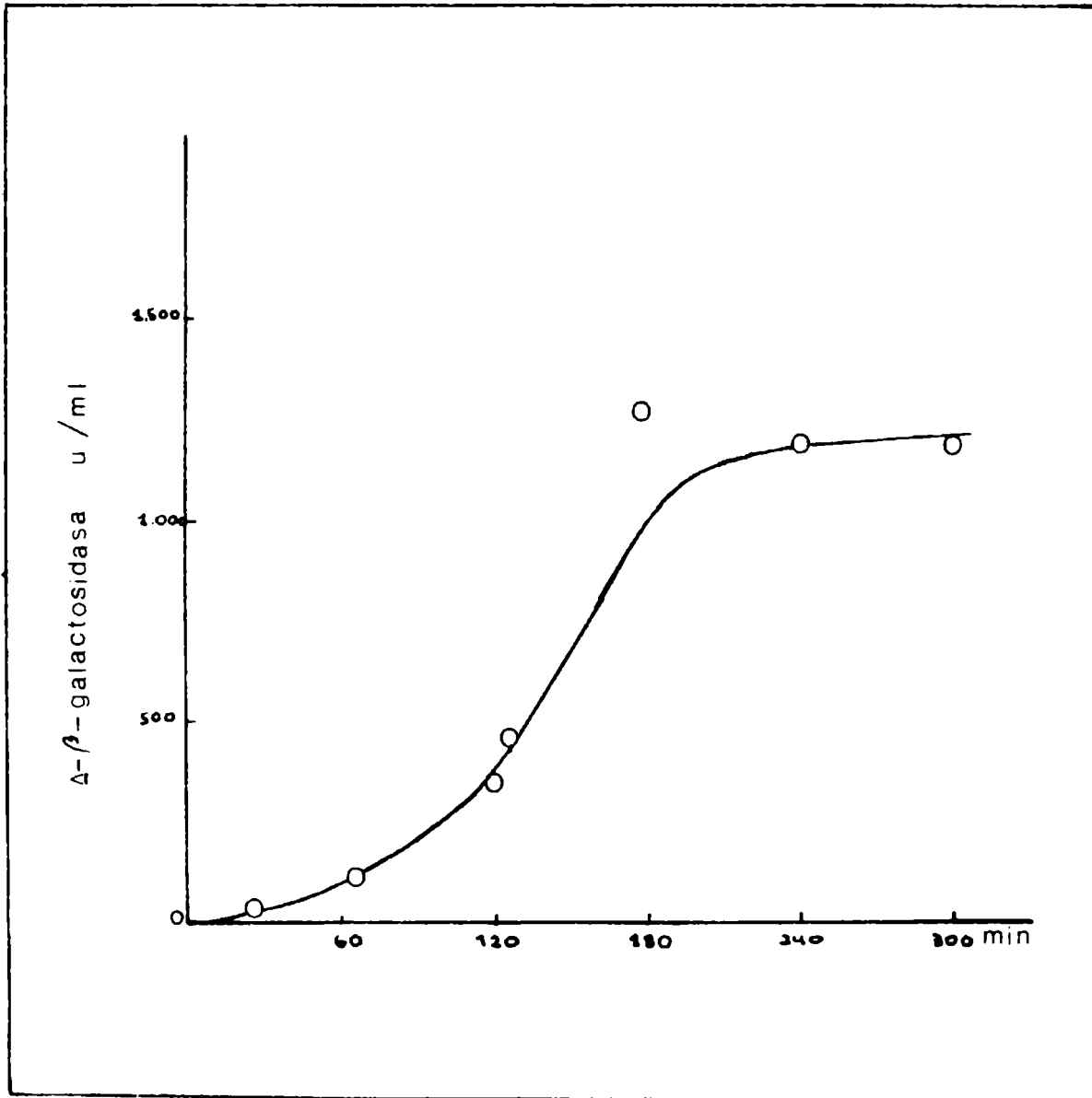


Figura 13 : Traducción del mensajero lactosa sintetizado durante condiciones de ayuno simple (A^-). Se utilizó ácido casamino 0,2% en lugar de treonina y leucina. 2001 se recolectó en la fase exponencial y la inducción se realizó en medio mínimo glicerol. Después de eliminar el inductor y restauración del crecimiento β -galactosidasa se midió y se graficó en función del tiempo

Figura 13



que, en el segundo caso, la cinética seguida es diferente. Cuando se representa la velocidad de síntesis enzimática y la velocidad de crecimiento ambas presentan una gráfica muy similar.

Esta particularidad llevó a pensar que con las condiciones de carencia utilizadas en la inducción (A^-), la posterior traducción del mensajero, pudiera estar acoplada a la síntesis de macromoléculas, especialmente la replicación del ADN, ya que por efecto de la carencia en aminoácidos la velocidad de la misma se ve disminuída y un porcentaje de ácido nucleico se ve sustraído a la maquinaria replicativa por el tiempo correspondiente hasta tres generaciones (47).

Para probar esta hipótesis se procedió a estudiar la traducción del mensajero lactosa transcripto a partir de dos unidades replicativas distintas: episoma y cromosoma.

III.7 Cinéticas de traducción de genes lac cromosómicos y plasmídicos.

