

CONTROL FISIOLÓGICO EN UNA FUSIÓN *moa::lac* DE *Escherichia coli* K12: CINÉTICAS DE EXPRESIÓN BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO.

Mariemmma Ortega de López

Laboratorio de Organización y Expresión del Gen. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.

Resumen

La biosíntesis del molibdocofactor, MoCo, en *Escherichia coli* requiere productos codificados por los genes *mol* (*moa*, *mob*, *mod*, *moe*, *mog*, *molR*) y es insensible a los factores fisiológicos que inducen la biosíntesis de la molibdoenzima NRA. En el presente trabajo se construyó una fusión de operón estabilizada *moa::lac* y se estudiaron los efectos de diferentes factores fisiológicos sobre su expresión transcripcional, en un medio sintético, estimando la biosíntesis acumulativa de la β Gal. En cultivos de fase estacionaria prolongada, la expresión de la fusión presentó el patrón de regulación siguiente: i. Ocurrió aún en ausencia de algún inductor exógeno y fue relativamente insensible a los controles que regulan la inducción de la NRA; ii. Incrementó bajo condiciones aeróbicas frente a las anaeróbicas; iii. Incrementó con casaminoácidos en anaerobiosis, pero disminuyó en aerobiosis; iv. Disminuyó por crecimiento con glucosa. En las cinéticas de expresión, se observó que un cultivo creciendo constantemente en aerobiosis mostró un patrón bifásico de inducción y los niveles incrementaron durante la fase exponencial, parecido a la biosíntesis del MoCo; además se confirmaron los efectos moduladores, mediados por la glucosa, las condiciones de aeración y la edad del cultivo. Se propone la necesidad de circuitos de control acoplados para un balance adecuado entre la expresión del operón *moa* y la biosíntesis del MoCo.

Palabras clave: Operón *moa*, cinéticas expresión *moa::lac*; biosíntesis MoCo; mutantes Nit⁻ Gas⁻; mutantes Chl^R.

Abstract

Physiological control in a fusion *moa:: lac* of *Escherichia coli* K12: Expression kinetics under different growth conditions.

The MoCo molybdocofactor biosynthesis in *Escherichia coli* requires products encoded by the *mol* genes (*moa*, *mob*, *mod*, *moe*, *molR*) and is insensitive to the physiological factors which induce the molibdoenzyme NRA biosynthesis. In the present work, it was constructed a stabilized *moa::lac* operon fusion, and the effects of physiological factors different on its transcriptional expression were studied in a synthetic media, estimating the β Gal accumulative biosynthesis. In cultures of prolonged stationary phase, the fusion expression showed the regulation pattern as follow: i. Occurred without any possible hexogen inductor and was relatively insensitive to the controls which regulate the NRA induction; ii. Increased under aerobic versus anaerobic conditions; iii. Increased with casaminoacids in anaerobiosis, but decreased in aerobiosis; iv. Decreased by growing with glucose in the expression kinetics, it was observed that a culture constantly growing in aerobics showed an induction biphasic pattern and the levels increased during the exponential phase, similar to the MoCo biosynthesis; in addition, the modulator effects mediate by glucose, the aeration conditions and the culture age were confirmed. The need of coupled control circuits for an adequate balance between the *moa* operon expression and the MoCo biosynthesis is proposed.

Key words: *moa* operon; *moa::lac* expression kinetics; MoCo biosynthesis; Nit⁻ Gas⁻ mutants; Chl^R mutants

INTRODUCCIÓN

La reducción anaeróbica del nitrato es una de las vías respiratorias alternativas que son inducibles en *Escherichia coli*. la Nitrato Reductasa A (NRA) es la enzima terminal de la cadena respiratoria FDH-N-NRA (Ruiz-Herrera and DeMoss 1969, Ingledew and Poole 1984, Stewart 1988, 1993); mutantes defectivos (Nit⁻) pueden seleccionarse por resistencia al clorato (Chl^R) (Piéchaud *et al.* 1969).

Los genes *nar* (originalmente llamados *chlC*) (Puig and Azoulay 1967, Shanmugan *et al.* 1992) participan en la biosíntesis de la apomolibdoenzima NRA (operón *narGHJI*) (Bonney-Orth *et al.* 1981, Sodergren and DeMoss 1988, Stewart 1988) y su control transcripcional (operón *narXL*), excepto el gen *narK* (Bonney-Orth *et al.* 1981, Edwards *et al.* 1983, Sodergren and DeMoss 1988, Stewart 1988, 1993). Los genes *mol*, que incluyen *moa*, *mob*, *mod*, *moe* y *mog* (originalmente llamados *chlA*, *chlB*, *chlD*, *chlE*, *chlG*, respectivamente) (Puig and Azoulay 1967, Shanmugan *et al.* 1992), además de *molR* (Lee *et al.* 1990), determinan la biosíntesis y/o procesamiento de un molibdocofactor (MoCo = complejo molibdopterina molibdato) requerido en la activación de la apoNRA (Amy and Rajagopalan 1979, Giordano *et al.* 1990, Johnson *et al.* 1984) y de otras apomolibdoenzimas bacterianas (Stewart 1988); la mayoría de los genes *mol* se encuentran organizados en operones (Shanmugan *et al.* 1992, Maupin-Furlow *et al.* 1995, Iobbi-Nivol *et al.* 1995).

