

Efecto de la glucosa sobre la expresión aeróbica de una fusión de operón genómica *moa::lac* en *Escherichia coli* K12

Mariemma Ortega de López

Laboratorio de Organización y Expresión del Gen (O.E.G.). Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

Resumen

Los operones *moa* y *moe* de *Escherichia coli* determinan la biosíntesis de la molibdopterina, en las primeras etapas del metabolismo del molibdocofactor, MoCo. En estudios previos usando una fusión transcripcional, las condiciones de cultivo modularon el nivel de expresión del operón *moa* y el crecimiento a expensas de glucosa lo redujeron. Este último efecto se investigó en el presente trabajo, realizando cinéticas aeróbicas de crecimiento y actividad enzimática β Gal. La glucosa ejerció una represión transitoria que se acentuó con el tiempo de cultivo y retardó el comienzo de la expresión máxima; además el nivel de expresión disminuía al aumentar la concentración de ese azúcar. La represión permanente fue severa durante los primeros 90 minutos, pero disminuyó a lo largo del crecimiento exponencial; en presencia de AMPc exógeno, el nivel de expresión alcanzado incrementó parcial y tardíamente. Los resultados demostraron que la glucosa reprime la expresión transcripcional de a fusión *moa::lac*. Además, permiten proponer un circuito de control positivo, cuya eficiencia incrementa con el crecimiento del cultivo donde el complejo regulador AMPc-CAP actuaría cuando se alcanza la fase estacionaria.

Palabras clave: Regulación MoCo; expresión *moa::lac*; represión catabólica *moa*; glucosa *moa*.

Abstract

Glucose effect on the aerobic expression of a genomic *moa::lac* operon fusion in *Escherichia coli* K12

In *Escherichia coli*, the *moa* and *moe* operons determine the molybdopterine biosynthesis during the first stages of the molybdocofactor metabolism, MoCo. In previous studies by using a transcriptional fusion, the expression level of the *moa* operon was modulated by the culture conditions and reduced by growing at the expense of glucose. In the present work, this later effect was researched by monitoring aerobic kinetics of both: growth and enzymatic β Gal activity. The glucose carried out a transient repression which was prominent with the culture time and delayed the start of the maximum expression; in addition, by increasing that the sugar concentration the expression level was decreased. During the first 90 minutes, the permanent repression was strong but decreased along the exponential growth; in the presence of cAMP exogenous, the expression level was partial and lately increased. The results demonstrated that glucose repress the *moa::lac* fusion transcriptional expression. In addition, they allow to propose a positive control circuit which efficiency is increased with the culture growth, and where the CAP-cAMP regulatory complex could act when the stationary phase is reached.

Key words: MoCo regulation; *moa::lac* expression; *moa* catabolic repression; *moa* glucose

INTRODUCCIÓN

El efecto represor de la glucosa en *Escherichia coli* K12 fue reportado originalmente sobre la biosíntesis de la β -galactosidasa (β Gal.) por Monod (1949). Recibió el nombre de represión catabólica por Magasanik (1961), quien posteriormente lo explicó a través de tres mecanismos distintos: i. Exclusión del inductor desde el interior celular, u. Represión fuerte pero transitoria, cuando la glucosa es añadida a células creciendo con una fuente de carbono diferente (represión transitoria) y iii. Represión débil pero permanente, durante el crecimiento prolongado con glucosa (represión catabólica).

La adición de AMPc (5mM) puede antagonizar

en su totalidad los efectos medido por las represiones transitoria y permanente (Kaalyuzhnaya y Koribov 1991, Ullman y Monod 1968). Bajo condiciones fisiológicas, el AMPc es sintetizado por la célula y modula directamente la actividad de la proteína CAP (proteína activadora del catabolito) (Brown y Crothers 1989). El complejo AMPc-CAP generalmente actúa como elemento de control positivo favoreciendo la expresión transcripcional (deCrombrughe 1984, Utsumi 1989), pero alternativamente puede ejercer un efecto negativo (Adhya y Garges 1982, Moore y Boyle 1991) o ambos (Gerlach *et al.* 1991, Huang *et al.* 1992).