Dos cepas de E.coli fueron utilizadas para esta experiencia, 2001 con la dotación lac cromosómica y 2x74/F'lac⁺ en el cual los genes lac son llevados en un plásmido, cuya integración es impedida por una delección lac en el cromosoma bacteriano. Las condiciones del experimento

están descriptas anteriormente (II.9 condición A⁻) y se graficó la síntesis enzimática en función del crecimiento bacteriano. Como se muestra en la figura 14 la cepa F'lac⁺ tiene una producción enzimática mayor que la cepa lac cromosómica en una relación 3:1. Con un plásmido F la replicación tiene lugar dos o tres veces por cada replicación cromosómica (48) por lo cual se puede pensar que este hecho es el responsable de los resultados obtenidos, y la diferencia en la velocidad de síntesis enzimática puede deberse:

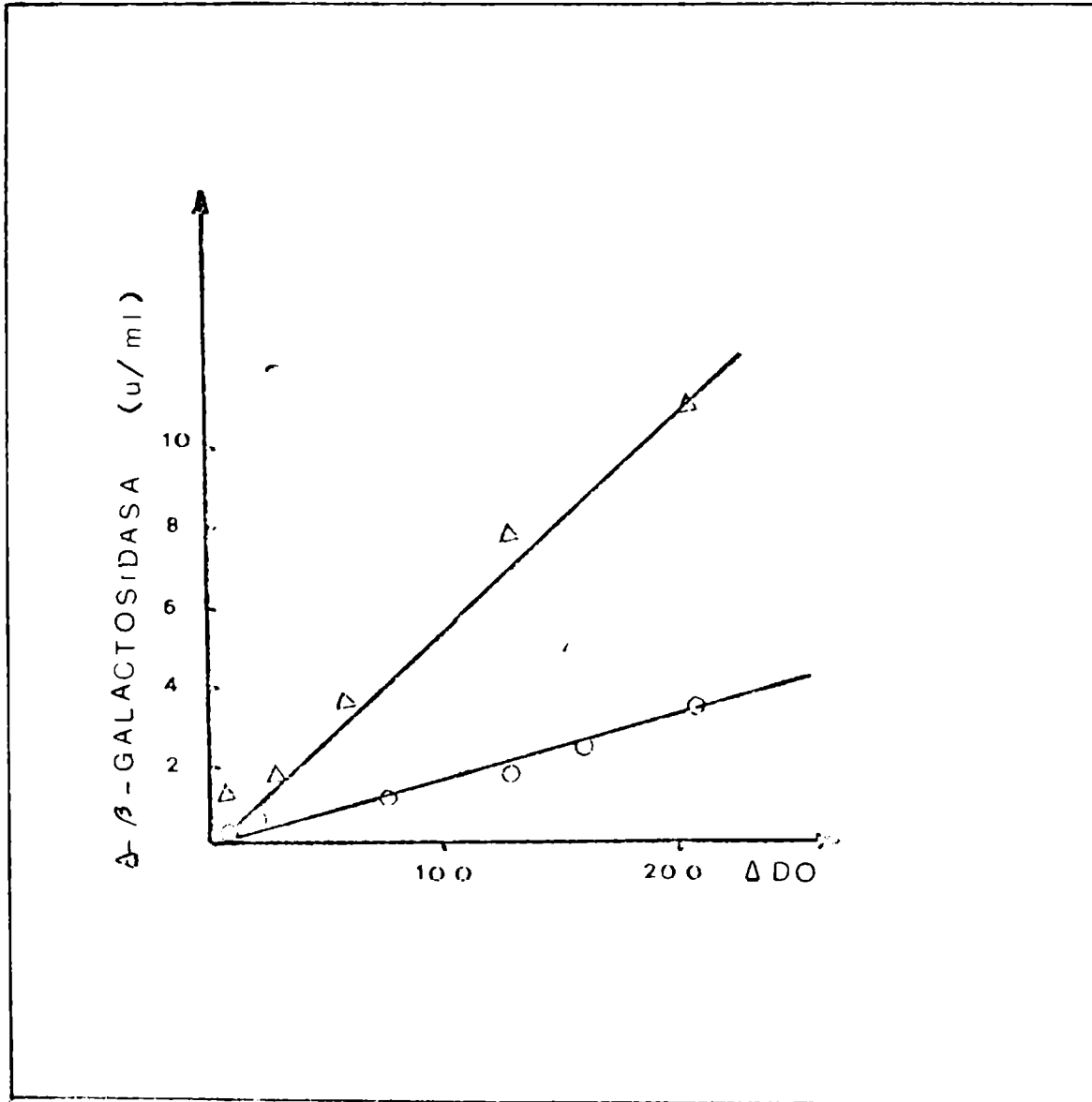
- 1) diferencias en la concentración del mensajero, efecto "gene-dosage"
- 2) El reconocimiento del RNAm por la maquinaria traductora no es el mismo en los dos casos.

Pero decidir entre las dos hipótesis se realizó el mismo experimento pero variando los tiempos de inducción en una relación 3:1 de manera de obtener cantidades similares de mensajero transcripto.

Es importante remarcar que para no perturbar la reiniciación de los ciclos de replicación una vez reanudado el crecimiento, las condiciones de ayuno fueron logradas por filtración por millipore y los lavados y la resuspensión se realizaron con medio precalentado a 37°C.