Evidencias formales acerca de los controles que regulan la expresión de los genes arriba mencionados, están siendo aportadas mediante estudios con fusiones *lac*. El operón *narGHJI* es inducido por nitrato reprimido por oxígeno y sensible a los niveles intracelulares de molibdato (Ruiz-Herrera and Salas-Vargas 1976, Fimmel and Haddock 1979, Giordano *et al.* 1980, Chippaux *et al.* 1981, Stewart 1988, 1993). El operón *mod(ABCD)* Shanmugan *et al.* 1992, Maupin-Furlow *et al.* 1995, Rosentel *et al.* 1995) es controlado por nitrato, pero insensible a la represión por oxígeno (Miller *et al.* 1987); se expresa constitutivamente a muy bajo nivel (Maupin-Furlow *et al.* 1995), es sensible a la represión por el molibdato (Miller *et al.* 1987) y los productos Mod, pero insensible al efecto de mutaciones en cualquiera de los genes *moa*, *mob* y *moe* (Rosentel *et al.* 1995). En contraste, el operón *mob(AB)* se expresa a muy bajo nivel, en aerobiosis y anaerobiosis, siendo además insensible al control por nitrato, tungstato y molibdato, y al efecto de mutaciones en cualquiera de los genes *moa*, *mob*, *mod*, *moe* y *mog* (Iobbi-Nivol *et al.*

1995); el operón *moe(AB)* (Shanmugan *et al.* 1992) también es insensible a los mismos factores fisiológicos (Pascal and Chippaux 1982). Estos dos últimos operones *mol* están regulados de manera similar que la biosíntesis del MoCo, estimada mediante ensayos donde mutaciones *nit-1* de *Neurospora crassa* son complementadas *in vitro* utilizando preparaciones de *E. coli* (Amy 1981); la biosíntesis aeróbica de este cofactor alcanza los niveles máximos en la mitad de la fase exponencial del cultivo, para luego disminuir al inicio de la estacionaria (Miller and Amy 1983), y todo este proceso transcurre independientemente de algún inductor exógeno.

Otros estudios con fusiones *lac* indicaron que la expresión del operón *moa(ABCDE)* (Shanmugan *et al.* 1992, Rivers *et al.* 1993) es insensible al control por nitrato y molibdato, pero en anaerobiosis se induce a muy altos niveles (Baker and Boxer 1991). Esto último no es consistente con su participación, junto con el operón *moe*, en la biosíntesis del MoCo (Johnson and Rajagopalan 1987a, 1987b, Pitterle *et al.* 1989, Wooton *et al.* 1991), pero muestra similitud con la expresión del operón *narGHJI* (Chippaux and Pichinoty 1970, Ruiz-Herrera and Salas-Vargas 1976, Fimmel and Haddock 1979, Giordano *et al.* 1980, Chippaux *et al.* 1981, Stewart 1988, 1993). Tal discrepancia, entre la regulación de la biosíntesis del MoCo y la expresión transcripcional del operón *moa(ABCDE)*, plantea la necesidad de realizar estudios más detallados que permitan dilucidar los circuitos de control que allí participan.

El presente trabajo describe por primera vez un estudio de regulación de los genes *mol*, basado en cinéticas de expresión transcripcional. Clones Chl^R obtenidos previamente (Ortega de L. 1982) por mutagénesis con el fago *MudI(lac,ap^R)* se caracterizaron para luego construir nuevas cepas conteniendo una fusión de operón única y estabilizada *moa::lac*, cuya presencia fue confirmada mediante ensayos fenotípicos y activación en trans. La cepa denominada OM86 se utilizó para estudiar la regulación fisiológica en un medio de cultivo sintético, estimando la biosíntesis acumulativa de βGal (codificada por el gen *lacZ* fusionado), en la fase estacionaria prolongada y a lo largo del tiempo de cultivo.

METODOLOGÍA

1. **Cepas utilizadas.** Las cepas de *E. coli* K12, fagos y plásmidos se describen en la Tabla 1.

2. medios de cultivo. El medio sintético contenía (g/l): KH_2PO_4 5.98; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 10.18; $\text{Na}_3\text{H}_2\text{C}_6\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.12; $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.31; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0. La composición de otros medios de cultivo está descrita por Miller (1972). Cuando se indicó el medio fue suplido con alguno de los siguientes compuestos: KNO_3 (Nit) 0.1 nM; NaN_3 (Azi) 10 nM, K_2MO_4 (Mob) 1 nM, KClO_3 (Chl) 16 nM, casaminoácidos libres de vitaminas (Cas) 2 mg/ml; fumarato de sodio (Fum) 40 nM y 5-bromo-4-cloro-3 indolil- β -D-galactósido (X-Gal) 20 mg/ml; la ampicilina (Ap) 0.05 mg/ml y el 2,3,5 trifenil tetrazolio cloruro (TTC) 0.1 mg/ml. La galactosa (Gal), lactosa (Lac), glucosa (Glu) o glicerol (Gli) se utilizaron a las concentraciones finales de 2 mg/ml y 1 mg/ml en cultivos anaeróbicos (Ana) y aeróbicos (Aer), respectivamente.

Tabla 1. Cepas de bacterias, fagos y plásmidos.

Cepa	Genotipo o fenotipo relevantes	Procedencia o referencia
<i>Bacterium S. coli</i>		
PC90	$\Delta(jac-pro) \Delta(his-gnd)$ gtr ⁺	Colección Lab. OEG
CSH41	$\Delta(jac-pro) galE$ $F' lacI^- F' pro^+$	Miller
LC3413	$lev lacF galT bio rpsL$	Colección Lab. OEG
CE06	CSH41 $\Delta(jac::lac/HA25)$ Gal ⁺ Nit ⁻ Gas ⁺ Lac ⁺ estabilizada Ap ^R	Este trabajo
Derivados ModJ ^R Chl ^R Ap ^R Ts ^R de la PC90		
HA17	moa::ModJ Nit ⁻ Gas ⁻ Lac ⁺	Este trabajo
HA25	moa::ModJ Nit ⁻ Gas ⁻ Lac ⁺	Este trabajo
HA30	moa::ModJ Nit ⁻ Gas ⁻ Lac ⁺	Este trabajo
Fagos y plásmidos		
Φ_{u3}		Colección Lab. OEG
Φ_{vir}		Colección Lab. OEG
pSJE100	pADP (Ap ^R) con 4.8 Kb de moa(ABCDE)+ pmoa	S. H. Hinton

Todas las cepas bacterianas son F⁻, excepto la CSH41. OEG: Laboratorio de Organización y Expresión del Gen.

