

Tesis de Posgrado

Regulación del transporte de precursores de la síntesis de RNA en escherichia coli por el AMP cíclico

Judewicz, Norberto D.

1974

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Judewicz, Norberto D.. (1974). Regulación del transporte de precursores de la síntesis de RNA en escherichia coli por el AMP cíclico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1449_Judewicz.pdf

Cita tipo Chicago:

Judewicz, Norberto D.. "Regulación del transporte de precursores de la síntesis de RNA en escherichia coli por el AMP cíclico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1974.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1449_Judewicz.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"REGULACION DEL TRANSPORTE DE PRECURSORES
DE LA SINTESIS DE RNA EN
ESCHERICHIA COLI POR EL AMP CICLICO"

AUTOR: Lic. Norberto D. Judewicz

DIRECTOR: Dr. Héctor N. Torres

LUGAR DE TRABAJO: Instituto de Investigaciones Bioquímicas
"Fundación Campomar"

*Tesis presentada para optar al título de Doctor en Química
Orientación Biológica*

1974

2/2

A Marta y a Martín

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Héctor N. Torres, maestro y compañero en el trabajo.

*Al Dr. Carlos E. Cardini, quien guió mis primeros pasos en la investi
gación bioquímica.*

*Al Dr. Luis F. Leloir por haber hecho posible mi trabajo en el Insti-
tuto.*

*A mi amigo Eddy De Robertis, compañero en experimentos exitosos y
"de los otros".*

*A los que han compartido horas de trabajo y compañerismo en el labora-
torio: Mirtha M. Flaxid, María Teresa Iñón, Patricia Leoni, Plácido
Pucci, Estela Surian y Alfredo Vallota.*

A Margarita Mazzardi por su eficiente colaboración técnica.

A mi esposa, especialmente, por haber hecho legibles mis manuscritos.

ABREVIATURAS

ADP: Adenosina difosfato

AMP: Adenosina 5' - monofosfato

AMP cíclico: Adenosina 3' - 5' monofosfato cíclico

ATP: Adenosina trifosfato

BHK: British hamster kidney

CAP: Catabolite - gene activator protein

cpm: Cuentas por minuto

Crp: Cyclic AMP receptor protein

DNFB: Dinitrofluorobenceno

DNP: Dinitrofenol

D.O.: Densidad óptica

IPTG: Isopropil β D-tiogalactósido

NEM: N - etil maleimida

PCMB: P - cloromercuribenzoato

PPi: Pirofosfato inorgánico

PRPP: Fosforribosil pirofosfato

TCA: Acido tricloroacético

UMP: Uridina 5' monofosfato

INTRODUCCION

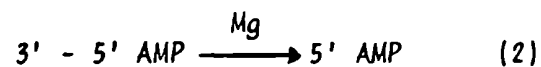
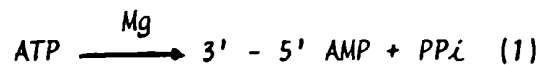
La molécula de AMP cíclico

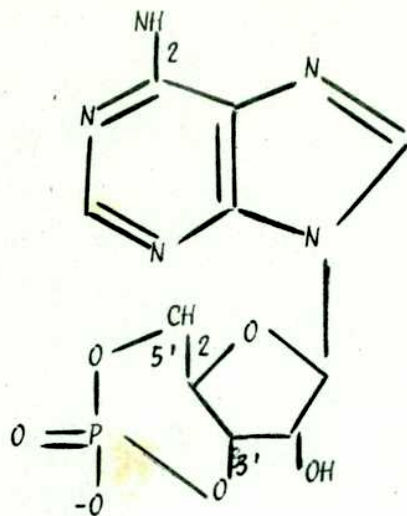
El AMP cíclico (adenosina 3' - 5' monofosfato cíclico) fue descubierto en 1956 por Earl W. Sutherland al observar el efecto de un factor termoes estable mediador de la acción de la adrenalina y el glucagón en la activación de la fosforilasa de glucógeno en hígado.

Sutherland formuló la hipótesis de que el AMP cíclico era como un segundo mensajero que servía como transmisor de los efectos de una variedad de hormonas sobre la actividad de ciertas enzimas (1).

En general este nucleótido cíclico ejerce una multitud de funciones regulatorias que difieren de órgano a órgano, de tejido a tejido y de célula a célula (2).

Es una molécula versátil que actúa regulando la función celular en respuesta a cambios en el medio externo. Su concentración intracelular es función de estímulos físico- químicos y hormonales que regulan la actividad de la enzima que cataliza su síntesis a partir de ATP: la adenilato ciclasa y de la que es capaz de degradarlo a AMP - 5': la fosfodiesterasa específica (ecuaciones 1 y 2 respectivamente).





Adenosina 3' - 5' monofosfato
cíclico

La estructura del AMP cíclico es una purina con sus dos anillos heterocíclicos, unida a una ribosa que forma un anillo furanósico, a su vez ligada a un grupo fosfato a través de su posición 5'. Hasta aquí, es similar al AMP - 5' y la diferencia con éste consiste en el cuarto anillo que se forma al completarse la unión fosfodiéster con la ribosa en la posición 3'. Esta unión fosfodiéster implica que el residuo de ácido fosfórico está esterificado por condensación con dos grupos hidroxilo en la misma molécula.

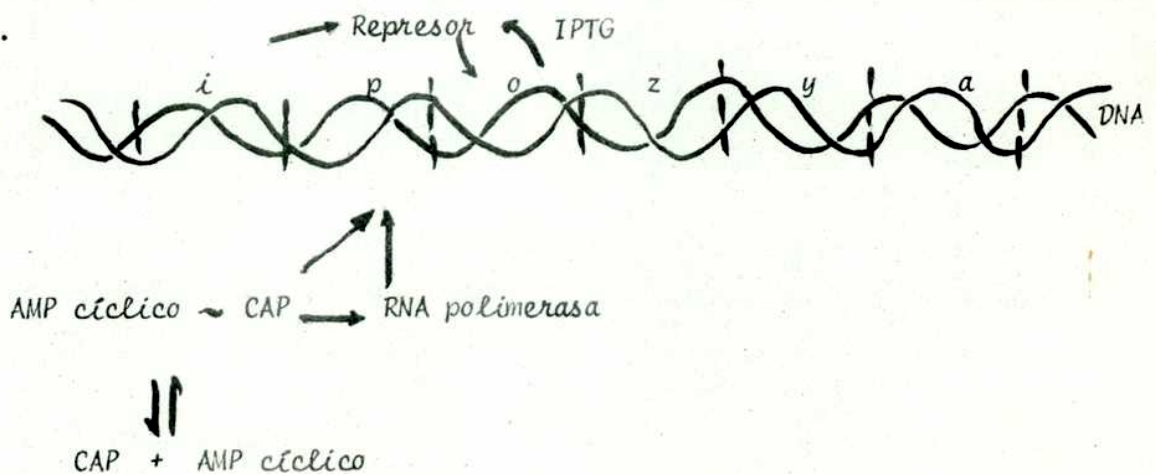
El AMP cíclico no se destruye a ebullición durante 10 minutos en un amplio rango de pH. En condiciones extremas ácidas o alcalinas, se produce preferencialmente la ruptura en la posición 5'.

El AMP cíclico en bacterias

Desde el año 1965 en que Makman y Sutherland encontraron AMP cíclico en *Escherichia coli*, han sido descritas hasta el presente, una serie de propiedades del mismo en el control del metabolismo de bacterias a distintos niveles, entre ellos el de transcripción genética y el de traducción del RNA mensajero.

Aparentemente el AMP cíclico ejercería un control positivo sobre la iniciación de la transcripción a nivel de promotor de los operones sensibles a la glucosa (3), como por ejemplo el operón de lactosa.

Existe una proteína específica CAP (catabolite-gene activator protein) o Crp (cyclic AMP receptor protein) que se une al AMP cíclico y luego al contactarse con la zona del DNA correspondiente al gen promotor, permite a la RNA polimerasa, la transcripción de ciertos genes estructurales que dependen de este mecanismo para su expresión (ver esquema).



En la figura se muestra un esquema de la acción del complejo CAP - AMP cíclico en el operón de la lactosa.

Los genes reguladores están representados por i: inductor; p: promotor y o: operador. Los estructurales z; y; a codifican para β -galactosidasa, galactósido permeasa y tiogalactósido transacetilasa respectivamente. El gen i codifica para un represor que se une al operador e impide la transcripción del RNA mensajero de lactosa. El IPTG es el inductor que reduce la afinidad del represor por el gen o estimulando la transcripción. El gen promotor es el sitio donde se une la RNA polimerasa para iniciar la transcripción de los genes estructurales. A ese nivel actúa el complejo CAP - AMP cíclico.

De este modo, los efectos del nucleótido cíclico encontrados hasta al presente, a nivel de transcripción en bacterias están mediados por esta proteína CAP que fue aislada de E.coli en 1970, independientemente por los grupos de Emmers (4) y Zubay (5).

Ciertas evidencias indicaban la posible acción del AMP cíclico a nivel de traducción del RNA mensajero. Se encontró que la síntesis de triptofanasa en E.coli era estimulada por el AMP cíclico aún cuando se hubiera agregado proflavina al ensayo (6). Se supuso que el AMP cíclico actuaba a nivel de traducción descontando la inhibición de la transcripción por el colorante. Sin embargo, según Pogell y colaboradores los colorantes tipo acridina actúan intercalándose en el DNA a nivel de promotor impidiendo la transcripción y el efecto del AMP cíclico sería una vez más en transcripción al reducir la afinidad del colorante

te por el DNA (7).

Represión catabólica y transitoria

Tal vez merezca un párrafo aparte la mención del fenómeno de la represión catabólica que ha sido objeto de estudio en varios laboratorios del mundo, a raíz del llamado "efecto glucosa".

De acuerdo a la economía de la bacteria, si bien la misma se adapta al crecimiento en distintas fuentes de carbono, no es posible que posea en su célula pequeña, un "stock" de todas las enzimas necesarias para la utilización de las mismas.