Figura 14: Se graficó β -galactosidasa vs. crecimiento después de una inducción de 5 minutos en condiciones de ayuno simple (A^-). \circ E.coli 2001 (lac cromosómico). Δ E.coli 2x74/F'lac⁺ (Δ lac / lac plasmídico).

Figura 14



En las condiciones experimentales utilizadas, cantidades similares de ARNm lactosa fueron obtenidas ya que la medición en cultivos de doce horas indicó valores casi iguales de enzima (22 y 18 unidades para la dotación lactosa episómica y cromosómica respectivamente). Las cinéticas de traducción, sin embargo son diferentes. En la figura 15 se puede observar que en el caso de genes lac episómicos, la síntesis de β -galactosidasa se produjo en forma discontinua, y el plateau se alcanzó en 300 minutos, en tanto que en el mismo período la cepa lac cromosómica ha producido 1/3 de dicho valor.

En gráfico semilogarítmico, se compararon la síntesis enzimática y el crecimiento bacteriano. Para 2001 se observó una velocidad similar en ambos casos. Por otra parte para $2x74/F'_{lac}^+$ la relación es 3:1., correspondiente a una onda de producción enzimática. Todos estos datos indican una relación entre la traducción del mensajero y el proceso de replicación. (Fig.16)

De los resultados presentados se puede concluir que en condiciones de ayuno en aminoácidos y en presencia de fuente de carbono existe síntesis de mensajero lactosa, sin embargo, la observación de la producción de β -galactosidasa a partir de genes lac localizados en distintas unidades replicativas, indica que cuando la inducción se realiza en dichas

Figura 15: Cinéticas de traducción del mensajero lactosa sintetizado durante condiciones simples de ayuno (A^-) por dos cepas que portan los determinantes lac en diferentes estructuras replicativas. ○ E.coli 2001 (lac cromosómico); △ E.coli 2x 74 / F'lac⁺ (lac plasmídico); fueron inducidas 9 min y 3 minutos respectivamente después de eliminar los aminoácidos por filtración con Millipore. El lavado para la remoción del inductor y la resuspensión en el medio de crecimiento fueron hechos en medio precalentado para no perturbar el proceso de replicación.