En ciertos casos, se ha evidenciado un efecto indirecto ejercido por la glucosa y que puede

enmascararse fisiológicamente al cambiar las condiciones específicas de cultivo (Dobrogosz 1965, Lee y Dobrogosz 1983, Okinaka y Dobrogosz 1967, Warnes *et al.* 1991). Además, el AMPc puede actuar parcialmente (Roy 1983) y no parece ser el único efector que participa en la liberación de la represión catabólica (Lee y Dobrogosz 1983).

La represión por glucosa está asociada con el metabolismo de diferentes azúcares (Irani *et al.* 1989, Magasanik 1970) y con procesos celulares muy diversos (Dobrogosz 1965, Evasn 1991; Gerlach *et al.* 1991, Jamieson 1986, Lee y Dobrogosz 1983, Meighen 1988, Moore y Boyle 1991, Okinaka y Dobrogosz 1967, Pugsley 1981, Ralph 1983, Snetz y Rak 1990, Utsumi 1989, Winkelman y Clark 1986).

Estudios realizados con una fusión transcripcional, evidenciaron que la expresión del operón *moa* en *E. coli* es susceptible al efecto negativo de la glucosa (Ortega de L. 1985), sugirieron que el metabolismo del molibdocofactor, MoCo, también podía responder a ese mismo control (Ortega de L. 1985), ya que los operones *moa* y *moe* (Rivers *et al.* 1993, Shanmugan *et al.* 1992) determinan la síntesis de la pterina, durante las etapas iniciales de su metabolismo (Johnson y Rajagopaln 1987). El MoCo está presente en especies bacterianas (Stewart 1988) y en organismos eucariotas (Johnson 1989); en el primer caso es requerido para la activación de diferentes apomolibdoenzimas de oxidorreducción (Giordano 1990) y una de ellas es la nitrato reductasa A (NRA) que actúa como aceptor final de electrones en la respiración anaeróbica del nitrato (Stewart 1988).

La expresión de la fusión transcripcional antes referida también es susceptible a la concentración incrementada de ciertos efectores que controlan la biosíntesis de la NRA (Ortega de L. y Díaz 1995). Los niveles de expresión máxima son alcanzados durante el crecimiento aeróbico (Ortega de L. 1985), contrario a lo reportado para una fusión traduccional (Baker y Boxer 1991), y pudiera atribuirse a la participación de controles a nivel transcripcional y traduccional (Ortega de L. 1994).

En el presente trabajo se caracterizó el control negativo mediado por la glucosa sobre la expresión de la fusión *moa::lac*, realizando cinéticas aeróbicas. La represión transitoria fue evaluada cuantitativamente ensayando además diferentes concentraciones de glucosa y la represión permanente, en presencia y ausencia de AMPc exógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa bacteriana. Se utilizó un derivado de la CSH41 de *E. coli* K 12, identificado como OM86: NitGas- Lac+ y contiene la fusión de operón genómica [*moa::Mu (lac)*] MA25 (Ortega de L. 1982; Ortega de L. 1985). Los genes *lac* fusionados al promotor *p_{moa}* es una estrategia que permite estudiar el control transcripcional del operón *moa*, cuantificando los niveles de expresión del gen *lacZ* que codifica para la enzima β galactosidasa (β Gal) (Casadaban y Cohen 1979).

Medios y condiciones de cultivo. La composición del medio mínimo fue descrita por Miller (1972). Las concentraciones de galactosa (Gal), glucosa (Glu) y AMPc (3 '-5' AMP cíclico) (Sigma A-6885) se indicaron en las cinéticas. Las bacterias se incubaron a 300 C. Los cultivos aeróbicos crecieron con agitación fuerte, en fioles de 250 ml conteniendo 10 ml de medio.

Ensayos enzimáticos. Se utilizaron cultivos aeróbicos, porque muestran los mayores niveles de expresión del gen *lacZ* fusionado al promotor *p_{moa}* (Ortega de L. 1985) y la represión por glucosa es más severa (Dobrogosz 1965, Lee y Dobrogosz 1983, Okinaka y Dobrogosz 1967). La actividad β Gal se determinó colorimétricamente siguiendo la hidrólisis del ONPG en células permeabilizadas con tolueno (Miller 1972) que fueron tratadas con cloranfenicol (50 ug/ml) y mantenidas en frío; se utilizó medio mínimo en un lugar del tampón Z y la densidad celular se midió a una absorbancia A550. Los valores fueron reproducibles en al menos tres experimentos independientes, con un porcentaje de desviación cercano a 10.