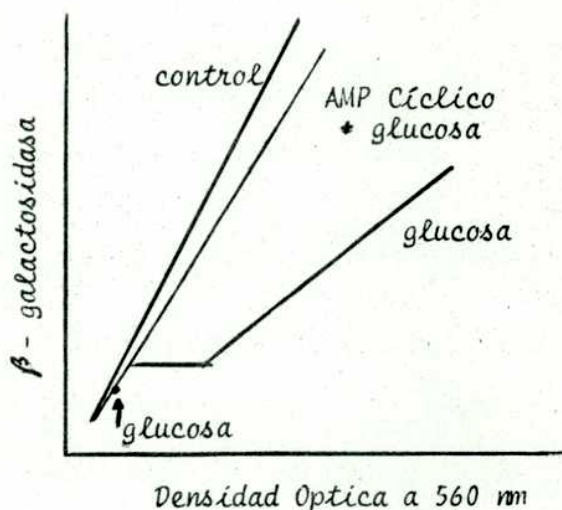
Existen una serie de enzimas inducibles por sustratos o inductores análogos. Por ejemplo la β -galactosidasa capaz de desdoblar lactosa en glucosa y galactosa, es inducible por la misma lactosa y por otros β galactósidos (ej. IPTG).

El AMP cíclico unido al CAP es necesario para permitir la transcripción del operón de lactosa que codifica para tres enzimas, a saber: β -galactosidasa, galactósido permeasa y tiogalactósido transacetilasa.

La transcripción genética de éste y otros operones inducibles es muy pobre en bacterias cultivadas en glucosa como única fuente de carbono, pues el nivel de AMP cíclico es mínimo en este caso.

Hasta ahora ha sido común distinguir entre dos tipos de efectos de la glucosa: la represión transitoria y la permanente de la

síntesis de enzimas inducibles. La primera se produce al agregar glucosa a un cultivo de bacterias en medio salino con glicerol o succinato y se observa una ausencia casi total de síntesis de β -galactosidasa durante 20 a 30 minutos. Luego de ese lapso, se establece la represión permanente, alcanzando el nivel de síntesis de la enzima, un valor no mayor al 50% del correspondiente al crecimiento bacteriano en ausencia de glucosa (8).



Paralelamente el nivel intracelular de AMP cíclico alcanza en la represión transitoria, valores aún menores que en la permanente. Sin embargo, en cultivos de *Escherichia coli* ambas son revertidas por agregado de AMP cíclico. Sólo es diferente la cantidad necesaria en cada caso para lograr el efecto esperado; la misma oscila entre 1 y 5 mM respectivamente (9) y (10).

Perlman y Pastan (6) aislaron mutantes de *E. coli* deficientes en adenilato ciclasa y observaron que no era posible cultivar-

las en ciertas fuentes de carbono, como lactosa, maltosa, arabinosa, glicerol, etc. cuyos operones son inducibles, a menos que se suplementara el medio de cultivo con AMP cíclico.

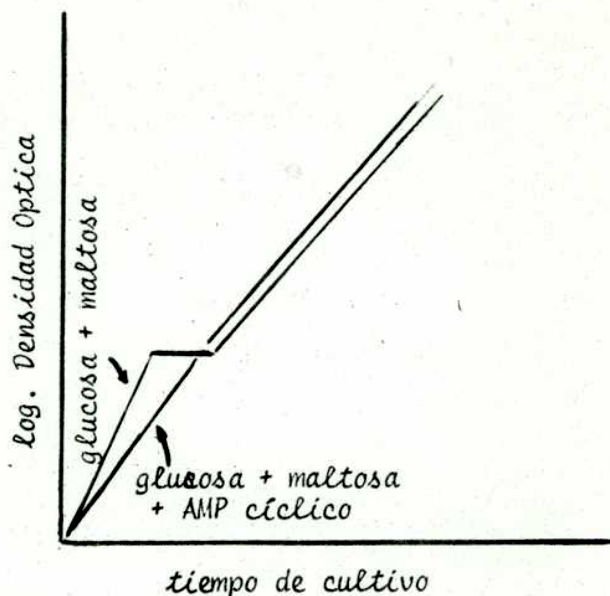
Existen otros tipos de mutantes de E.coli que tienen un fenotipo similar a las deficientes en adenilato ciclasa pero que contienen cantidades normales o mayores de esta enzima y de AMP cíclico. Pastan aisló dos mutantes de la proteína CAP que tienen menor afinidad de dicha proteína por el AMP cíclico y sugiere que esta alteración es la que determina el fenotipo pleiotrópico que condiciona la imposibilidad de la bacteria de crecer en una variedad de fuentes de carbono.

La respuesta diauxica y otros efectos del AMP cíclico

En cultivos de Escherichia coli en medio mínimo salino con fuente de carbono constituida por una cantidad limitante de glucosa y otro hidrato de carbono, por ejemplo maltosa, se observa en la curva de crecimiento, un período de "lag". En él la bacteria luego de consumir la glucosa detiene su duplicación mientras se adapta a la nueva fuente de carbono, habilitando el sistema enzimático para aprovecharla. Es el fenómeno de diauxia (11).

El "lag" o período de latencia que presenta la curva de crecimiento se suprime por el agregado de AMP cíclico.

En la figura siguiente se representa una curva de crecimiento ilustrando el fenómeno de diauxia.



Por otro lado, se ha observado en *Hemophilus influenzae*, que si se añade AMP cíclico al medio en que se cultiva, aumenta de 100 a 10000 veces la competencia para la transformación por DNA. Normalmente, ésta es máxima en la fase estacionaria temprana, cuando el nivel de AMP cíclico intracelular se eleva (12).

Otro efecto característico del AMP cíclico es la estimulación de la formación de flagelos, observado en *Salmonella typhimurium* y en *E. coli* (13), lo que relaciona a este nucleótido regulatorio con las funciones de motilidad.

Los niveles intracelulares de AMP cíclico

El nivel "natural" de AMP cíclico varía con las distintas especies bacterianas, con las cepas de cada una de ellas, con el medio

en que se las cultiva y con la etapa del crecimiento del cultivo que se analice.

Las distintas fuentes de carbono, permiten diferentes niveles del nucleótido en *E. coli*: es mayor en general para cultivos en succinato, glicerol, malato que para los de glucosa y piruvato en aproximadamente un orden de magnitud. Estas dos últimas sustancias, son las que producen represión catabólica.

El nivel de AMP cíclico se mantiene bajo mientras la bacteria crece exponencialmente en glucosa y se eleva en fase estacionaria o al consumirse el azúcar.

Se discute la existencia de un mecanismo eyector de AMP cíclico accionado directa o indirectamente por la glucosa, dado que no se observaron variaciones en las actividades de la adenilato ciclasa, ni de la fosfodiesterasa (enzimas sintetizante y degradativa del AMP cíclico respectivamente) (14).

El AMP cíclico y el crecimiento celular

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un estudio del efecto del AMP cíclico a nivel del crecimiento de cultivos bacterianos.

Se han logrado resultados que muestran una inhibición del ritmo de crecimiento de *Escherichia coli* cultivado en medio mínimo salino con glucosa en presencia del nucleótido cíclico, respecto del control en ausencia de dicha sustancia. En tales circunstancias se obtiene un

aumento de alrededor del 50% en el tiempo de duplicación, observable sólo en aquellas fuentes de carbono como glucosa y piruvato, para las que el contenido de AMP cíclico intracelular es mínimo y no en glicerol, malato o succinato (15). Estos últimos compuestos carbonados son ejemplo de los que no producen represión catabólica y que a su vez de terminan un nivel de AMP cíclico mayor en la bacteria.

Las motivaciones que nos llevaron al estudio del rol de este nucleótido en el control del metabolismo bacteriano, estaban fundadas en los hallazgos recientes a nivel de organismos eucarióticos.

Sería largo detallar cada uno de ellos, por lo que me limitaré a la mención de ciertos casos de interés.

Es sabido que las células tumorales crecen en desorden y a mayor velocidad que las células normales. Las primeras, no poseen inhibición por contacto del crecimiento en monocapa y por lo tanto se apilan en varias capas a la vez que adoptan caracteres morfológicos irregulares. Estas características se corresponden con valores intracelulares de AMP cíclico menores que en las células normales.

En cultivos de fibroblastos de sarcoma (16) el agregado de ⁶N - 2' O - dibutiril AMP cíclico (acil derivado del AMP cíclico que es más fácilmente absorbido por la célula) permite recuperar ciertas características celulares normales de crecimiento en monocapa y morfología regular.

Además es dable observar en cultivos de células normales

que se eleve la concentración de AMP cíclico al llegar el mismo al es
tado de confluencia celular.

Por otra parte, el agregado de suero o tripsina al cul
tivo de células 3T3 (17), estimula la síntesis de DNA y el crecimiento
a la vez que disminuye el nivel endógeno de AMP cíclico.

En fibroblastos de riñón de hamster (línea celular
BHK 21/13) se observan características de cepa transformada cuando se
cultiva en presencia de insulina. El efecto de esta droga es reverti-
do por el agregado de N⁶ butiril AMP cíclico y teofilina (una metil
xantina que inhibe la fosfodiesterasa) al medio; habiéndose demostra
do que la insulina inhibe la actividad de adenilato ciclasa de mem-
brana produciendo un descenso del nivel de AMP cíclico endógeno. (18).

Existen evidencias que indican que las células tumora-
les, que crecen en forma irregular y excesiva respecto de las normales,
poseen ciertas alteraciones en las propiedades de sus membranas plas-
máticas (19). Por un lado se sabe que la adenilato ciclasa ligada a
dichas membranas posee una actividad reducida respecto de las células
normales (20); y por otro lado se han detectado alteraciones a nivel
de la permeabilidad para ciertos precursores que ocasionarían un incre
mento de las concentraciones internas de nutrientes que regulan el cre
cimiento celular (21).

A nivel de permeabilidad celular se ha encontrado ade-
más, que el transporte y la incorporación de distintos precursores de

la síntesis de macromoléculas: nucleósidos, aminoácidos, etc. disminuye por el agregado de dibutiril AMP cíclico. Este hecho genera una reducción de la velocidad de síntesis de DNA y RNA (22) y (23).

Es de suponer, en cuanto a las células de crecimiento maligno que dado el bajo nivel de AMP cíclico existente en esos casos, el control del transporte a través de la membrana celular se torne insuficiente.