Figura 15

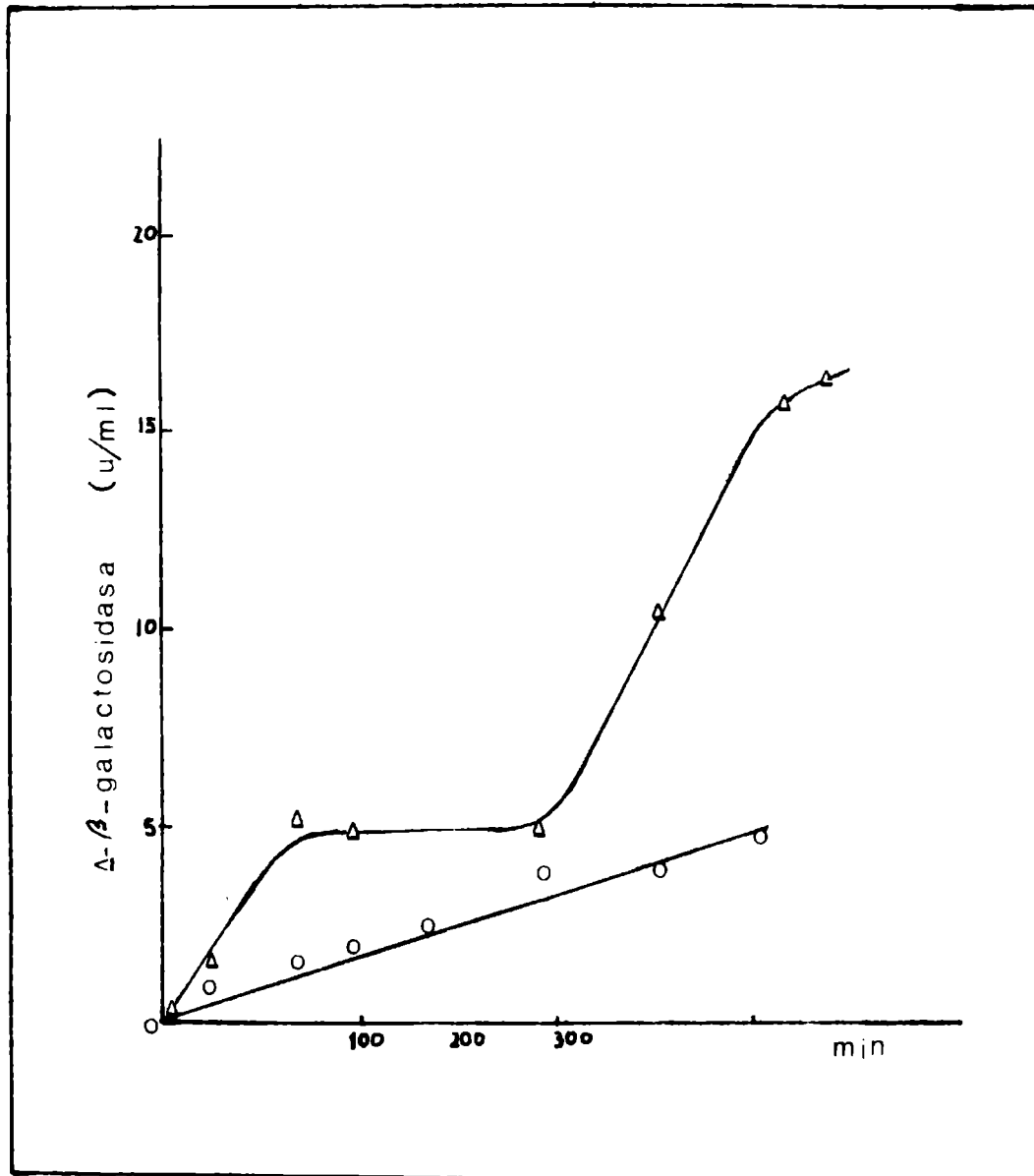
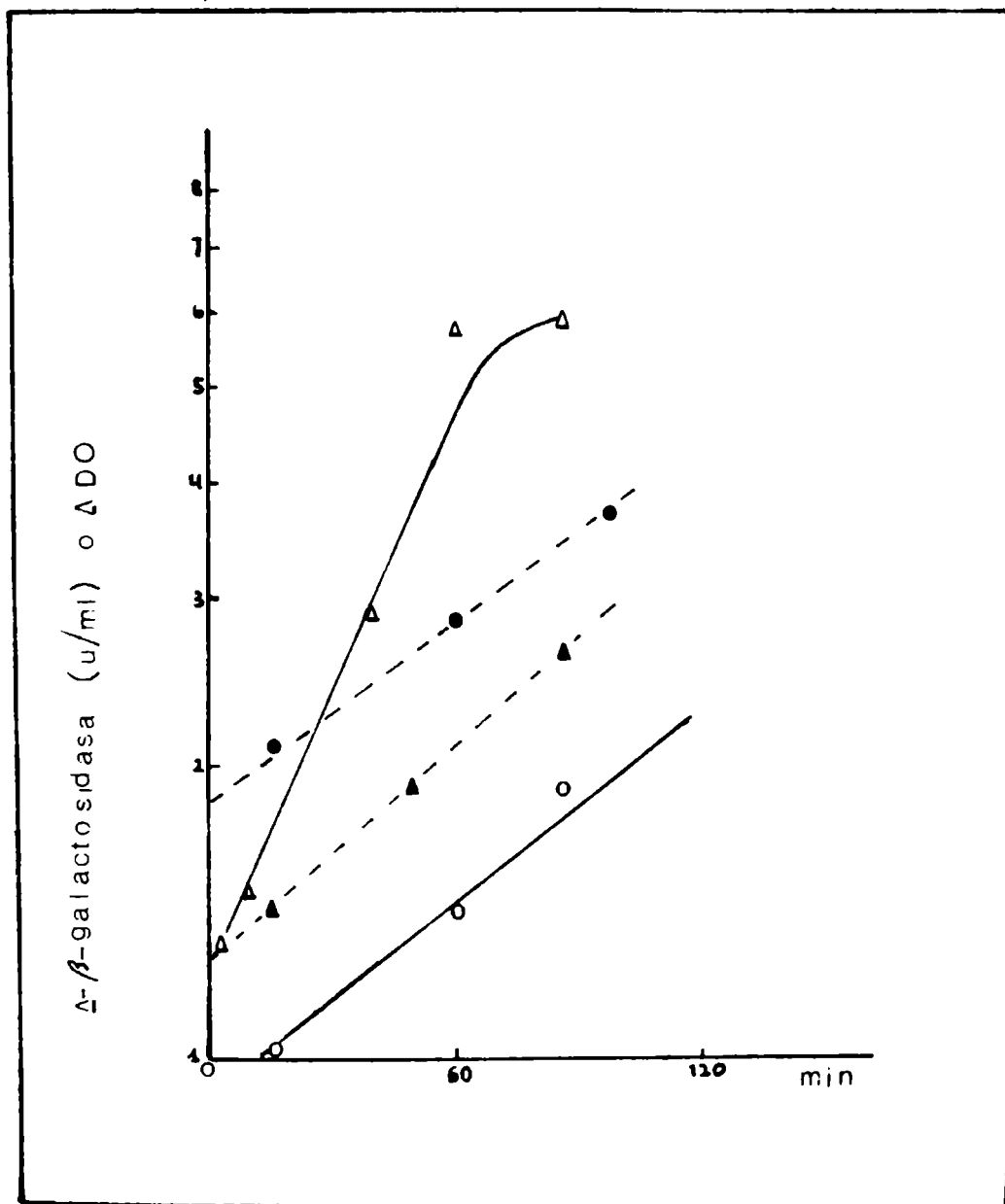


Figura 10: Representación de β -galactosidasa y crecimiento vs tiempo en gráfico semilogarítmico, del experimento descrito en la fig. 15. Las líneas quebradas y símbolos plenos representan curvas de crecimiento. Símbolos:
o E.coli 2001 , Δ E.coli 2x74/F₁lac⁺

Figura 16



condiciones, una correspondencia entre la traducción del mensajero y la replicación de su templado de ADN es la responsable de las cinéticas obtenidas .

El modelo que sugerimos para explicar estos hechos propone que, durante las condiciones de ayuno simple el ARNm inducido queda unido a su templado, y de esta manera protegido de la degradación, siendo traducido cuando su matriz de ADN se replica.