RESULTADOS

Cinética de represión transitoria por glucosa en la expresión aeróbica de la fusión *moa::lac*

Previamente se observó que el crecimiento en medio mínimo a expensas de glucosa reduce los niveles de expresión de la fusión de operón genómica *moa::lac* (Ortega de L. 1985). Por lo tanto, fue de interés estudiar el fenómeno de represión transitoria por glucosa a través de cinéticas aeróbicas e incremento al doble la concentración final de dicho azúcar.

La expresión de la fusión fue estimada considerando la biosíntesis acumulativa de β Gal y, a diferencia del cultivo control que se mantuvo creciendo con galactosa, la adición de glucosa disminuyó la expresión durante un tiempo prolongado de la fase exponencial (Fig. 1).

También se ensayaron cuatro concentraciones

crecientes de glucosa y las cinéticas se siguieron durante un tiempo más prolongado (Fig. 2A y 2B). Una curva de crecimiento diáxico (crecimiento bifásico) fue observada claramente en los cuatro cultivos paralelos y es atribuible al crecimiento en presencia de glucosa y galactosa (Epstein 1966), debido a la exclusión del inductor (la galactosa) más que a la represión catabólica del operón gal (Joseph *et al.* 1981). El período transitorio de suspensión del incremento en la densidad celular, intermedio entre las dos fases de crecimiento exponencial (período de latencia), es una etapa adaptativa (Epstein 1966) que refleja la síntesis de las enzimas requeridas para utilizar la galactosa, una vez que la concentración de glucosa es limitante (Monod 1949).

En esos cultivos paralelos la expresión de la fusión fue estimada considerando la biosíntesis

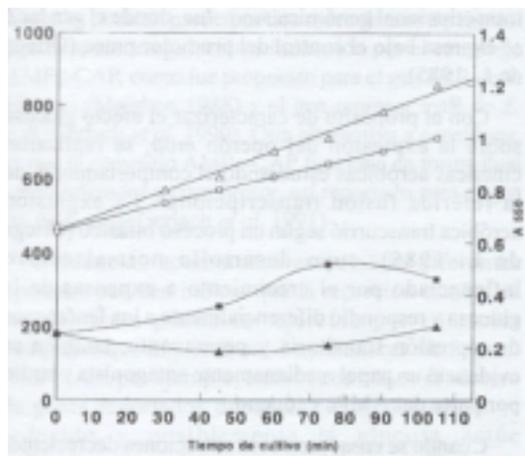


Fig. 1 Represión transitoria por glucosa durante la expresión aeróbica de la fusión *moa::lac*; la cinética representa la biosíntesis acumulativa del β Gal. Un subcultivo creciendo exponencialmente con Gal (1mg/ml) fue diluido en medio fresco para iniciar dos cultivos paralelos por adición de Glu o Gal, según el caso (1 mg/ml). A intervalos de tiempos predeterminados, se cuantificaron el crecimiento celular (A_{550}) (Símbolos vacíos) y los niveles acumulativos de β Gal (Unidades Miller) (símbolos rellenos); los valores graficados corresponden al cultivo con Glu (Δ) y al control con Gal (\square), respectivamente

diferencial de la β Gal y la misma se mantuvo en un nivel basal durante el crecimiento exponencial con glucosa, indistintamente de su concentración. Sin embargo, justo al iniciarse el período de latencia, se disparó una etapa de expresión máxima y, de allí en adelante, cuando las células iniciaron su crecimiento exponencial a expensas de galactosa (segunda fase del crecimiento diáxico), la cinética fue modulada diferencialmente de tal forma que los mayores niveles alcanzados se correspondieron con las menores concentraciones ensayadas de glucosa (Fig. 2A).