3. Condiciones de crecimiento. La temperatura de incubación fue de 30° C. Los cultivos fueron preparados diluyendo en medio fresco, inóculos precultivos una noche. Los cultivos anaeróbicos (Ana) crecieron en tubos totalmente llenos con el medio, y sin agitación; cuando fue requerido, la anaerobiosis estricta se realizó bajo atmósfera de hidrógeno y dióxido de carbono utilizando el sistema Gas-Pack. Los cultivos aeróbicos (Aer) se crecieron en fiolas cónicas de 250 ml conteniendo 10 ml de medio y con agitación vigorosa. Se ensayaron las siguientes combinaciones: Aer-Aer, precultivos y cultivos Aer; Ana-Ana, precultivos y cultivos Ana; Aer-Ana, precultivos Aer y cultivos Ana; Ana-Aer, precultivos Ana y cultivos Aer. En los cultivos de fase estacionaria prolongada Aer-Aer, el precultivo fue diluido hasta 10⁻⁵ en el medio y los valores A₆₀₀ alcanzados después de una noche de crecimiento variaron de 0.8 a 1.2; en los Ana-Ana, se

diluyó hasta 10⁻⁴ y variaron de 0.1 a 0.3. En las cinéticas aeróbicas Aer-Aer, el precultivo se diluyó hasta el valor inicial A₆₀₀ de 0.2; en las Ana-Aer y Aer-Ana fue cercano a 0.1.

4. Métodos de aislamiento y ensayos fenotípicos. *Resistencia al clorato (fenotipo Chl^R).* Se modificó el método descrito (Piéchaud *et al.* 1969) y la capacidad de crecer en anaerobiosis estricta con clorato fue ensayada sembrando en superficie o por rayado en cajas de agar nutritivo (Ortega de L. 1982). *Coloración en el medio TNC (fenotipo TNC⁺).* Se modificó el método descrito (Fimmel and Haddock 1979) y los mutantes Nit⁻ en cualquiera de los genes *nar* o *mol* fueron distinguidos por formar colonias rojas durante el crecimiento en cajas de medio semisintético suplementado con tetrazolio, nitrato y casaminoácidos (Ortega de L. 1982). *Reducción fisiológica del nitrato (fenotipo Nit⁺).* Se verificó en cultivos anaeróbicos de una noche, por coloración con el reactivo de nitritos (Piéchaud *et al.* 1969, Chippaux *et al.* 1981). *Reversión fenotípica por molibdato.* Se verificó la acumulación de nitritos, pero utilizando un medio de cultivo suplementado con 10⁻³ M de molibdeno /Glacer and DeMoss 1971). *Liberación de Gas (fenotipo Gas⁺).* se verificó la aparición de burbujas en tubos durham (Puig *et al.* 1969), generadas por crecimiento fermentativo de una noche. *Reducción fisiológica del fumarato (fenotipo frd⁺).* Se ensayó en cajas de medio sintético, por crecimiento a expensas de glicerol y fumarato como aceptor final de electrones (Lambden and Guest 1976). *Requerimientos nutricionales y presencia de fusiones lac.* Se utilizaron metodologías descritas por Miller (1972); las fusiones fueron verificadas mediante la adquisición simultánea de los fenotipos Ap^R, Ts⁺, ImmMu y Lac⁺ (Casadaban and Cohen 1979).

5. Transducciones, análisis de ligamiento y determinación de fusiones genómicas. Siguiendo las metodologías descritas por Miller (1972), cepas bacterianas Gal⁺ Nit⁻ Gas⁻ fueron utilizadas como donantes para preparar lisados del fago Φ_{vir} , los cuales se usaron en la obtención de clones transductantes independientes Gal⁺, aislados en medio diferencial. Esos clones fueron purificados y sometidos a los ensayos correspondientes (aparte 4), para determinar la cotransferencia del fenotipo pleiotrópico Nit⁺ Gas⁻. El grado de ligamiento fue expresado como porcentaje de Gal⁺ Nit⁻ Gas⁻ con respecto al total Gal⁺ ensayados. La presencia de una fusión de operón en la cepa donante fue presumida cuando el 100% de los transductantes Gal⁺ Nit⁻ Gas⁻ adquirió el fenotipo Lac⁺, y todos los

Gal⁺ Nit⁺ Gas⁺ continuaron siendo Lac⁻. Transductantes con una fusión única y estabilizada se aislaron como clones termotolerantes espontáneos (Wanner *et al.* 1981, Griffiths and Cole 1987) Gal⁺ Nit⁻ Gas⁻ que sólo conservaban el carácter Lac⁺ conferido por el fago *MudI*. A partir de ellos se obtuvieron células curadas del F', empleando naranja de acridina, las cuales fueron identificadas por la pérdida simultánea de los caracteres Pro⁺ y sensibilidad del fago M13, ambos conferidos por el F' (Miller 1972).

6. Construcción de merodiploides heterocigotas para el operón *moa*⁺. La cepa receptora de interés fue transformada con el plásmido pSJE100 (Rivers *et al.* 1993), según metodología descrita (Saambrook *et al.* 1989). Clones independientes Ap^R Nit⁺ fueron seleccionados en el medio TNC suplementado con ampicilina, y una vez purificados se verificó la restauración de los fenotipos Nit⁺ Gas⁺; el plásmido fue extraído por lisis alcalina y su presencia física detectada en geles de agarosa (Saambrook *et al.* 1989).