La intención de este trabajo

Al haberse extendido tanto el conocimiento del área de influencia de este nucleótido cíclico como regulador biológico, nuestros estudios sobre el crecimiento de la bacteria *Escherichia coli* en presencia de AMP cíclico, nos llevaron a analizar los mecanismos que potencialmente se afectarían a nivel de velocidad de síntesis de ácidos nucleicos y proteínas.

Los resultados obtenidos en este aspecto llevaron posteriormente al análisis de la incorporación de algunos precursores de la síntesis de RNA por mediciones de transporte a través de la membrana de la bacteria viviente.

El objeto de este trabajo de tesis es tratar de estudiar el efecto del AMP cíclico a nivel de la incorporación de uracilo en *Escherichia coli*, discutir su relación con el fenómeno observado a nivel del crecimiento bacteriano, caracterizar el mecanismo a través del

cual se afecta el transporte y obtener ciertos parámetros cinéticos del mismo.

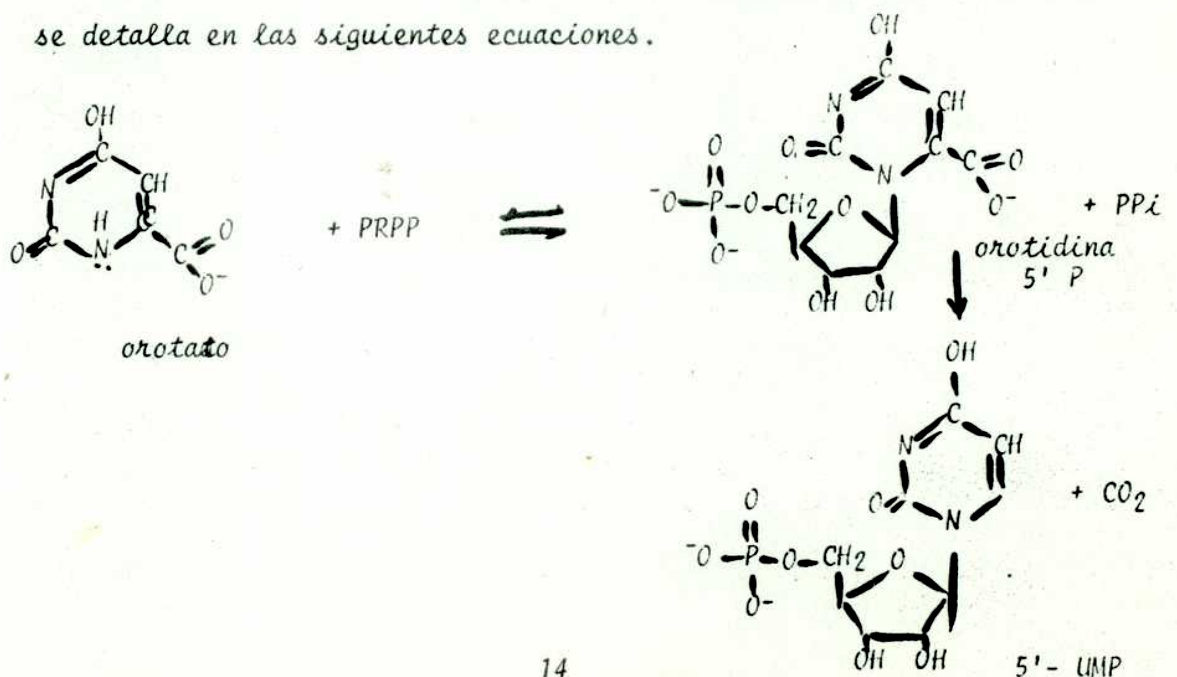
El metabolismo del uracilo en bacterias

En la mayor parte de las cepas de *E. coli* el uracilo se incorpora a la bacteria a través de una enzima periplásmica, la fosforribosil transferasa que cataliza su transformación a uridina 5' monofosfato (UMP) en presencia de fosforribosil pirofosfato (PRPP) (24).

Existe además una vía de síntesis de UMP a partir de orotato que con el PRPP da orotidina 5' fosfato que luego se descarboxila para dar 5' UMP.

En *E. coli* K-12 se comprobó que el PRPP estimulaba la incorporación de uracilo (25), por la vía de la fosforribosil transferasa.

El paso metabólico en que interviene el ácido orótico se detalla en las siguientes ecuaciones.



MATERIALES Y METODOS

A - CEPAS DE ESCHERICHIA COLI K-12 UTILIZADAS (26)

Hfr 3000: cepa wild type Hfr H; B_1^- (obsequio del Dr. Algranati).

Hfr 1100: PP6 (según la denominación de Perlman y Pastan), cepa wild type, B_1^- (atención de I. Pastan).

Hfr 5333 derivada de 1100: PP47 (Perlman y Pastan), B_1^- , Crp^- (4) (27) obtenida por tratamiento de la parental 1100 con nitroso guanidina y seleccionada como mutante pleiotrópica negativa en agar te trazolio con lactosa y galactosa (I. Pastan).

CA 8000: Hfr 3000 (enviada por J. Scaife).

CA 8306: Hfr H, b_1^- , Cya^- ; contiene una deleción en el gen de la adenilato ciclasa (28). Es una mutante espontánea obtenida y seleccionada en el laboratorio de Jonathan Beckwith, quién nos la obsequió.

3040: F^- , Ura^- , Arg^- , Sm^R , Rel^- , B_1^- (gentileza de C.S. de Rivas).

B - DROGAS Y MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizaron drogas proanálisis de las siguientes marcas reconocidas, en particular:

De Sigma: AMP, ADP, ATP, Adenosina, AMP cíclico, Uridina y Uracilo.

De Mallinkrodt: Glucosa, Fosfatos de potasio, Arseniato de sodio, Sulfato de amonio, Sulfato de magnesio.

Glicerol: Analar, ácido tricloroacético: Hoechst, succinato: Aldrich; malato: Schuchardt; 2-4 dinitrofenol: Eastman; rifampicina: Lepetit (obsequio); tiamina (vitamina B₁): Hoffman - La Roche; tolueno: Sintorgan.

De New England Nuclear: omni³fluor, uracilo (H):
1 mCi/ml - 1000 mCi/mM y uracilo (H): 1 mCi/ml - 50 mCi/ μ M; leucina
(C): 0,1 mCi/ml - 0,4 μ M/ml; Uridina 5 - (H): Schwartz, 24 Ci/mM -
0,5 mCi/ml.

Medios de cultivo

Las bacterias se cultivaron en medio mínimo (14) que contenía 14 g de K₂HPO₄; 6 g de KH₂PO₄; 2 g de (NH₄)₂SO₄; y 0,2 g de MgSO₄ por litro, suplementado con 5 mg de tiamina.

Las diferentes fuentes de carbono, o sea: glucosa, succinato, malato o piruvato se usaron a una concentración de 25 mM y el glicerol al 0,5%.

C - PROCEDIMIENTOS DE CULTIVO

Los inóculos frescos se obtuvieron a partir de cultivos primarios de las distintas cepas en la fuente de carbono correspondiente que se mantuvieron a 30°C durante toda una noche. Una alcuota de dichos cultivos se utilizó en cada caso diluyendo con medio fresco hasta obtener alrededor de $1,5 \times 10^7$ bacterias por ml.

El crecimiento de las distintas cepas se realizó a 37°C, excepto en los casos en que se indique otro dato, y con una agitación de alrededor de 150 ciclos/min en baño termostático de agua. En los casos en que se indica, se agregó al cultivo desde su comienzo, una cantidad de AMP cíclico como para lograr una concentración final de 5 mM, y /o lo que se detalla en cada caso.

La curva de crecimiento fue seguida por lectura de densidad óptica del cultivo a 560 nm en un espectrofotómetro Beckman D.U. y representada en gráfico semilogarítmico en función del tiempo.

Se ha controlado la correspondencia lineal entre el número de células real y la densidad óptica leída, por medio de un conteo de bacterias en cámara Petroff-Hausser al microscopio óptico. También se demostró en varias ocasiones que la densidad óptica a 560 nm es directamente proporcional al número de bacterias viables tanto en los cultivos sin agregados como en los que se desarrollan en presencia de AMP cíclico, coincidiendo en ambos el valor de la pendiente de la recta. El número de bacterias viables se obtuvo haciendo recuento de colonias en

cajas de Petri conteniendo 1,5 % de agar nutritivo y sales y glucosa en las concentraciones detalladas para el medio líquido. Las muestras sembradas en cada caja fueron alícuotas de diversas diluciones del cultivo original.

D - METODOS EXPERIMENTALES

A partir de cultivos de *E. coli* en crecimiento logarítmico se tomaron alícuotas, se leyó la densidad óptica y se mantuvieron en hielo hasta el momento de su utilización con el objeto de detener el crecimiento.

D1 - MEDICIONES DE INCORPORACION DE URACILO (³H), LEUCINA (¹⁴C) Y URIDINA (³H)

La incorporación de precursores de la síntesis de RNA y proteínas se realizó incubando alícuotas de 100 μ l de cultivo bacteriano con las cantidades de precursor radioactivo, ya sea uracilo (³H), uridina (³H) o leucina (¹⁴C) que se detalla en cada caso. El volumen final era variable entre 110 y 120 μ l y está indicado en cada experimento.

Luego de tiempos variables de incubación a 37°C, se detuvo la reacción por agregado de 4 ml de ácido tricloroacético 5% y se filtró a través de filtros de nitrocelulosa (Selectron, S 80; 0,45 μ de poro) tipo Millipore. Se lavó dos veces más con iguales porciones del mismo ácido y se retiró el filtro, donde quedaron retenidas las bacterias rotas y las sustancias que se hubieron insolubilizado por agregado del ácido.

Los "tiempos cero" o blancos se realizaron sin incubación

agregando simultáneamente el radioactivo y el TCA para detener la reac
ción sobre la alcuota de cultivo.

Los filtros conteniendo el RNA y la proteínas que de tal
forma han sido desnaturalizadas y precipitadas, se secaron bajo lámpara
infrarroja.

Los ensayos realizados en la forma descrita son repro-
ducibles con un margen de error no mayor del 5%, lo que se ha comprobado
en experimentos desarrollados por duplicado y triplicado.