Resultados de trabajos anteriores apoyan esta hipótesis. Mensajeros estables han sido encontrados en cruces genéticos en condiciones de ayuno simple (condición A⁻) y no de ayuno doble (condición AC⁻) (48). En distintos sistemas se han detectado ARNm estables, siendo explicado dicha estabilidad por su unión a ADN o membranas (50,51).

C A P I T U L O IV

RESUMEN , DISCUSION , PERSPECTIVAS

A pesar de la vasta información acumulada sobre la represión catabólica, poco se conoce sobre su mecanismo molecular, y las evidencias presentadas son a menudo contradictorias. Como se ha mencionado anteriormente, el AMPc y su proteína receptora actúan como mediadores de este efecto, siendo su lugar genético de acción el promotor lactosa. Pero ciertas líneas de investigación, en distintas condiciones experimentales, llevaron a mostrar que el fenómeno de represión y el rol del AMPc en el mismo no podían explicarse totalmente por un modelo de regulación positiva. Por ejemplo, la represión catabólica persiste en mutantes de E.coli que llevan deleciones de las regiones que controlan la transcripción en el sistema lactosa (33), lo que excluye la posibilidad de una única regulación a nivel de la síntesis del mensajero. Además cuando se observa la síntesis residual de β -galactosidasa,

luego de bloquear la transcripción por distintas inhibidores, la adición de glucosa produce una disminución de la síntesis (30) y el agregado de AMPc estimula la traducción del mensajero lactosa (34).

En este trabajo las etapas de transcripción y traducción fueron separadas y se observó la acción producida por distintos catalizadores en esta última. Los resultados obtenidos muestran elocuentemente que cuando ambos procesos están desacoplados, la eficiencia diferente en la traducción del mensajero lactosa depende de la fuente de carbono utilizada en dicha etapa. El método utilizado para bloquear la biosíntesis de proteínas no influye sobre este resultado, si bien como se señaló anteriormente, la concentración de clorafenicol (5 ug/ml) resultó crítico para observar la posterior producción de β -galactosidasa.

En base a trabajos presentados anteriormente (39,52), donde se señaló una descoordinación en la velocidad de síntesis de las enzimas del operón lactosa en condiciones de fuente represión catabólica, se postuló que en presencia de glucosa el mRNA es más activamente degradado, por lo cual se pensó la posibilidad de la existencia de un mecanismo similar al que opera en el fenómeno de la polaridad. Es por eso que se decidió observar el comportamiento del mensajero

lactosa en mutantes supresoras de la polaridad del tipo puA. En dichas mutantes el mensajero es protegido de la degradación probablemente por la falta de una endonucleasa involucrada en dicho proceso. La mutante 37R8, obtenida a partir de una cepa polar extrema en el gen Z, como las del tipo puA, mapea en las proximidades del minuto 73 en el mapa de Taylor y ~~restaura~~ la actividad de los genes distales del operón lactosa y no de la β -galactosidasa. Cuando se realizan las cinéticas de traducción en 37R8 se vió que el ARNm lactosa se traduce en glucosa tan eficientemente como en glicerol, lo que confirma la hipótesis de algún mecanismo común a la polaridad y a la represión catabólica. Sin embargo, es de notar que dicha mutante escapa a esa regulación sólo en determinadas condiciones. En efecto, el resultado obtenido cuando se somete a la mutante a pulsos de inducción más largos, o las cinéticas de inducción, luego de precrecimiento en glucosa, indican que hay otros factores, que deben jugar un rol en esta regulación, como ser la accesibilidad del mensajero a las nucleasas, o componentes citoplasmáticos que no son rápidamente recuperados o sintetizados.

En las condiciones experimentales utilizadas la traducción del mensajero es inesperadamente larga, dos o tres generaciones son necesarias para obtener una traducción completa. Las cinéticas obtenidas plantearon la importancia de la estabilidad del mensajero y es por eso que se diseñaron experimentos para elucidar el problema. Se pensó que una peculiar localización del mensajero era responsable de este hecho. Trabajos anteriores (53,54) establecieron que el mensajero naciente puede estar distribuido en membranas, unido al ADN y (o) a polisomas de donde se deduce que puede ser degradado de distintas maneras de acuerdo a su localización.

El primer hecho observado fue que las distintas cinéticas de traducción dependen de las condiciones de ayuno durante la inducción. Nakada et al (46) señalaron que la transcripción del mensajero lactosa no tiene lugar en ayuno de aminoácidos y presencia de una fuente de carbono. Si la misma no está presente la traducción del mensajero lactosa ocurre inmediatamente cuando se restaura el crecimiento. Este resultado indica que en condiciones de doble ayuno el mensajero permanece unido a ribosomas y puede iniciarse enseguida la traducción(55). En este trabajo se diseñaron

experimentos que indicaron que la presencia de una fuente de carbono determina una cinética particular con un largo período de latencia . Es justamente ese período el que explica la discrepancia con los datos señalados anteriormente que señalaban ausencia de transcripción.