7. Ensayos enzimáticos. Actividad *bGalactosidasa* (*bGal*). Se utilizaron células provenientes de cultivos crecidos en medio sintético. Volúmenes constantes de 0.25 ml se retiraron de cada cultivo, sometidos a tratamiento con cloranfenicol (CAM) a una concentración final de 25 µg/ml y conservados en frío. Siguiendo la metodología descrita por Miller (1972), las células se permeabilizaron con tolueno y se estimó espectrofotométricamente la hidrólisis del o-nitrofenol-β-D-galactopiranosido (ONPG); los valores se expresaron como Unidades Miller y fueron reproducibles en al menos tres experimentos independientes, con un porcentaje de desviación cercano a 10. **Actividad *Bencil Viológeno Nitrato Reductasa* (*BV-NR*).** Se ensayó electrofotométricamente en células enteras utilizando BV reducido como donador artificial de electrones (Ruiz-Herrera and Demos 1969, Jonson *et al.* 1984) y bajo atmósfera de nitrógeno. Una unidad de NR es la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1 µmol de nitrito min⁻¹ mg⁻¹ de proteína (Blasco *et al.* 1982). Las proteínas fueron estimadas espectrofotométricamente (Lowry *et al.* 1951).

RESULTADOS

Identificación de fusiones *moa::lac*.

Mutantes Chl^R Ap^R Nit⁻ de *E. Coli* inducidos por mutagénesis biológica de la cepa PC90 con el fago *MudI*(Mu-*I*_{cts}, *lacOZYA*, *ln3*)⁸ se seleccionaron

previamente (Ortega de L. 1982) para obtener nuevas cepas bacterianas conteniendo una fusión transcripcional *moa::lac*. Era de esperar que esos mutantes fuesen termolábiles (Casadaban and Cohen 1979), pleiotrópicamente Nit⁻ Gas⁻ (Puig *et al.* 1969) y no respondiesen a la reversión fenotípica por molibdato (Glaser and Demos 1971); además, si los genes *lac* portados por el genoma viral se integraron en el sentido de transcripción del operón *moa*, los mutantes manifestarían adicionalmente el fenotipo Lac⁺ (Casadaban and Cohen 1979).

La resistencia al clorato (Piéchaud *et al.* 1969) es el método de selección más utilizado porque permite recuperar un alto porcentaje de mutaciones pleiotrópicas que mapean en el operón *moa* (Puig *et al.* 1969, Case 1970, Glaser and Demos 1972, Lee *et al.* 1990, Ortega de L. 1982). Un centenar de clones independientes Chl^R Ap^R Nit⁻, identificados como MA, se caracterizaron aplicando criterios fisiológicos conocidos. Efectivamente, un 98% resultó Nit⁻ Gas⁻ y en su mayoría (90%) no revirtieron con molibdato; todos ellos conservaron el fenotipo Frd⁺ (Lambden and Guest 1976), descartando que el efecto pleiotrópico fuese ocasionado por una mutación en el gen *inr* (Spiro and Guest 1990). La adquisición del fenotipo Lac⁺ se ensayó en medios sólidos (sintéticos y diferenciales) y por coloración azul en presencia de Xgal. Sólo un 10% manifestó llevar una fusión transcripcional, porque además habían adquirido los fenotipos ImmMu y Ts⁺ conferidos por la presencia del profago *MudI* (Casadaban and Cohen 1979); las fusiones se expresaron indistintamente de la presencia del nitrato y las condiciones de seración. El fenotipo Nit⁻ fue confirmado por la pérdida de actividad BV-NRA.

Construcción de cepas con una fusión *moa::lac* estabilizada.

El operón *moa* está localizado en el minuto 17.8 del cromosoma de *E. coli* K12 (Rivers *et al.* 1993) y al igual que los operones *mod* y *moe*, puede ser cotransferido con la región *gal* (Bachman 1990). Mutaciones en cualquiera de ellos se localizan claramente según los valores de ligamiento (Puig and Azoulay 1967, Venables and Guest 1968, Puig *et al.* 1969, Glaser and Demos 1972, Venables 1972, Dagert and Puig 1976, Stewart 1988), además sólo las que ocurren en *mod* revierten fenotípicamente con molibdato (Glaser and Demos 1971). En un análisis preliminar, tres clones Nit⁻ Gas⁻ Lac⁺ identificados como MA17, MA25 y MA30 se cruzaron con la cepa receptora LCB413. Un centenar de transductantes independientes Gal⁺ se ensayaron en cada cruce, obteniéndose valores de ligamiento cercanos

a 20% (MA25), 28% (MA30) y 32% (MA17). Esos valores caen dentro del rango (20%), que es consistente con una mutación en el operón *moa*; además, la totalidad de los Gal⁺ Nit⁻ Gas⁻ ensayados adquirieron el fenotipo Bio⁺, indicando que la mutación está localizada a la derecha de la región *gal* (Puig *et al.* 1969, Bachman 1990, Shanmugan *et al.* 1992). Valores de ligamiento muy similares a los anteriores fueron luego obtenidos con la cepa receptora CSH41 (*lac*); de cien clones independientes Gal⁺ ensayados sólo los Nit⁻ Gas⁻ recibieron el carácter Lac⁺, mostrando que las tres cepas donantes analizadas contienen una fusión transcripcional *moa::lac*.