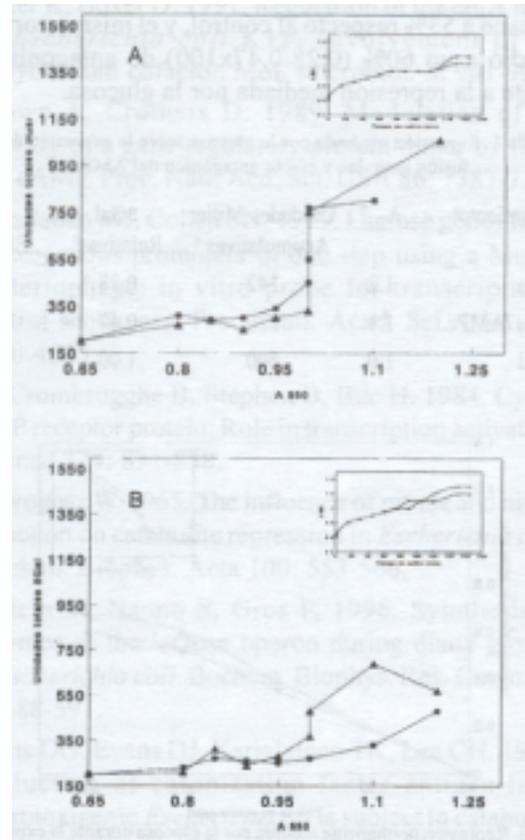


Fig. 2. Represión transitoria durante la expresión aeróbica de la fusión *moa::lac*; mediada por diferentes concentraciones de glucosa; la cinética representada la biosíntesis diferencial de β Gal. Un subcultivo creciendo exponencialmente con Gal (1mg/ml) fue diluido en medio fresco para iniciar cuatro cultivos paralelos por adición de Glu. A intervalos de tiempos predeterminados, se cuantificaron el crecimiento celular (A_{550}) (Símbolos vacíos) y los niveles acumulativos de β Gal (Unidades totales) (símbolos rellenos). La Fig. A representa los valores de los cultivos conteniendo 0.13 (Δ) y 0.25 (\square) mg/ml (,) de Glu; la Fig. B representa los de 0.5 (Δ) y 1 mg/ml (\square) respectivamente

Represión permanente y efecto antagónico del AMPc en la expresión aeróbica de la fusión *moa::lac*.

Una vez demostrada la represión transitoria mediada por glucosa, la etapa subsiguiente fue evaluar la represión permanente. La cinética de expresión aeróbica de la fusión bajo estudio fue estimada considerando los valores relativos de biosíntesis acumulativa de β Gal, respecto al control (Fig. 3).

Pudo observarse que, aún en presencia del AMPc exógeno, la glucosa ejerció un efecto negativo y prolongado durante el crecimiento exponencial, ya que los valores relativos fueron inferiores a la unidad. El efecto resultó fuertemente severo durante los primeros 90 minutos, pero a partir de entonces, los niveles comenzaron a

incrementar y los valores máximos se alcanzaron cercano a la fase estacionaria ($A_{550} = 0,9$).

El AMPc ocasionó una disminución muy ligera en el incremento celular durante el crecimiento exponencial, tal como se ha reportado en otros sistemas (Ralph 1983). El efecto antagónico se manifestó tardíamente después de una noche de incubación aeróbica (fase estacionaria prolongada) (Tabla 1), cuando el cultivo mostró un valor acumulativo cercano a 53% respecto al control, y el mismo correspondió a un 60% ($0,28/0,47 \times 100$) de antagonismo frente a la represión mediada por la glucosa.

Tabla 1. Represión mediada por la glucosa sobre la expresión de la fusión *moa::lac* y efecto antagónico del AMPc.

Tratamiento ^a	A_{550} ^b	Unidades Miller Acumulativas	BGal Relativas ^d	% Efecto
Glu	1.2	142	0.28	-72
Glu AMPc	1.1	236	0.47	-53
Gal	1.0	500	1.00	--