D2 - MEDICIONES DEL TRANSPORTE O CAPTACION TOTAL DE URACILO (H) O
URIDINA (H)

La incorporación total de uracilo (H) o uridina (H)
a bacterias enteras se midió en alcuotas de 100 μ l de cultivos de
E.coli. Esta incorporación incluye no solamente el material ligado a
compuestos macromoleculares precipitables por ácido tricloroacético si
no además el conjunto de metabolitos del "pool" soluble.

Donde no se indique que se trata de material insoluble
en ácido tricloroacético deberá suponerse que se mide la incorporación
total.

La diferencia experimental con el procedimiento detalla
do en D1 consistió fundamentalmente en que aquí el filtrado por papel
de nitrocelulosa se realizó luego de diluir la mezcla de reacción con-
teniendo la suspensión de bacterias con 4 ml de medio de cultivo enfriado

do entre 0° y 4° C, lavando el tubo dos veces más con igual cantidad del mismo medio de cultivo frío, lo que permite remover la radioactividad no incorporada. Este procedimiento se hizo en frío y con la mayor celeridad posible a fin de no permitir mayormente el flujo de material marcado hacia el exterior de la célula. Además el tiempo de filtrado fue constante para todos los tubos de ensayo incubados.

Los filtros de nitrocelulosa conteniendo adheridos en este caso las bacterias enteras con todo el material radioactivo incorporado en su interior, se secaron bajo lámpara infrarroja.

D3 - MEDIDA DE LA RADIOACTIVIDAD INCORPORADA

Los filtros de nitrocelulosa secos se colocaron en viales plásticos y se agregó líquido de centelleo constituido por tolueno y 4 g/l de Omni-fluor. Se contó en un contador de centelleo líquido Packard Tri-carb modelo L con una eficiencia del 30 al 50%.

RESULTADOS

EFFECTO DEL AMP CICLICO EN EL CRECIMIENTO DE ESCHERICHIA COLI

El poder inhibitorio del AMP cíclico sobre el crecimiento de varias cepas de Escherichia coli ha sido objeto de estudio en nuestro laboratorio.

Frecuentemente se utilizó la cepa Hfr 3000, que cultivada en medio mínimo con glucosa daba un tiempo de generación de alrededor de 60 a 63 minutos. El cultivo paralelo en que se había agregado AMP cíclico en concentración 5 mM final se duplicaba en alrededor de 90 minutos (ver figura 1).

Resultaba interesante determinar los mecanismos que se afectaban a nivel molecular, tratando de desglosar el efecto general observado a nivel de crecimiento.

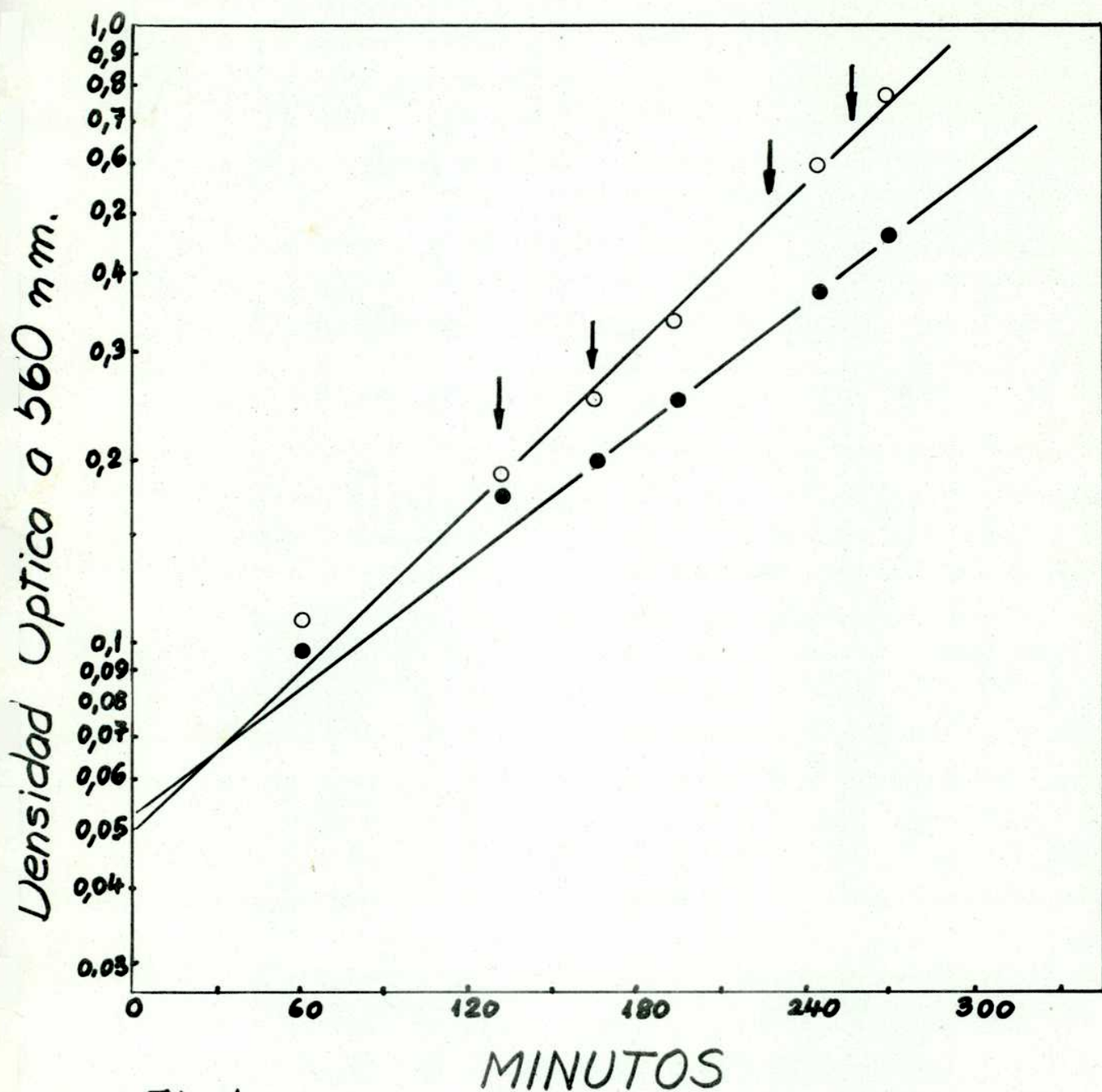


Fig. 1

Efecto del AMP cíclico en el crecimiento de *E. coli* ○ sin AMP cíclico ● con AMP cíclico 5 mM. Las flechas indican los tiempos a los que se tomaron alícuotas de los cultivos para determinar velocidad de síntesis de RNA y proteínas.

ESTUDIO DE LA VELOCIDAD DE SÍNTESIS DE RNA Y PROTEÍNAS

A fin de estudiar la velocidad de síntesis de RNA y proteínas comparativamente en los cultivos realizados con y sin el agregado de AMP cíclico, se tomaron alícuotas de los mismos a los tiempos indicados por las flechas (figura 1).

Es factible que al tratarse de bacterias que aparentemente poseían un aspecto normal al microscopio óptico, las cultivadas en presencia de AMP cíclico tuvieran un contenido de RNA total por bacteria semejante a las no tratadas. Sin embargo, era necesario medir la velocidad de síntesis de RNA, haciendo incorporación de precursores marcados a tiempos cortos.

En la figura 2 es dable observar que la velocidad de incorporación de uracilo (³H) a material insoluble en TCA está disminuída en las alícuotas del cultivo crecido en presencia de AMP cíclico. Debe notarse que en el experimento correspondiente a los 75 minutos de cultivo, la diferencia es muy pequeña, lo que a su vez coincide con un efecto casi nulo en el crecimiento hasta ese instante.

Este resultado hace suponer la necesidad de la permanencia de cierto tiempo de contacto de la bacteria con el nucleótido cíclico para manifestarse la acción del mismo.

Resultaba lógico pensar, que si la velocidad de síntesis de RNA, medida por la incorporación de uracilo a material insoluble en

Incorporación de Uracilo (^3H) insoluble en TCA (n moles/ml \times 100)