El proceso de transducción permite construir cepas conteniendo fusiones únicas, al reducir la posibilidad de cotransferir simultáneamente más de una fusión que pudiera estar contenida en la cepa donante. Transductantes Gal⁺ Nit⁻ Gas⁻ Lac⁺ (cruce MA25 x CSH41), termotolerantes espontáneos, manifestaron las características de una fusión única y además estabilizada: habían perdido los fenotipos ImmMu y Ap^R junto con el Ts⁺ (Griffiths and Cole 1987), presumiblemente por una delección en el extremo *c* terminal del genoma viral (Wanner *et al.* 1981). La presencia de ese tipo de fusión fue confirmada en el clón OM86 (Tabla 1), usando los derivados merodiploides heterocigotos construidos al transferirle el plásmido pSJE100*moa*⁺ (Rivers *et al.* 1993). De cincuenta transformantes independientes Ap^R ensayados, todos mostraron el fenotipo restaurado Nit⁺ Gas⁺ y continuaron siendo Lac⁺ termotolerantes; dicha restauración es atribuible a la activación en trans mediada por el operón *moa*⁺ del plásmido, cuya presencia física fue confirmada en geles agarosa.

La localización genómica de la fusión fue confirmada por tratamiento con naranja acridina, obteniéndose derivados que se habían curado del factor F' residente, y aún conservaban los fenotipos conferidos por la fusión *moa::lac*. La localización precisa de esta fusión en uno de los cinco cistrones que conforman el operón *moa* (Rivers *et al.* 1993) no fue objeto de análisis en este trabajo.

Expresión de la fusión *moa::lac* en cultivos de fase estacionaria prolongada.

La regulación del promotor *moa* en el nivel transcripcional se estudió en la cepa OM86 que por contener una fusión única y estabilizada *moa::lac*, reduce la posibilidad de que se generen fusiones secundarias (Wanner *et al.* 1981, Griffiths and Cole 1987). Los efectos mediados por diferentes condiciones

de cultivo, incluyendo las que controlan la expresión de los operones *narGHIIJ* y *mod*, fueron valorados en cultivos de fase estacionaria prolongada (una noche de crecimiento) estimando la biosíntesis acumulativa de la βGal codificada por el gen *lacZ* fusionado.

La fusión *moa::lac* se expresó bajo las distintas condiciones ensayadas (Tabla 2) y no pareció depender de algún factor exógeno o fisiológico. No obstante, se observó una diferencia en los niveles acumulativos alcanzados, con respecto al control crecido con galactosa, así vale destacar lo siguiente: i. En aerobiosis, los valores fueron inferiores por efecto de la glucosa (25%) 0 de los casaminoácidos (33%), pero incrementaron con molibdato, azida y nitrato (12-19%); ii. En anaerobiosis, los valores fueron inferiores por efecto de la glucosa (27%), pero incrementaron en forma parcial con clorato (31%) y marcadamente con casaminoácidos (121%). Con respecto al valor relativo de la expresión aeróbica frente a la anaeróbica, fue mayor a la unidad, indicando que las condiciones aeróbicas favorecen la expresión; sin embargo, un efecto inverso se observó en presencia de los casaminoácidos, pero su explicación aún se desconoce.

Tabla 2. Expresión transcripcional de la fusión *moa::lac* en cultivos crecidos bajo diferentes condiciones.

Tratamiento ^a	Unidades Miller βGal ^b		% Efecto ^c		Variación ^d expresión aeróbica
	Aer-Aer	Ana-Ana	Aer-Aer	Aer-Ana	
GalHit	260	126	19	-3	2,0
GalAzi	250	130	14	0	1,9
GalMob	246	140	12	8	1,8
GalChl	215	170	-2	31	1,3
Glu	165	95	-25	-27	1,7
Lac	215	130	-2	0	1,7
LacCas	147	287	-33	121	0,5
Gal	218	130	0	0	1,7

a: Dos precultivos crecidos con Gal se diluyeron en medio sintético fresco para preparar cultivos paralelos Aer-Aer y Ana-Ana, respectivamente, que crecieron bajo las condiciones indicadas; el cultivo control sólo contiene Gal.

b: Biosíntesis acumulativa de βGal (unidades Miller), como una medida de la expresión de la fusión en cultivos de fase estacionaria prolongada.

c: Porcentaje del efecto ejercido por la condición de crecimiento, calculado como 100 x Unidades Miller (en una condición dada – control/control).

d: Variación relativa de la expresión aeróbica, calculada como Unidades Miller (Aer/Ana).

Efecto de la glucosa sobre la cinética de expresión aeróbica de la fusión *moa::lac*.

Por cuanto la expresión de la fusión, en cultivos de fase estacionaria prolongada, se mostró sensible a la represión catabólica, fue de interés evidenciar si además responde a la represión transitoria mediada por glucosa (Kepes 1969, Alberts *et al.* 1983). Se realizó un experimento de cinética Aer-Aer, donde células precultivadas con Gal fueron ahora crecidas con Glu y la expresión aeróbica de la fusión se valoró estimando la biosíntesis acumulativa de β Gal durante las primeras cinco horas de cultivo.

Fue posible observar una disminución progresiva en los niveles de expresión aeróbica (Fig. 2) seguida por una fase de expresión máxima que comenzó tardíamente alrededor de las 3 h del tiempo de cultivo (A_{600} de 0.58), para luego incrementar en 52% a las 5.00 horas (Tabla 3).

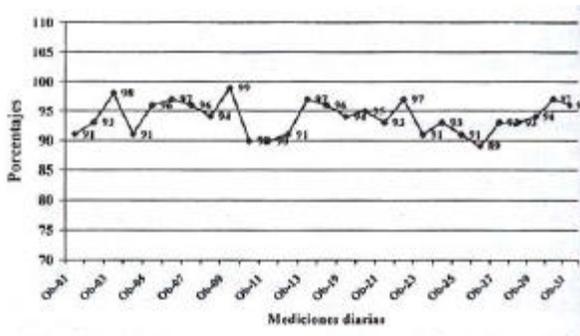


Fig. 2. Efecto de la represión transitoria por glucosa sobre la cinética de expresión aeróbica de la fusión *moa::lac*. Un precultivo aeróbico crecido con Gal se diluyó en medio sintético fresco para permitir el crecimiento bajo las mismas condiciones de aeración. Una cinética Aer-Aer se inició por adición de Glu () a la concentración final de 1 mg/ml. A intervalos de tiempo predeterminados, se cuantificaron el crecimiento celular (A_{600}) y la biosíntesis acumulativa de β Gal (unidades Miller).