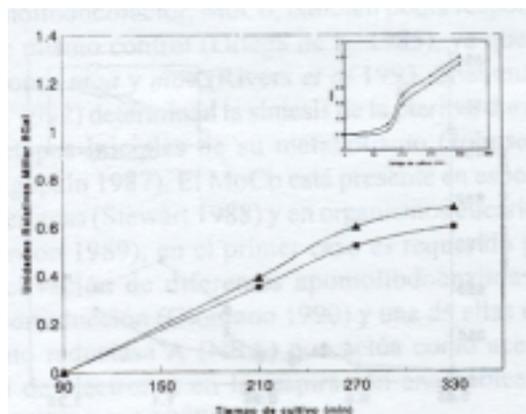


Fig. 3. Represión permanente medida por glucosa durante la expresión aeróbica de la fusión *moa::lac*; en presencia y ausencia del AMPc; la cinética representa la biosíntesis acumulativa del β Gal respecto al control. Un subcultivo crecido aeróbicamente una noche con Glu (2mg/ml) fue diluido en medio fresco hasta $A_{550}=0.2$ para iniciar dos cultivos paralelos por adición de Glu (2 mg/ml) y Glu (2 mg/ml) más AMPc (5mM), respectivamente. A intervalos de tiempos predeterminados, se cuantificaron el crecimiento celular (A_{550}) (símbolos vacíos) y los niveles acumulativos de β Gal (Unidades relativas) (símbolos rellenos); los valores graficados a partir de los 90 min de haberse iniciado el crecimiento con Glu (Δ) y Glu más AMPc (\square), respectivamente

Las bacterias fueron crecidas a expensas del GLU (2mg/ml), en presencia y ausencia del AMPc (5mM). El cultivo control fue crecido con Gal (2 mg/ml).

Crecimiento celular

Nivel acumulado durante una noche de crecimiento aeróbico.

Variación relativa respecto al control, calculada

como unidades acumulativas / 500

Porcentaje del efecto respecto al control, calculado como porcentaje de unidades menos 100.

DISCUSIÓN

La sensibilidad a la represión catabólica se ha reportado para diferentes sistemas respiratorios relacionados con la reducción de aceptores finales de electrones como hidrógeno (Jamieson *et al.* 1986), oxígeno y nitrato (Dobrogosz 1965, Lee y Dobrogosz 1983), asparagina y aspartato (Winkelman y Clark 1986).

Asimismo, la sensibilidad al efecto negativo mediada por glucosa se reportó para el operón *moa* que participa en la reducción anaeróbica del nitrato y el hidrogeno, a través de la biosíntesis del molibdocofactor, MoCo (Stewart 1988). Este efecto ocurre bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas de crecimiento, según estudios realizados con una fusión transcripcional genómica *moa::lac*, donde el gen *lacZ* se expresa bajo el control del promotor *p_{moa}* (Ortega deL. 1985).

Con el propósito de caracterizar el efecto glucosa sobre la expresión del operón *moa*, se realizaron cinéticas aeróbicas estudiando el comportamiento de la referida fusión transcripcional. La expresión aeróbica transcurrió según un proceso bifásico (Ortega de L. 1985), cuyo desarrollo normal estuvo influenciado por el crecimiento a expensas de la glucosa y respondió diferencialmente a los fenómenos de represión transitoria y permanente; también se evidenció un papel medianamente antagonista y tardío por parte del AMPc exógeno.

Cuando se ensayaron concentraciones decrecientes de glucosa, la aparición de los niveles máximos de expresión estuvo asociada con la limitación de glucosa en el medio de cultivo y el tiempo de latencia. Las condiciones fisiológicas que le permitieron a las bacterias recuperarse más rápidamente del efecto glucosa, disminuyeron la eficiencia de la expresión máxima de la fusión bajo estudio.

La represión por glucosa no llegó a bloquear totalmente la expresión, similar a lo reportado para otros genes (de Crombrughe 1984; Monod 1949), y resultó ligeramente menos severa que cuando las células provenían de un subcultivo crecido aeróbicamente durante una noche (fase estacionaria prolongada) (Ortega de L. 1985). Por lo tanto, el estado fisiológico del cultivo parece desempeñar un papel de control sobre la expresión aeróbica de *moa* y la capacidad de las células bacterianas para

recuperarse eficientemente de la represión mediada por el metabolismo de la glucosa.

No obstante, el efecto represor de la glucosa se manifestó con menor severidad respecto al reportado para el gen *lacZ*, cuando se expresa a partir de su promotor nativo *plac* (Monod 1949, Magasanik 1970). También fue diferente al reportado para otros genes procariontes no relacionados funcionalmente con el metabolismo del MoCo y que son sensibles a la represión catabólica; por ejemplo el gen *cia* que codifica para la colicina Ib, lo cual fue evidenciado estudiando la expresión de la fusión *cia::lac* (Pugsley 1981).