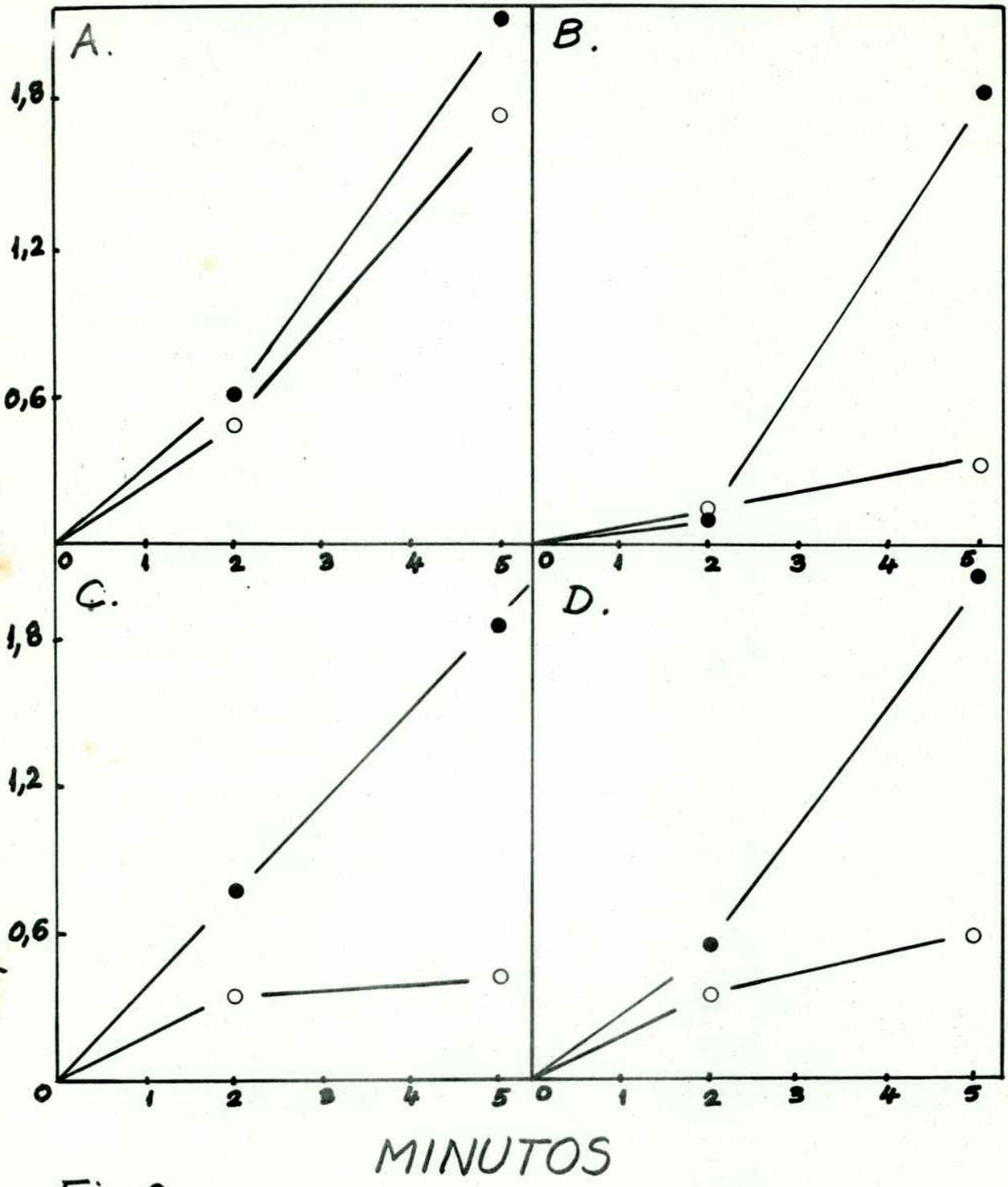


Fig. 2

FIG. 2: Estudio de la velocidad de síntesis de RNA.

Ensayos de incorporación de uracilo (³H) a material insoluble en TCA en alícuotas de cultivos de *Escherichia coli* Hfr 3000 (ver figura 1). A: 75 min.; B: 105 min; C: 165 min. y D: 195 min.. El ensayo contiene 100 μ l de bacterias con uracilo (³H): 7 μ M; 27500 cpm/nmol en un volumen final de 115 μ l. ● sin agregado de AMP cíclico. ○ con AMP cíclico 5 mM en el cultivo.

FIG. 3: Medición de velocidad de síntesis de proteínas.

Experimentos de incorporación de leucina (¹⁴C) a material insoluble en TCA. Se tomaron alícuotas de cultivos de *Escherichia coli* (figura 1) a distintos tiempos, indicados en la figura 2. El ensayo se realizó con 100 μ l de bacterias, leucina (¹⁴C): 40 μ M; 248000 cpm/nmol en un volumen final de 115 μ l. ○ sin agregados de AMP cíclico. ● con AMP cíclico 5 mM en el cultivo.

Incorporación de Leucina (C^{14}) insolub. en TCA (1 mdes/ml. D₂O)

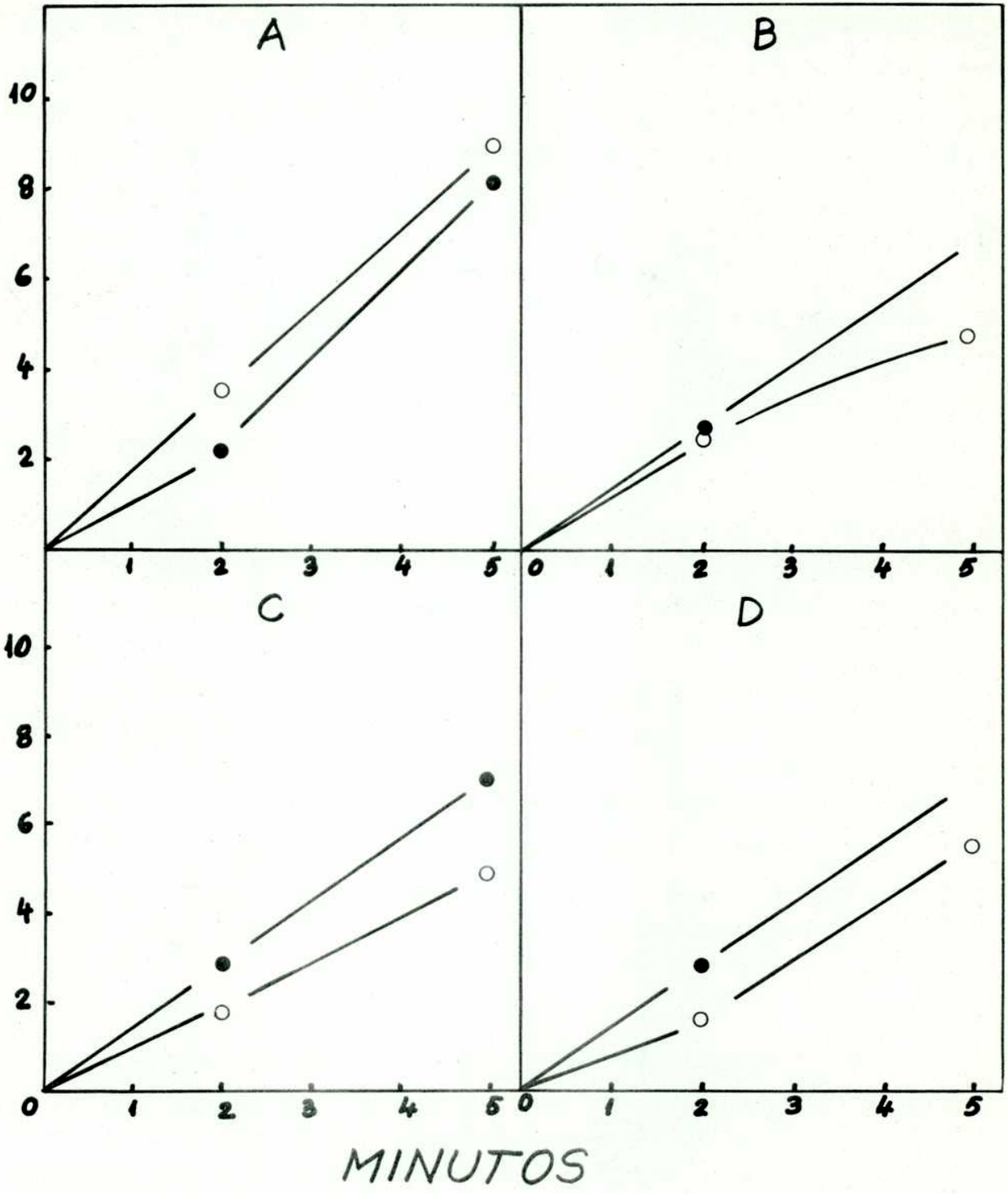


Fig.3

TCA estaba afectada, sería probable que lo estuviera en particular, la correspondiente a la fracción de RNA mensajero cuyo "turnover" es alto. En consecuencia era necesario analizar la velocidad de síntesis proteica en las mismas condiciones en que se había observado la inhibición de la captación de uracilo.

Con la incorporación de leucina (¹⁴C) utilizado en virtud de su vía directa de participación en la biosíntesis de proteínas, se siguieron curvas de tiempo en alícuotas de los cultivos extraídos a los tiempos indicados (figura 3). Aquí ya no se observa efecto alguno del AMP cíclico a este nivel.

En conclusión, el resultado observado a nivel de incorporación de precursores al RNA no reflejaría probablemente una síntesis de RNA afectada, lo que habría influido en la síntesis proteica, sino tal vez un efecto primario a nivel de captación del uracilo.

En este caso la síntesis real de RNA no puede medirse, sino la que proviene del uracilo marcado incorporado y el efecto observado en el segundo paso: síntesis de RNA, sería sólo consecuencia del producido a nivel de la permeabilidad para el uracilo.

EXPERIMENTOS COMPARATIVOS DE INCORPORACION DE URACILO RADIOACTIVO POR MEDICIONES DE TRANSPORTE

Con el fin de determinar si lo que se encuentra alterado por el AMP cíclico es el transporte de uracilo a nivel de membrana o la incorporación del precursor al RNA, se procedió a calcular la captación de uracilo en la fracción de metabolitos solubles en TCA. Haciendo mediciones de transporte de uracilo a través de la membrana de la bacteria viviente según se indica en la sección D2 de materiales y métodos, fue posible obtener las curvas de tiempo correspondientes a la fracción soluble por diferencia entre las cpm totales incorporadas y las correspondientes a material insoluble en TCA en cada momento (figura 4).

Puede apreciarse que la velocidad de incorporación de uracilo a la fracción soluble está también disminuida por acción del AMP cíclico agregado al cultivo.

En presencia del antibiótico rifampicina (29), (30), la iniciación de cadenas de RNA está bloqueada pues se inhibe la unión de la RNA polimerasa a los sitios promotores del DNA. Si el efecto del AMP cíclico fuera a nivel del transporte de uracilo y no sobre la incorporación del precursor al RNA sería dable de esperar que en bacterias tratadas con el antibiótico las diferencias continuaran apreciándose.

A tal efecto se preincubaron a 37°C alícuotas de los cultivos en presencia del antibiótico citado, a fin de permitir que conclu

yan las moléculas de RNA iniciadas. Luego se midió en dichas alícuotas la incorporación total de uracilo (³H) y la insoluble en TCA (figura 5). El efecto a nivel de permeabilidad es bien neto en condiciones en que la síntesis de RNA es prácticamente nula.

Sobre la base del último experimento se puede intuir que la disminución de la incorporación del precursor al RNA en presencia de AMP cíclico (figura 4) es simplemente la consecuencia de la menor incorporación de uracilo en la fracción soluble. Esto sería cierto siempre que la velocidad de marcación del RNA fuera siempre proporcional a la marcación de la fracción soluble, independientemente de la presencia o no de AMP cíclico en el cultivo.