Como curva control () se incluyeron los valores del cultivo Aer-Aer creciendo con Gal (Fig. 1).

Comparando con el cultivo control Aer-Aer que se mantuvo creciendo a expensas de Gal, se observó claramente que el crecimiento con Glu fue superior a lo largo del tiempo y conllevó a una reducción progresiva en la expresión aeróbica de la fusión. El control negativo mediado por la glucosa fue transitorio, ya que

la expresión comenzó a incrementar en una etapa avanzada del crecimiento exponencial; esta transición puede ser atribuible a una disminución en la disponibilidad de dicho azúcar durante el crecimiento, ya que el efecto represivo fue reproducible cuando se adicionó glucosa al inicio de la fase estacionaria (datos no presentados). El nivel máximo de expresión, por crecimiento con Glu fue 1.6 veces menor que con Gal a las 5 h de cultivo; sin embargo, el porcentaje de incremento resultó similar en ambos casos (Tabla 3).

DISCUSIÓN

En *E. coli* K12, los genes *mol* (*moa*, *mob*, *mod*, *moe*, *mog*) (Shanmugan *et al.* 1992) participan en la biosíntesis de un molibdocofactor, MoCo, requerido para la activación de diferentes molibdoenzimas y una de ellas es la NRA (Stewart 1988).

En este trabajo se construyó una cepa bacteriana, la OM86, que presenta una fusión de operón única y estabilizada *moa::lac*, con el propósito de estudiar los factores de control fisiológico que actúan sobre la regulación transcripcional del operón *moa*.

Pudo observarse que en los cultivos de fase estacionaria prolongada, la expresión de la fusión *moa::lac* bajo estudio no pareció depender de algún inductor fisiológico exógeno ni fue susceptible a un efecto negativo mediado por la aerobiosis, mostrando similitud con la regulación de la biosíntesis del MoCo (Amy 1981, Miller and Amy 1983), pero no así con la molibdoenzima NRA (Ruiz-Herrera and Salas-Vargas 1976, Fimmel and Haddock 1979, Giordano *et al.* 1980, Chippaux *et al.* 1981, Stewart 1988, 1993). Dado que los productos Moa participan en la biosíntesis de la molibdopterina (MPT) del MoCo (Johnson and Rajagopalan 1987a y 1987b, Wooton *et al.* 1991), estos resultados son consistentes con la presencia de la fusión deseada. Además, se observó que la expresión de la fusión es parcialmente sensible a la represión por glucosa y variablemente afectada por la presencia de casaminoácidos, dependiendo de las condiciones de aeración; ningún estudio sobre los efectos mediados por esos dos factores se había reportado con anterioridad.

Se realizaron cinéticas de expresión por crecimiento con Gal, y se estudió el posible efecto ejercido por los cambios transitorios en las condiciones de aeración. Comparando las cinéticas Aer-Aer, Ana-Aer y Aer-Ana (Fig. 1) fue posible observar que la expresión de la fusión *moa::lac* bajo estudio mostró un patrón de inducción que parecía transcurrir en forma periódica, y presentaba más de una etapa de expresión a lo largo del

tiempo de cultivo, las cuales coincidían en las tres cinéticas, pero diferían particularmente según los cambios transitorios de seración; dichas etapas de expresión son las siguientes: i. *Inmediatamente temprana* (0-2 h), que sólo mostró un incremento máximo apreciable en la cinética Ana-Aer; ii. *Temprana* (2-3.3 h), con incremento máxima en todas las cinéticas, pero la inducción fue favorecida en células mantenidas bajo condiciones aeróbicas de crecimiento Aer-Aer; iii. *Tardía* (3.3-5 h), sólo mostró incremento máximo en Aer-Aer y Aer-Ana.

Tal comportamiento en la expresión de la fusión *moa::lac* mostró similitud con procesos que transcurren con oscilaciones biológicas donde pudiesen participar más de dos fenómenos distintos en respuesta al estado metabólico de las células según las condiciones de aeración (Sanwall 1970, Smith and Neidhart 1983). Los controles de oscilación pueden ser mediados por pocas enzimas, las cuales en principio podrían proveer un reloj interno que le permite a una célula "medir el tiempo" y, por ejemplo, realizar ciertas funciones a intervalos fijos (Alberts *et al.* 1983).

De esa manera, la ocurrencia de oscilaciones biológicas durante la expresión de la fusión *moa::lac*, está indicando la participación de controles fisiológicos internos relacionados con la función de los genes *mol*. Dado que la acción génica del operón *moa* es requerida para la biosíntesis de la MPT, uno de los precursores iniciales en la ruta biosintética del MoCo (Johnson and Rajagopalan 1987a y 1987b, Wooton *et al.* 1991), dichas oscilaciones podrían representar un mecanismo muy eficiente para las bacterias, al permitirle controlar tempranamente dicho proceso frente a la demanda del metabolismo celular, y en asociación con otros factores como la edad del cultivo, la velocidad del crecimiento y las condiciones de aeración.

la biosíntesis aeróbica del MoCo (Miller and Amy 1983) y la inducción anaeróbica de la molibdoenzima NRA (Chippaux and Pichinoty 1970, Fimmel and Haddock 1979, Giordano *et al.* 1980), también son procesos con dos fases que difieren entre sí con respecto a su eficiencia, pero ellos no están sometidos a las mismas señales de control. Estos hechos, junto a los resultados obtenidos en el presente trabajo, están a favor de la participación de circuitos de control múltiple sobre la expresión del operón *moa*. El papel negativo del MoCo fue evidenciado previamente sobre la expresión transcripcional de este operón (Baker and Boxer 1991). Por último, se estudió el efecto de la glucosa sobre la cinética de expresión aeróbica de la fusión *moa::lac* (Fig. 2). Los resultados indicaron que, además de la represión catabólica observada en los cultivos de fase

estacionaria prolongada, la expresión de la fusión fue sensible a la represión transitoria durante el crecimiento exponencial. Dado que los productos Moa participan en la biosíntesis de la MPT del MoCo (Johnson and Rajagopalan 1987a y 1987b, Wooton *et al.* 1991), estos resultados permiten sugerir que dicho proceso es sensible a la represión por glucosa.