Las condiciones ensayadas durante la presente investigación permiten inferir que la expresión transcripcional de *moa* en una cepa silvestre de *E. coli* no depende totalmente del control positivo mediado por el complejo AMPc-CAP y posiblemente estaría controlada por más de un proceso distinto. Por ejemplo, podrían participar dos mecanismos de control positivo, autorregulación e inducción por el complejo AMPc-CAP, como fue propuesto para el gen *luxR* de *V. Harveyi* (Meighen 1988) y el gen represor *cytR* de *E. coli* (Gerlach *et al.* 1990). Otra alternativa a considerar, es que el complejo AMPc-CAP funcione en forma dual como activador y correpresor, así reportado para el gen *tsx* de *E. coli* (Gerlach *et al.* 1991).

Evidencias acumuladas estudiando diferentes operones parecen indicar que la represión catabólica normalmente puede ser ejercida por controles complejos que implican otros mediadores distintos al AMPc. Así, por ejemplo, cada vez es mayor el número de genes reportados donde el efecto del AMPc es reducido y posiblemente la glucosa actúe indirectamente sobre su expresión transcripcional, como es el caso del *fnr* y los genes sometidos a su regulación (Spiro y Guest 1990). En la represión por glucosa de genes anaeróbicos pudieran estar participando cofactores nucleotídicos potenciales, como el NaDh o la acetil-coenzima A; además fue propuesto un balance comprometedor entre los sistemas metabólicos de oxidorreducción y el flujo reducido de metabolitos (Dobrogosz 1965, Stewart 1988, Spiro y Guest 1990).

AGRADECIMIENTOS

Me complace agradecer al Dr. J. DeMoss (Universidad de Texas, Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Houston, USA) sus valorables comentarios sobre esta investigación. Al CDCHT-ULA (Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes) por el soporte financiero.

REFERENCIAS

- Adhya S, Garges S. 1982. How cyclic AMP and its receptor protein act in *Escherichia coli*?. *Cell* 29: 287-289
- Baker K, Boxer D. 1991. Regulation of the *chlA* locus of *Escherichia coli* K12: Involvement of the molybdenum cofactor. *Mol. Microbiol.* 5: 901-907
- Brown A, Crothers D. 1989. Modulation of the stability of a gene-regulatory protein dimer by DNA and cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7387-7391.
- Casadaban MJ, Cohen SN. 1979. Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: in vitro probe for transcriptional control sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4530-4533.
- De Crombrugghe B, Stephen B, Buc H. 1984. Cyclic AMP receptor protein: Role in transcription activation. *Science* 224: 831-838.
- Dobrogosz W. 1965. The influence of nitrate and nitrite reduction on catabolite repression in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 100: 553-566.
- Epstein W, Naono S, Gros F. 1996. Synthesis of enzymes of the lactose operon during diauxic growth of *Escherichia coli*. *Bochem. Biophys. Res. Commun.* 24:588-591.
- Evans DG, Evans DJ, Karjalainen TK, Lee CH. 1991. Production of colonization factor antigen-II of enterotoxigenic *Escherichia coli* is subject to catabolite repression. *Current Microbiol.* 23: 71-74.
- Gerlach P, Sogaardanderesen L, Pedersen H, Martinussen J, Valentinhanen P, Bremer E. 1991. The cyclic-AMP (cAMP) - cAMP receptor protein complex functions both as an activator and as a corepressor at the *tsx*-P2 promoter of *Escherichia coli* K 12. *J Bacteriol.* 173:5419-5430.
- Gerlach P, Valentin-Hansen P, Bremer E 1990. Transcriptional regulation of the *cytR* repressor gene of *Escherichia coli*: Autorregulation and positive control by the cyclic AMP-CAP complex. *Mol. Microbiol.* 4: 479-488.
- Giordano G, Boxer D, Pommier J. 1990. Molybdenum cofactor requirement for in vitro activation of apo. molybdoenzymes of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 4: 645-650.
- Huang L, Tsui P, Freundlich M. 1992. Positive and negative control of *ompB* transcription in