La velocidad de replicación de ADN se ve disminuída por un ayuno previo en aminoácidos (47,56), esto señaló la posibilidad que la traducción del mensajero lactosa estuviese asociada a ese proceso. Los resultados obtenidos en condiciones de ayuno simple con dotaciones lactosa llevadas por distintas unidades replicativas confirmaron esta hipótesis. Con un plásmido F'lac⁺ del que existen tres copias por cromosoma (48,57), se constata que durante las dos primeras generaciones la producción enzimática de los genes lac plasmídicos con respecto a los situados en el cromosoma guarda una relación 3:1. El ARNm lactosa quedaría asociado a ADN traduciéndose al producirse la replicación de su templado.

La existencia de ARNm de origen procariote estables ha sido previamente señalada (50; 51) y dicha estabilidad explicada por la unión a ADN_c membranas.

En este trabajo queda claramente demostrado que existe una regulación a nivel de traducción en la represión catabólica y analogías con el fenómeno de polaridad. Además se

señala la importancia que la estabilidad del mensajero juega en el proceso, estabilidad que depende de su peculiar localización.

Todos los resultados obtenidos indican que la traducción tiene un peso no despreciable en el control de la expresión genética. Contrariamente al control a nivel de transcripción que se ha descrito en modelos moleculares para algunos sistemas, en el caso del control translacional salvo para fagos ARN, la información obtenida no alcanza todavía a formularse en términos moleculares.

En sistemas procariotas existen evidencias, como las presentadas en este trabajo que señalan el papel de la traducción en la modulación de la expresión genética. Datos sobre elementos citoplasmáticos como factores de iniciación y factores de acoplamiento, y selección de mensajeros por la maquinaria traductiva, deben ser conocidos para aclarar el mecanismo molecular de la represión catabólica y contribuir a la elucidación del problema más general del control a nivel de traducción.

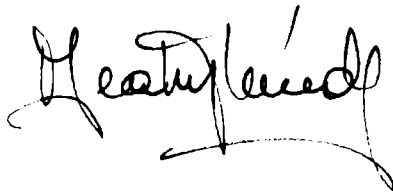
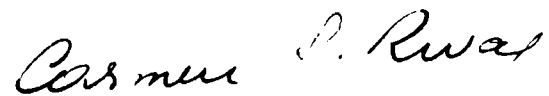
Recientemente varios resultados han aumentado la información sobre este tema. El hallazgo de secuencias en el ARNr 16S, complementarias de las secuencias correspondientes a los sitios de unión a ribosomas en varios fagos

ARN(58), señala el reconocimiento de mensajeros por la maquinaria traductora mediante una interacción ARN-ARN. Evidencias de secuencias complementarias a las del ARNr 16S, llamadas Shine-Dalgarno, se señalaron también en un fago ADN, T₄, (59). Yendo aún más lejos en este tipo de experimentos se encontró (60) que la presencia de factores de iniciación y de la proteína ribosomal S₁, favorecen en distintos grado la unión a ribosomas de los distintos cistrones de R₁₇, siendo esta estimulación indirectamente proporcional a la extensión de la complementariedad ARNm-ARNr. De esta manera es posible que la disponibilidad de factores de iniciación y proteínas ribosomales afecten la especificidad de la traducción. Cualquier cambio en el estado fisiológico de una bacteria podría entonces alterar su modo de traducción.

Una nueva forma de control translacional ha sido descrita para el represor del bacteriofago λ . Una misma secuencia de ADN podría ser transcripta con o sin su secuencia de afinidad a ribosomas, según el promotor al cual se fijase la polimerasa dependiendo de este hecho la afectividad de su traducción.(61).

Todos estos datos indican, no sólomente la variedad de posibilidades de regulación de la célula procariota, sino

también que no parece muy lejana la formulación de modelos moleculares de control translacional. La necesidad de poder establecerlos en sistemas procariotas es de gran importancia dado que se puede especular que en las células eucariotas, donde la vida media del mensajero es relativamente larga, la regulación de la síntesis de las enzimas específicas se cumple principalmente a nivel post-transcripcional.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Healy". The script is cursive and somewhat stylized, with a long horizontal stroke at the bottom.A handwritten signature in black ink, appearing to read "Carmen P. Rivas". The script is cursive and elegant, with a clear separation between the first and last names.

BIBLIOGRAFIA

1. ANFINSEN, C.E. 1973 Principles that govern the folding of proteins chains. Science 181, 223-230.
2. TAYLOR, A.L. 1970 Current linkage map of Escherichia coli. Bact.Rev. 34, 155-175.
3. SANDERSON, K. 1972 Linkage map of Salmonelle typhimurium Edition IV. Bact.Rev. 36, 558-586.
4. JACOB, F. and MONOD, J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J.Mol.Biol. 3, 318-150.
5. ZAMENHOF, S. and EICHHORN, H.H. 1967. Study of microbial evolution through loss of biosynthetic functions. Establishment of "defective" mutants. Nature (London) 216, 456-458.
6. KUMAR, S. and SZYBALSKI, W. 1969. Orientation of transcription of the lac operon and its repressor gene in Escherichia coli J.Mol. Biol. 40, 145-151.
7. MILLER, J.H. IPPEN, K. SCAIFE, J.G. and DECKWITH, J. 1968. The promoter-operator region of the lac operon of Escherichia coli J.Mol.Biol. 38, 413-420
8. JOBE, A. and BOURGEOIS, S. 1972. Lac repressor-operator interaction VI. The natural inducer of the lac operon J.Mol.Biol. 69, 397-408.