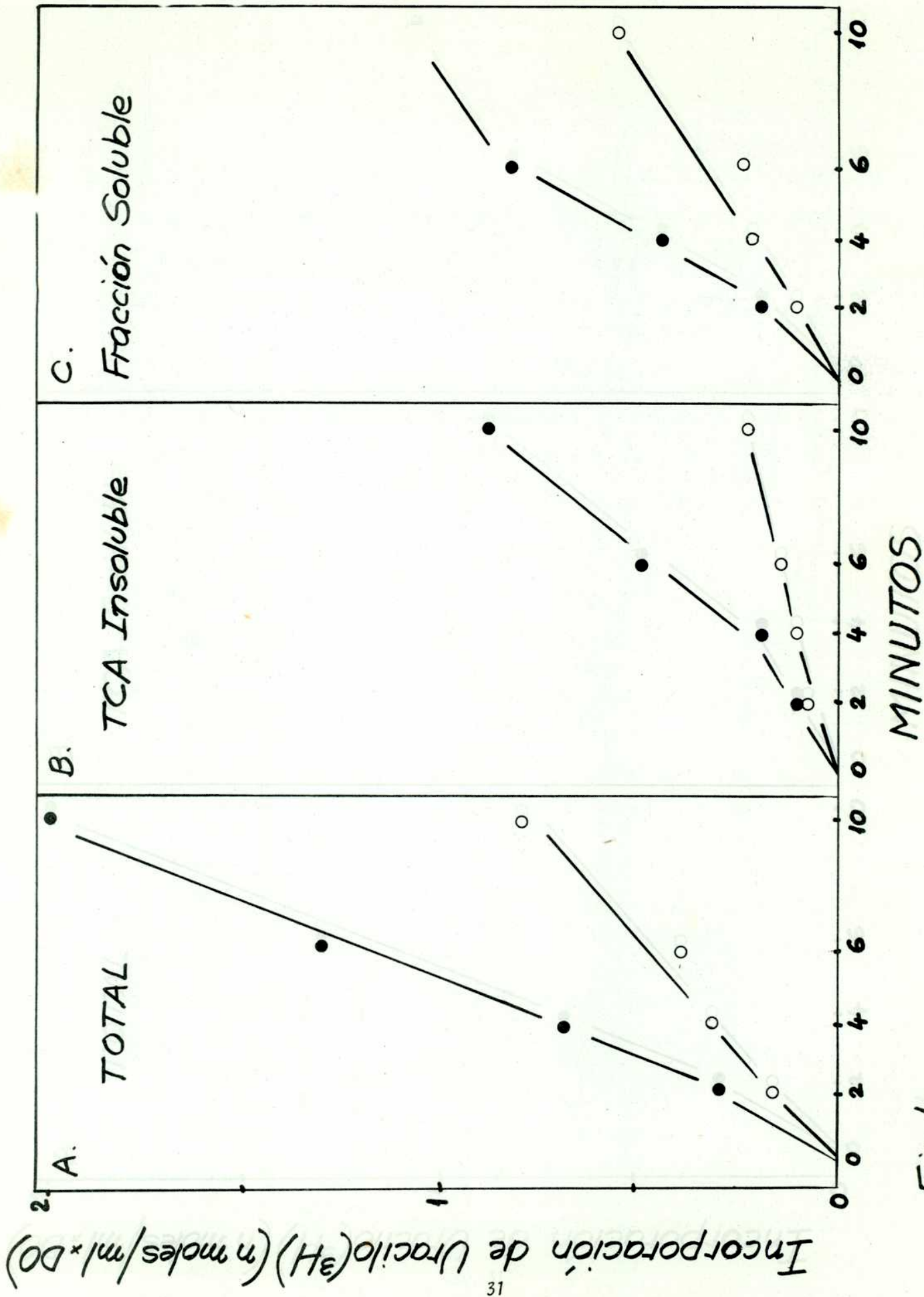
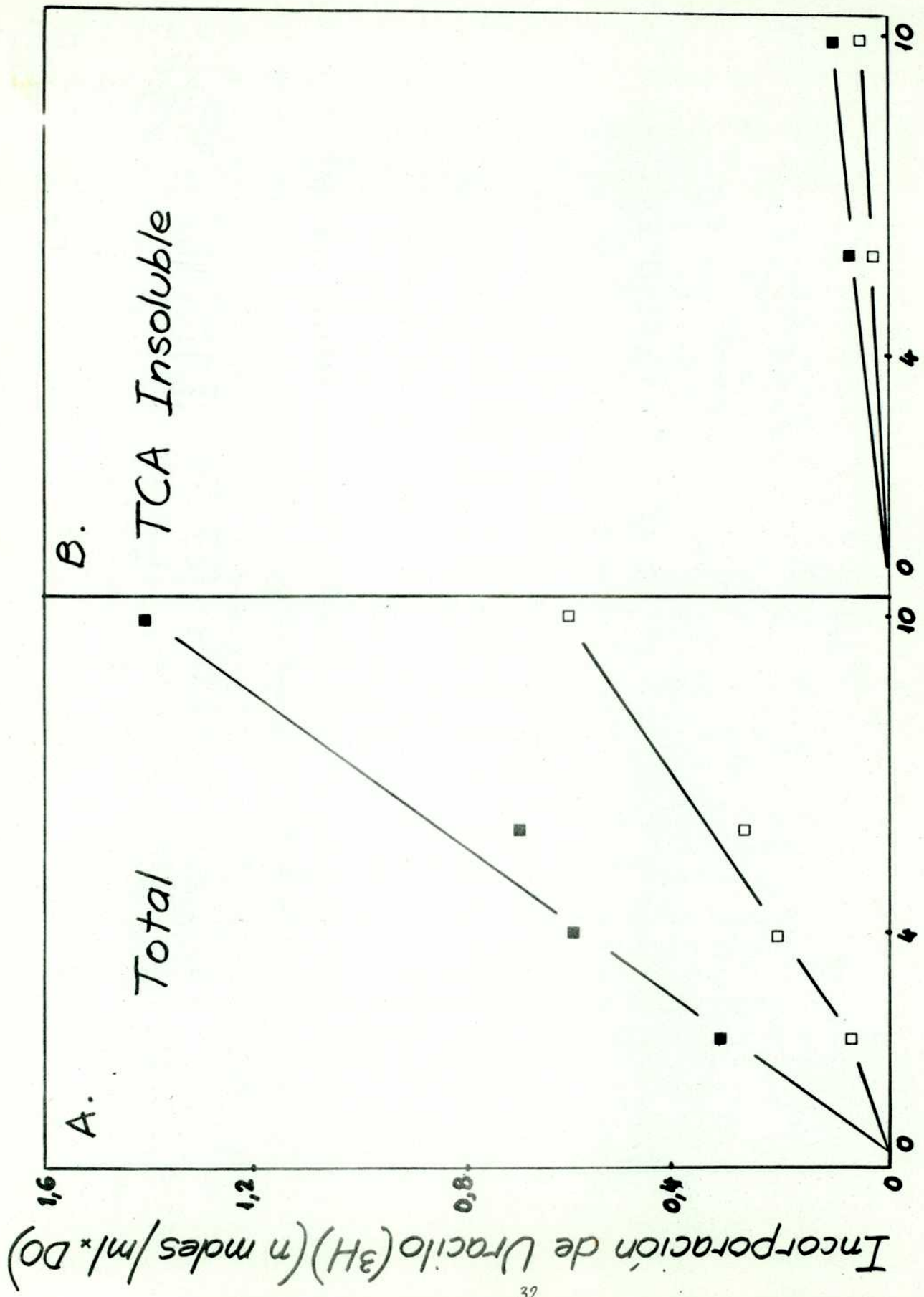


Fig. 4



MINUTOS

Fig. 5

FIG. 4: Experimentos comparativos de incorporación de uracilo radioactivo por mediciones de transporte.

Se toman alícuotas de cultivos de E.coli Hfr 3000 en glucosa 50 ml. El ensayo contiene 100 μ l de bacterias, se incuban con uracilo (³H): 9 μ l 44000 cpm/nmol en un volumen final de 115 μ l. A. Se sigue la técnica detallada en las secciones D2 - D3 de Materiales y Métodos. B. Se realizan según D1 en lugar de D2 de Materiales y Métodos. C. se obtiene por diferencia entre los valores de las ordenadas correspondientes a A. y B. respectivamente.

● sin AMP cíclico. ○ con AMP cíclico 5 mM.

FIG. 5: Experimentos de incorporación de uracilo (³H) en presencia de rifampicina. ■ sin AMP cíclico. □ con AMP cíclico 5 mM.

A. Idem a la figura 4.A. con el agregado de rifampicina 10⁻³ M final. B. Idem a la figura 4.B. con el agregado de rifampicina 10⁻³ M final. En ambos casos el antibiótico se incluye antes del ensayo en lo que se denomina una pre-incubación de 10 min. (ver texto).

FIG. 6: Nivel en que actúa el AMP cíclico

Con datos de los experimentos detallados en figura 4 y figura 5 se construye este gráfico según se indica en el texto. Sin AMP cíclico:

○ incorporación total, Δ fracción soluble, □ incorporación total con rifampicina, ∇ fracción soluble con rifampicina. Con AMP cíclico:

● incorporación total, \blacktriangle fracción soluble, ■ incorporación total con rifampicina, \blacktriangledown fracción soluble con rifampicina.