- Escherichia coli* by cyclic-AMP and the Cyclic-AMP. J. Bacteriol. 174: 664-670.
- Irani M, Adhya S, Musso R. 1989. Cyclic AMP dependent switch in initiation of transcription from the 2 promoters of the *Escherichia coli* gal operon - Identification and assay of 5', triphosphate ends of messenger-RNA guanyltransferase. J. Bacteriol. 171: 1623-1630
- Jamieson D, Sawers R, Rugman P, Boxer F, Higgins Ch. 1986. Effects of anaerobic regulatory mutations and catabolite repression on regulation of hydrogen metabolism and hydrogenase isoenzyme composition in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 168: 405-411.
- Johnson J, Wuebbens M, Mandell R, Shih V. 1989. Molybdenum cofactor biosynthesis in humans. Identification of two complementation groups of cofactor-deficient patients and preliminary characterization of a diffusible molybdoperin precursor. J. Clin. Invest. 83: 897-903.
- Jhonson M, Rajagopalan K, 1987. Involvement of chlA, E, M and N loci in *Escherichia coli* molybdopterin biosynthesis. J. Bacteriol. 169:117-125.
- Kalyuzhnaya VM, Korobov VP. 1991. Regulation of betagalactosidase synthesis in *Escherichia coli* by exogenous cyclic 3',5'-adenosine monophosphate. Microbiol. 60:47-51.
- Lee JH, Dobrogosz W. 1983. Effects of aerobics and anaerobics shock on catabolite repression in cyclic AMP suppressor mutants of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 154: 992-992
- Magasanik B. 1961. Catabolite repression. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26: 249-256
- Meighen E. 1988. Enzymes and genes from the lux operons of bioluminescent bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 42:151-176
- Miller JH. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- Monod J. 1949. The growth of bacterial cultures. Ann. Rev. Microbiol. 3: 371-378.
- Moore RC, Boyle SM 1991. Cyclic-AMP inhibits and putrescine repress expression of the speA gene encoding biosynthetic arginine decarboxylase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 173: 3615-3621
- Okinaka R, Dobrogosz W. 1967. Catabolite repression and pyruvate metabolism in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 93:1644-1650.
- Ortega de L. M. 1982. Molecular: 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. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.
- Ortega de L.M. 1985. Regulación fisiológica de 105 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. 1994. Control a nivel de transcripción de una fusión de operón moa::lac de *Escherichia coli* K12: Efectos de diferentes condiciones de cultivo y del operón moa. Suplemento de Acta Científica Venezolana, 45 (1).
- Pugsley A. 1981. Transcription regulation of colicin ib synthesis. Mol. Gen. Genet. 183: 522-527.
- Ralph R. 1983. Cyclic AMP, calcium and control of cell growth. FEBS Lett. 161:1-8.
- Rivers S, McNairm 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. Mole. Microbiol. 8:1071-1081.
- Roy A, Haiza C, Danchin A. 1983. Regulation of adeny-late cyclase synthesis in *Escherichia coli*: nucleotide sequence of the control region. EMBO J.
- Schnwtz K, Rak b. 1990. Beta glucoside permease represses the bgl operon of *Escherichia coli* by phosphorylation of the antiterminator protein and also interacts with glucose-specific enzyme II, the key element in catabolite control. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5074-5078
- Shanmugan K, Boxer D, Cole J, Chippaux M, deMoss J, Giordano G, Guest J, Gunsalus R, Lin ECC, 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
- 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.
- Ullman A, Monod J. 1968 Cyclic AMP as an antagonist of catabolite repression in *Escherichia*

coli. FEBS Lett. 2: 714-717.

Utsumi R, Noda M, Kawamukai M, Komano, T. 1989. Control mechanism of the *Escherichia coli* K12 cell cycle is triggered by the cyclic AMP-cyclic AMP receptor protein complex. J. Bacteriol. 171:2909-2912.

Warnes A, Stephenson Jr, Fooks AR, Melling J,

Brown M. 1991. Expression of recombinant protein A from the lac promoter in *Escherichia coli*-Jm83 is not subject to catabolite repression when grown under specific conditions of continuous culture. Biotechnology and Bioengineering 38:1050-1058.

Winkelman J, Clark D. 1986. Anaerobically induced genes of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 167: 362-367.