En los estudios aquí realizados, los niveles de expresión siempre disminuyeron parcialmente cuando los cultivos se encontraban en la fase estacionaria prolongada (Tabla 2). Estos resultados son consistentes con que la edad del cultivo y la limitación en la disponibilidad de oxígeno debido al incremento celular, son factores que actúan modulando la expresión de la fusión.

AGRADECIMIENTOS

Me complace agradecer al Dr. J. DeMoss (Universidad de Texas, Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Houston, EUA) sus valorables comentarios sobre esta investigación; a la Dra. Arminda Orozco de Silva por su colaboración para obtener los mutantes MA (Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias, Mérida, Venezuela); al Dr. M. Chippaux (CNRS, LBC, Marsella, Francia) por sus comentarios y suministro del plásmido pSJE100. Al Dr. J. Puig (Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias, Mérida, Venezuela) deseo reconocer su enseñanza como pionero en el tema objeto de la presente investigación. Al CDCHT-ULA (Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico) por el soporte financiero proveniente de los distintos proyectos en ejecución.

REFERENCIAS

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Waston J. 1983. Molecular biology of the cell. Garland. New York.
- Amy N. 1981. Identification of the molybdenum cofactor in chlorate resistant mutants of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 148: 274-282.
- Amy NK, Rajagopalan KV. 1979. Characterization of the molybdenum cofactor in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 140: 114-124.
- Bachman BJ. 1990. Linkage map of *Escherichia coli* K-12. Edition 8. Microbiol. Rev. 54: 130-197.

- Baker KP, Boxer DH. 1991. Regulation of the *chlA* locua of *Escherichia coli* K12: Involvement of the molybdenum cofactor. *Mol. Microbiol.* 5: 901-907.
- Blasco F, Nunzi F, Pommier J, Brasseur R, Chippaux M, Giordano G. 1992. Formation of active heterologous nitrate reductases between nitrate reductases A and Z of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 6: 209-219.
- Bonnefoy-Orth V, Lepelletier M, Pascal M-C, Chippaux M. 1981. Nitrate reductase and cytochrome $b_{\text{nitrate-reductase}}$ structural genes as parts of the nitrate reductase operon. *Mol. Gen. Genet.* 181: 535-540.
- Casadaba M, Cohen S. 1979. Lactose genes fused to exogenous promoters in one sep using a Mu-*lac* bacteriophage: *in vivo* probe for transcriptional control signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76: 4530-4533.
- Case F. 1970. Mapping of the genes *chlB* controlling membrane-bound nitrate reductase and formic hydrogen lyase activities in *Escherichia coli* K12. *Biochem. Biophys. Acta* 39: 429-436.
- Chippaux M, Bonnefoy-Orth V, Ratouchniack J, Pascal M-C. 1981. Operon fusions in the nitrate reductase operon and study of the control gene *nir R* in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 182: 477-479.
- Chippaux M, Pichinoty F. 1970. Les nitrate-réductases bactériennes. V. Induction de la biosynthèse de l'enzyme A par l'azture. *Arch. Mikrobiol.* 71: 361-366.
- Dagert M, Puig J. 1976. Mapeo del gen *chlE* en *Escherichia coli* K12. *Acta Cient. Venez.* 27: 85-87.
- Edwards ES, Rondeau SS, Demos JA. 1983. Operon of *Escherichia coli* includes structural genes for and subunits of nitrate reductase. *J. Bacteriol.* 153: 1513-1520.
- Fimmel A, Haddock B. 1979. Use of *chlC-lac* fusions to determine regulation of gene *chlC* in *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* 138: 726-730.
- Giordano G, Boxer DH, Pommier J. 190. Molybdenum cofactor requirement for *in vitro* activation of apomolybdoenzymes of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 4: 645-650.
- Giordano G, Haddock BA, boxer DH. 1980. Molybdenum limited growth achieved either phenotypically or genotypically and its effect on the synthesis of formate dehydrogenase and nitrate reductase by *Escherichia coli* K12. *FEMS Microbiol. Lett.* 8: 229-235.
- Glaser JH, DeMoss JA. 1971. Phenotypic restoration by molybdate of nitrate reductase activity in *chlD* mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 108: 854-860.
- Glaser JH, DeMoss JA. 1972. Comparison of nitrate reductase mutants of *Escherichia coli* selected by alternative procedures. *Mol. Gen. Genet.* 116: 1-10.
- Griffiths L, Cole J. 1987. Lack of redox control of the anaerobically induced *nirB⁺* gene of *Escherichia coli* K12. *Arch. Microbiol.* 147: 364-369.
- IngledeW WJ, Poole RK. 1984. The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 48: 222-271.
- Ibbi-Nivol Ch, palmer T, Whitty P, McNairn E, Boxer D. 1995. The *mob* locus of *Escherichia coli* K12 required for molybdenum cofactor biosynthesis is expressed at very low levels. *Microbiol.* 141: 1663-1671.
- Johnson JL, Hainline BE, Rajagopalan KV, Arison BH. 1984. The pterin component of the molybdenum cofactor. Structural characterization of two fluorescent derivatives. *J. Biol. Chem.* 259: 5414-5422.
- Johnson JL, Rajagopalan KV. 1987a. *In vitro* system for molybdopterin synthesis. *J. Bacteriol.* 169: 110-116.
- Johnson JL, Rajagopalan KV. 1987b. Involvement of *chlA*, *E*, *M*, and *N* loci in *Escherichia coli* molybdopterin synthesis. *J. Bacteriol.* Q69: 117-125.
- Kepes A. 1969. Transcription and translation in the lactose operon of *Escherichia coli* studied by *in vivo* kinetics. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. Pergamon. Oxford. pp 204-205.
- Lambden PR, Guest JR. 1976. Mutants of *Escherichia coli* K12 unable to use fumarate as an anaerobic electron acceptor. *J. Gen. Microbiol.* 97: 145-160.
- Lee JH, Wendt JC, Shanmugan KT. 1990. Identification of a new gene, *molR*, essential for utilization of molybdate by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172: 2079-2087.

- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. 1951. Protein determination with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Maupin-Furlow JA, Rosentel JK, Lee JH, Deppenmeier U, Gunsalus RP, Shanmugan KT. 1995. Genetic analysis of the *moaABCD* (molybdate transport) operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177: 4851-4856.
- Miller JH. 1972. Experiments in molecular Genetics. Cold Spring harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. U. S. A.
- Miller J, Amy N. 1983. Molybdenum cofactor in chlorate resistant and nitrate reductase-deficient insertion mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 155: 793-801.
- Miller JB, Scott, DB, Amy NK. 1987. Molybdenum-sensitive transcriptional regulation of the *chlD* locus of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169: 1853-1860.
- Ortega de L. M. 1982. Obtención y caracterización de clones transductantes de *Escherichia coli* K12 llevando fusiones *chl::MudI*, seleccionados utilizando tres métodos diferentes. Tesis de Maestría en Biología Molecular. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.
- Pascal M-C, Chippaux M. 1982. Involvement of a gene of the *chlE* locus in the regulation of the nitrate reductase operon. *Mol. Gen. Genet.* 185: 334-338.
- Piéchaud M, Pichinoty F, Azoulay E, Councound-Beaumont P, Gendre J. 1969. Recherches sur des mutans bactériens ayant perdu les activités catalytiques liées a la nitrate-reductase A. I. Description des méthodes d'isolement. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 116: 276-287.
- Pitterle DM, Rajagopalan KV. 1989. Two proteins encoded at the *chlA* locus constitute the converting factor of *Escherichia coli chlA1*. *J. Bacteriol.* 171: 3373-3378.
- Puig J, Azoulay E. 1967. Etude génétique et biochimique des mutans resistant au ChlO_3 (genes *chlA*, *chlB*, *chlC*). *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 264: 1916-1918.
- Puig J, Azoulay E, Gendre J, Richard E. 1969. Etude génétique des mutans de la region *chlA* chez l' *Escherichia coli* K12. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 268: 183-184.
- Rivers SL, McNairm E, Blasco F, Giordano G, Boxer DH. 1993. Molecular genetic analysis of the *moa* operon of *Escherichia coli* K12 required for molybdenum cofactor biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 8: 1071-1081.
- Rosentel JK, Healy F, Maupin-Furlow JA, Lee JH, Shanmugan KT. 1995. Molybdate and regulation of *mod* (molybdate transport), *fdhF*, and *hyc* (formate hydrogenlyase) operons in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177: 4857-4864.
- Ruiz-Herrera J, DeMoss JA. 1969. Nitrate reductase complex of *Escherichia coli* K12: Participation of specific formate dehydrogenase and cytochrome b components in nitrate reduction. *J. Bacteriol.* 99: 720-729.
- Ruiz-Herrera J, Salas-Vargas I. 1976. Regulation of nitrate reductase at the transcriptional and translational levels in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 425: 492-501.
- Saambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. U. S. A.
- Sanwall B. 1970. Allosteric control of amophibolic pathways in bacteria. *Bacteriol. Rev.* 34: 20-39.
- Shanmugan KT, Boxer DH, Cole JA, Chippaux M, DeMoss JA, Giordano G, Guest J, Gunsalus RP, Lin ECC, Rajagopalan KV, Stewart V. 1992. Proposed nomenclature for the genes involved in molybdenum metabolism in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 6: 3452-3454.
- Smith M, Neidhardt F. 1983. Proteins induced by aerobiosis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 154: 344-350.
- Sodergren EJ, DeMoss JA. 1988. *Nar I* region of the *Escherichia coli* nitrate reductase (*nar*). Operon contains two genes. *J. Bacteriol.* 170: 1721-1729.
- Spiro S, Guest J. 1990. FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 75: 399-428.
- Stewart V. 1988. Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in *Enterobacteria*. *Microbiol. Rev.* 52: 190-232.

Stewart V. 1993. Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 9: 425-434.

Venables W. 1972. Genetic studies with nitrate reductase-less mutants of *Escherichia coli*: I. Fine structure analysis of the *narA*, *narB* and *narE* loci. Mol. Gen. Genet. 114: 223-231.

Venables W, Guest J. 1968. Transduction of nitrate reductase loci of *Escherichia coli* by phages P1 and λ . Mol. Gen. Genet. 103: 127-140.

Wanner B, Shawnee W, Roger McS. 1981. Use of bacteriophage transposon Mud1 to determine the orientation for three *proC*-linked phosphate-starvation-inducible (*psi*) genes in *Escherichia coli* K12. J. Bacteriol. 146: 93-101.

Wootton JC, Nicholson RE, Cock JM, Walters DE, Burke JF, Doyle WA, Bray RC. 1991. Enzymes depending on the pterin molybdenum cofactor: sequence families, spectroscopic properties of molybdenum and possible cofactor-binding domains. Biochim. Biophys. Acta 1057: 157-185.