9. HSU, W. and WEISS, S.B. 1969. Selective translation of T₄ template RNA by ribosomes from T₄ infected Escherichia coli. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 64, 345-351.
10. STEITZ, J.A. 1969. Polypeptide chain initiation. Nucleotide sequences of the three ribosomal binding sites in bacteriophage R₁₇ RNA. Nature (London) 224. 957-964.
11. SKOGERSON, H., ROUFE, D. and LEDER, P. 1971. Characterization of the initial peptide of QB RNA polymerase and control of its synthesis. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68, 276-279.
12. LAVALLE, R. and De HAUWER, L. 1970. Tryptophan messenger translation in Escherichia coli J. Mol. Biol. 51, 435-447.
13. LAVALLE, R. 1970. Regulation at the level of translation in the arginine pathway of Escherichia coli K₁₂ J. Mol. Biol. 51, 449-451.
14. McCLELLAN, W.L. and VOGEL, H.J. 1972 Translational and transcriptional components of repression by arginine in Escherichia coli. Biochem Biophys. Res. Commun 55, 1385-1389.

15. HERRLICH,P. and SCHWEIGER,M. 1976. Nitrofurans, a group of Synthetic antibiotics with a new mode of action: Discrimination of specific messenger RNA classes. Proc. Nat.Acad.Sci . U.S.A. 73, 3386-3390.
16. KENNEDY,N.BEUTIN,L., ACHTMAN,M., SKURRAY,P., RAHMSDORF,U. and HERRLICH,P. (1977).Conjugation proteins encoded by the F sex Factor.Nature (London) 270, 580-585.
17. EPPS,H. and GALE,E.F.1942. The influence of the presence of glucose during growth on the enzymic activities of Escherichia coli. Comparison of the effect with that produced by fermentation of acids. Biochem.J.36, 619-623.
18. MONOD, J. 1947. The phenomenon of enzymatic adaptation. Growth 11, 223-289.
19. EPSTEIN,W.,NAONO,S. and GROS,F.1966. Synthesis of enzymes of the lac operon during diauxic growth of Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun 24, 588-592.
20. MAGASANIK,B.1961. Cofabolite repression. Cold.Spring. Harbor Symp.Quant.Biol. 26, 249-256.
21. TYLER,B.,LOOMIS,W.F.J. and MAGASANIK,B.1967. Transient repression of the lac operon J.Bacteriol 94, 2001-2011 .

22. PERLMAN,R., de CROMBURGGHE,B. and PASTAN,I. 1969. Cyclic AMP regulates catabolite and transient repression in E.coli Nature 223, 810-812
23. PASTAN,I.and PERLMAN,R. 1968. The role of the lac promoter locus in the regulation of β -galactosidase synthesis by cyclic 3'.5' -adenosine monophosphate. Proc.Nat.Acad. Sci.U.S.A. 61, 1336-1342.
24. de CROMBURGGHE,B.,CHEN,B., ANDERSON,W.,NISSLEY,P., GOTTEBMAN,M.,PASTAN,I. and PERLMAN,R. 1971.lac DNA,RNA polymerase and cyclic AMP receptor protein, cyclic AMP,lac repressor and inducer are the essential elements for controlled lac transcription. Nature (London), New Biol.231 139-142.
25. PETIT-KOSKAS,E. and Contesse,G. 1976. Stimulation in Trans. of synthesis of E.coli gal operon enzymes by lamboid phages during low catabolite repression. Molec. gen. Genet. 143 203-209.
26. MAKHAN,R.and SUTHERLAND,E. 1965. Adenosine 3',5'-phosphate in Escherichia coli.J.Biol.Chem.240, 1309-1312.

27. MAGASANIK, B. Glucose effects: Inducer exclusion and repression, pp. 189-218. Ed: D. Zipsen and J.R. Beckwith, The lac operon, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1970
28. HAUGE, J.H. MAC QUILLAN, A.M., CLINE, A.L. and HALVORSON, H.O. 1961. The effect of glucose repression on the level of ribosomal bound of α -glucosidase. Biochem. biophys. Res. Commun. 5, 267-269.
29. KHAIRALLAH, E.A. and PITTT, H.C. 1967. 3',5'-cyclic AMP and the release of polysome of bound proteins in vitro. Biochem. biophys. Res. Commun. 29, 269-274
30. YUDKIN, M.D. and MOSES V. 1969. Catabolite repression of the lac operon. Repression of translation. Biochem. J. 113, 423-427.
31. ABOUD, M. and BURGER, M. 1970. The effect of catabolite repression and of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate on the Translation of the lactose messenger RNA in Escherichia coli. Biochem. biophys. Res. Commun. 38, 1023-1032.
32. PASTAN, I. and PERLMAN, R. 1969. Stimulation of tryptophanase **synthesis** in Escherichia coli by 3',5'-adenosine monophosphate. J. Biol. Chem. 224, 2226-2228.