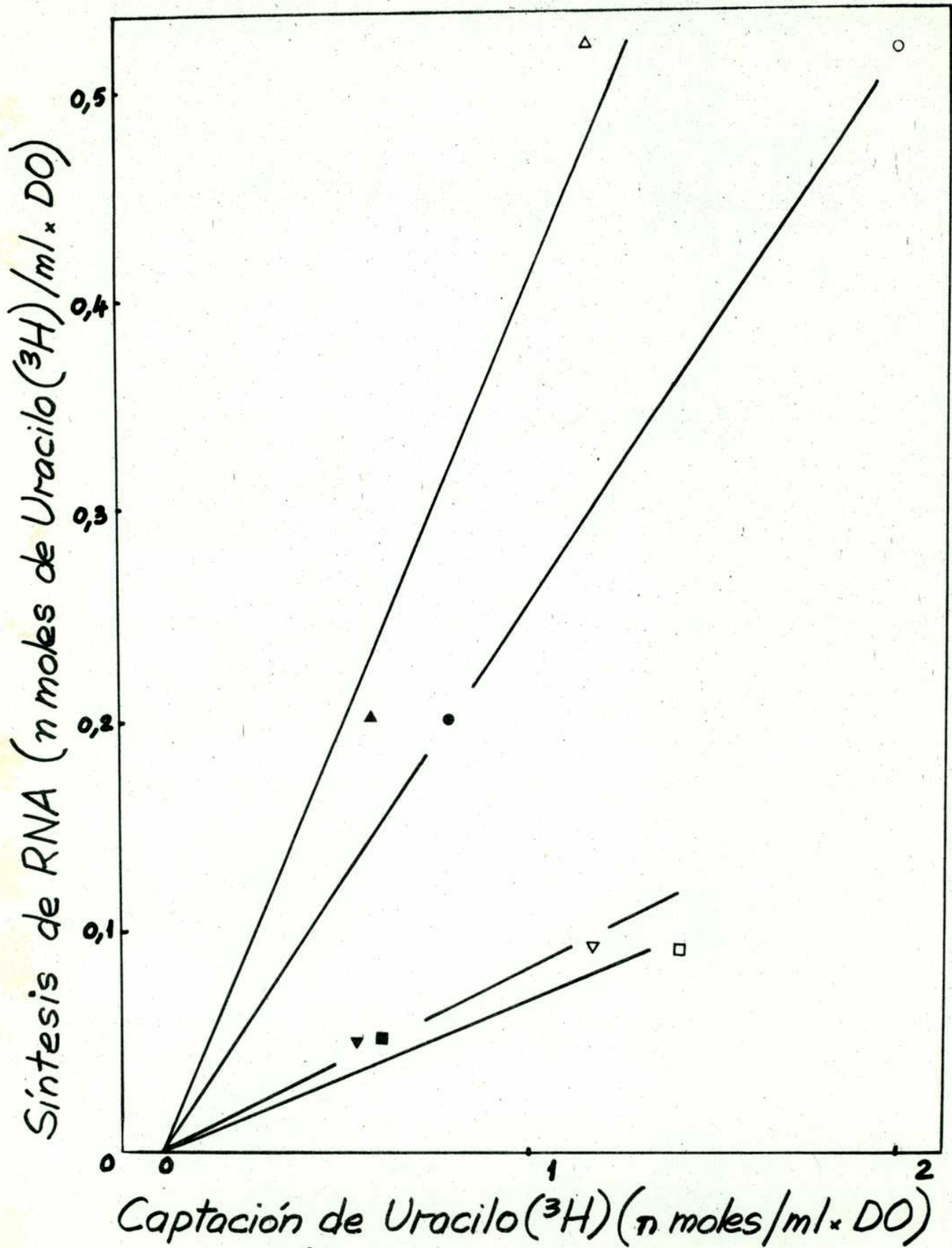


Fig. 6 (Total o soluble)

NIVEL EN QUE ACTUA EL AMP CICLICO

Existe una forma concluyente de demostrar que el mecanismo afectado por el AMP cíclico es en este caso el de la permeabilidad celular y no el de la síntesis de RNA.

En la figura 6 se graficó la velocidad de síntesis de RNA en función de la captación total de uracilo radioactivo o en función de la correspondiente al "pool" soluble utilizando los datos de las figuras 4 y 5. De este gráfico se desprende que los puntos correspondientes a los cultivos realizados en ausencia o en presencia de AMP cíclico no sólo muestran una dependencia lineal de la síntesis de RNA con la incorporación del precursor marcado, sino que dicha dependencia es la misma en presencia o en ausencia del nucleótido cíclico: los valores son puntos de la misma recta en ambos casos.

Por el contrario, si existiera un efecto de AMP cíclico a nivel de síntesis de RNA total se obtendrían valores de la velocidad de dicha síntesis que entrarían en una recta de pendiente menor en el caso de los cultivos con AMP cíclico.

En presencia de rifampicina en el ensayo, las rectas son casi coincidentes dado que la síntesis de RNA residual es muy pequeña.

Las conclusiones obtenidas al comparar resultados de cultivos con o sin el agregado de AMP cíclico en presencia de rifampicina, son equivalentes a las explicadas anteriormente.

ESTUDIO DE LAS DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

Como se comentó previamente el efecto del AMP cíclico sobre el crecimiento bacteriano está condicionado por el tipo de fuente de carbono utilizada en el cultivo (15). Por otra parte, el crecimiento de los cultivos de *Escherichia coli* en las diferentes fuentes de carbono está caracterizado por un nivel intracelular de AMP cíclico distinto en cada caso.

Los hidratos de carbono que como la glucosa producen represión catabólica de la síntesis de enzimas inducibles proveen comparativamente valores menores de la concentración de AMP cíclico. En glicerol se tiene una concentración del nucleótido cíclico de 5 μ moles/g peso húmedo; en glucosa 0,5 μ moles/g peso húmedo y en piruvato alrededor de 1,3 μ moles/g peso húmedo (8).

En concordancia con esto, solamente en condiciones de cultivo que determinan un nivel intracelular bajo de AMP cíclico es posible observar una disminución del crecimiento por el nucleótido agregado en el cultivo. Tal es el caso que opera cuando se utiliza glucosa o piruvato como fuente de carbono.

Sobre esta base los experimentos de incorporación de uracilo radioactivo con alícuotas de cultivos de *E. coli* Hfr 3000 crecidos en medio mínimo salino con glucosa, se desarrollaron comparativamente con las de otros obtenidos de diversas fuentes de carbono a saber, gli

Incorporación de Uracilo (^3H) (n moles/ml \times DO)

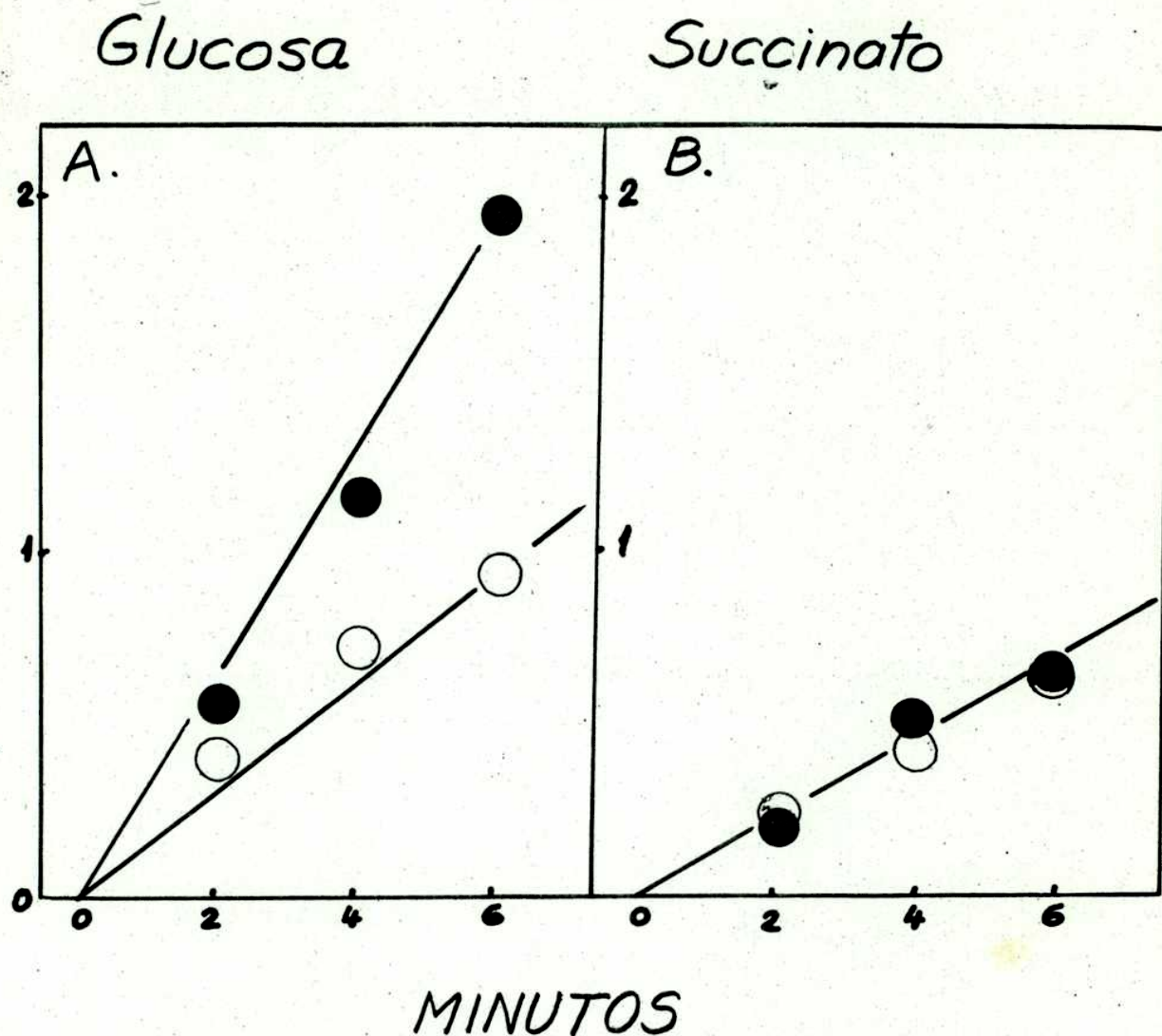


Fig. 7. A y B.

Estudio de las diferentes fuentes de carbono.

Experimentos de transporte de uracilo (^3H) en bacterias cultivadas en: A. en glucosa 25 ml, B. succinato 25 ml. Ensayo: 100 μl de bacterias + uracilo (^3H) 7 μl 27500 cpm/nmol en un volumen final de 115 μl . ● sin adiciones. ○ con AMP cíclico 5 ml.