33. MOSES, V. and YUDKIN, M.D. 1968. Catabolite repression in Escherichia coli . A study of two hypothesis Biochem, J. 110, 135-142.
34. ABOUD, M. and BURGER, M. 1971. Accumulation of untranslated lactose-specific messenger ribonucleic acid during catabolite repression in Escherichia coli. Biochem, J. 122, 219-224
35. BECKWITH, J. 1963. Restoration of operon activity by suppressors Biochem. biophys. Acta (Amst) 76, 162-164
36. HORIUCHI, T., TOMIZAWA, J.I. and NOVICK, A. 1962 . Isolation and properties of bacteria capable of high rates of β -galactosidase synthesis. Biochem biophys. Acta (Amst) 55, 152-163
37. KEPES, A. 1960. Etudes cinétiques sur la galactosidase perméase d' Escherichia coli . Biochem. biophys. Acta (Amst) 40, 70-72.
38. KAEMPFER, R.O.R. and MAGASANIK, B. 1967. Mechanism of β -galactosidase induction J. Mol. Biol. 27 475-479.
39. SANCHEZ de RIVAS, C. 1968 . Etude de l'effet glucose sur l'opéron lactose d' Escherichia coli K₁₂ . These Université de Paris.

40. MORSE, D.E. and YANOFSKY, C. 1969. Polarity in degradation of mRNA. *Nature (Lond)* 224, 329-331.
41. HIRAGA, S. and YANOFSKY, C. 1972. Hyper-labile messenger RNA in polar mutants of the tryptophan operon of Escherichia coli *J.Mol.Biol.* 72, 103-
42. MORSE, D.E. and PRIMAKOFF, P. 1970. Relief of polarity in E.coli by su A. *Nature (Lond)*. 226, 28-32
43. KUWANO, M. SCHLESSINGER, D. and MORSE, D.E. 1971. Loss of dispensable endonuclease activity in relief of polarity by su A *Nature (Lond)*. *New Biol.* 231, 214-
44. MORSE, D.E. and GUERTIN, M. 1971. Regulation of mRNA utilization and degradation by amino acid starvation *Nature (Lond)* *New Biol.* 232, 165
45. LAZZARINI, R.A. and DALBERG, A.E. 1971. The control of ribonucleic acid synthesis during amino acid deprivation in Escherichia coli. *J.Biol. Chem.* 246, 420-429.
46. NAKADA, D. and MAGASNIK, B. 1964. The roles of inducer and catabolite repressor in the synthesis of β -galactosidase by Escherichia coli, *J. Mol.Biol.* 8, 105-127.

47. BILLEN, D. and HEWITT, R. 1960. Influence of starvation for methionine and other aminoacids on subsequent bacterial deoxiribonucleic acid replication J. Lact. 92 , 609-617.
48. PRITCHARD, R.H., CHANDLER, M.G. and COLLINS, J. 1975. Independence of F replication and chromosome replication in Escherichia coli , Molec.gen. Genet. 138, 143-155.
49. LEAL, J. (1970) Effect of glucose starvation on the expression of transferred tox genes in Escherichia coli K₁₂ zygotes Molec.gen. Genet. 147 , 53-58.
50. LEVY, S.B. (1975) Very stable prokaryotic messenger RNA in chromosomeless Escherichia coli minicells. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash) 72, 2900-2904.
51. SUMMER, W.C. (1970) The process of infection with coliphage T₇ II. Stability of RNA in bacteriophage-infected cells, J. Molec. Biol. 50, 671-678.
52. CONTESSE, G., CREPIN, M., GROS, F., ULLMANN, A. and MONOD, J. On the mechanism of catabolite repression, pp. 401-416. Ed: D. Zipser and J.R. DECKWITH, The lac operon . New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1970.

53. GIERER, L. 1973 N Nascent ribosomal and messenger RNA in DNA-membrane- complexes of Escherichia coli Molec.gen.Genet. 125, 173-181.
54. RICHARDSON, J.P. 1975 Attachment of nascent RNA molecules to superhelical DNA. J.Molec.Biol. 58, 565-579.
55. CURGO, C. CRAIG, E. SCHLESSINGER, D., AFOLAYAN, A. 1971. Polyribosome metabolism in Escherichia coli starved for an amino acid, J. molec. Biol. 62 . 525-535.
56. COPELAND, F.C., PHILLIPS, S.F., MAO, M.W.H. 1976. Effect of amino acid starvation on chromosome replication in Bacillus subtilis. Microbiology ed. D.Schlessinger, pp. 70-82.
57. FRAME, R. BISHOP, J.O. 1971. The number of sex factors per chromosome in Escherichia coli. Bio. Chem. J. 121, 93-103.
58. SHINE, J. and DALGARNO, L. (1974) The 3'-Terminal sequence of Escherichia coli 16 S ribosomal RNA. Complementary to nonsense triplets and ribosomes binding sites. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 1342-1346.
59. SWEBILIUS SURGER, B. and GOLD, L. (1976). A mutations that confers temperature sensitivity on the translation of ³²P II B in bacteriophage T₄. J. molec. Biol. 103, 627-646.

60. STEITZ, KJ., WAHBA, A., LAUGHREA, M. and MOORE, P. (1977)
Differential requirements for polypeptide chain initiation complex formation at the three bacteriophage Φ_{17} initiation regions. Nucleic Acid Res. 4, 1-15.
61. HUMAYUN, Z., MEYER, B., SAVER, R., BACKMAN, K. and PTASHNE, H.
Transcriptional and translational control of the λ repressor gene (c I). pp. 67-73. In D. Nierlich, W. Rutter and C. Fred Fox, Molecular mechanisms in the control of gene expression. Academic Press, Inc. New York 1976.