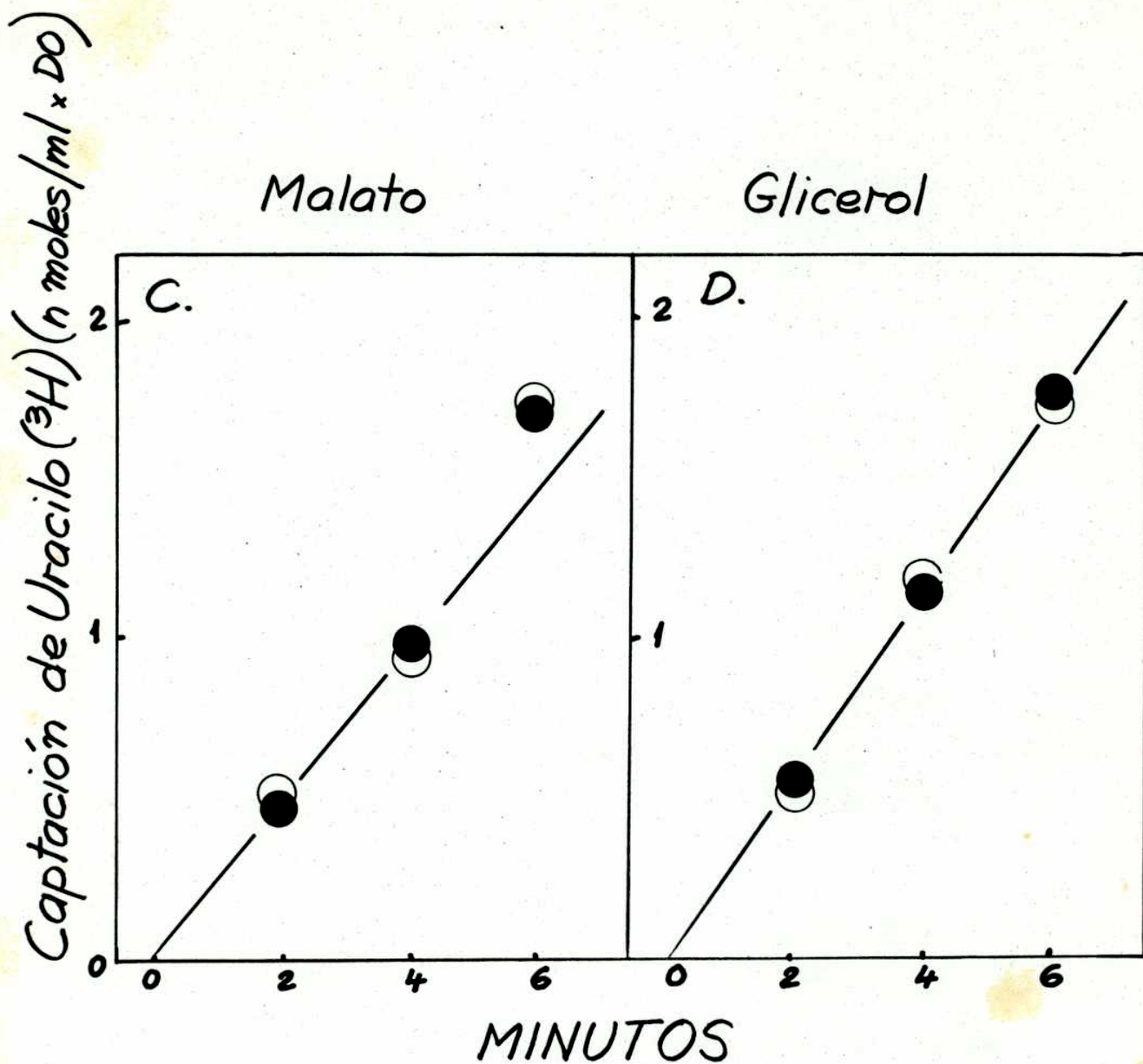


Fig. 7. C y D.

Estudio de las diferentes fuentes de carbono.
 Experimentos de transporte de uracilo (³H) en bacterias cultivadas: D. en glicerol 0,5% y C. en malato 25 mM. Ensayo idem al descrito en fig. 7A.-7B.
 ● sin adiciones. ○ con AMP cíclico 5 mM.

cerol, succinato, malato. En estos tres últimos casos no se observa efecto de AMP cíclico a nivel de incorporación de uracilo como tampoco se evidencia aumento alguno del tiempo de duplicación (figura 7), (15).

CONTROL DE POSIBLE INTERFERENCIA

Un control necesario de destacar en este punto es el que se hizo en reiterados experimentos agregando AMP cíclico en concentración 5 mM final en los ensayos de incorporación de uracilo, en lugar de cultivar las bacterias en su presencia.

Se tomaron alícuotas de cultivos de E. coli Hfr 3000 en medio mínimo con glucosa que no contenían otro agregado y se procedió a incluir el nucleótido cíclico en el momento de hacer lo propio con el uracilo (H³).

En la figura 8, se observa que la velocidad de incorporación de la base pirimidínica es idéntica en este último caso, a la correspondiente al cultivo crecido y ensayado sin AMP cíclico.

Se elimina en esta forma la posibilidad de una interferencia competitiva o de otra índole por parte del AMP cíclico sobre la captación del uracilo a través de la membrana bacteriana.

Para obtener un efecto final a nivel de permeabilidad celular es necesario que el nucleótido cíclico se agregue al medio de cultivo y que la bacteria esté en contacto con el mismo durante cierto tiempo (1 a 2 generaciones), como si fuera necesaria la síntesis de alguna proteína o factor regulatorio.

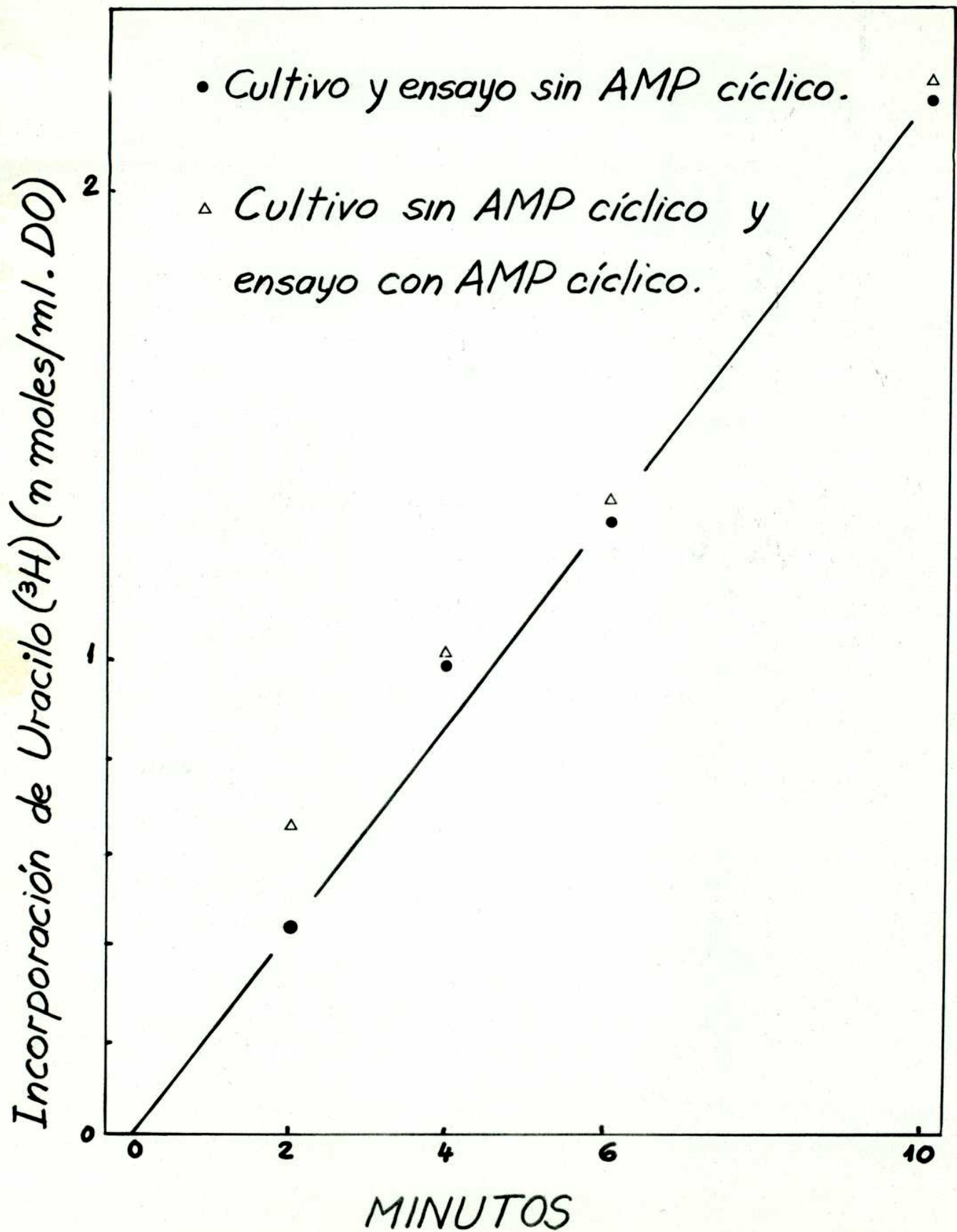


Fig. 8

FIG. 8: Control de posible interferencia.

Incorporación de uracilo (^3H) en alícuotas de *Escherichia coli* cultivadas sin AMP cíclico: ● sin y Δ con el agregado de AMP cíclico 5 mM de concentración final en el ensayo. Bacterias: 100 μl, uracilo (^3H) 7 μM 27500 cpm/nmol en un volumen final de 115 μl.

CURVA DE CONCENTRACION DE AMP CICLICO

La concentración intracelular de AMP cíclico para bacterias crecidas en medio salino con glucosa es del orden de 10^{-7} M y alcanza un máximo de 10^{-4} M en ausencia del azúcar (14) (31).

Es dable observar sin embargo, que los niveles requeridos del nucleótido cíclico para obtener efectos desde fuera de la bacteria son más elevados. Para revertir la represión catabólica en *E. coli* Hjr 3000 se debe agregar AMP cíclico a una concentración del orden de 5 mM (8). Esto es debido a la baja permeabilidad bacteriana para el nucleótido y a la presencia de fosfodiesterasa específica que lo degrada.

En la figura 9A se representan las curvas de tiempo para la incorporación total de uracilo (11) en cultivos crecidos en presencia de distintas cantidades de AMP cíclico variables entre 0 y 10 mM. La pendiente de la recta define en cada caso la velocidad de captación de uracilo, que es menor a medida que aumenta el nivel de AMP cíclico.

Estos valores volcados en un gráfico en cuyas abscisas se representa la concentración del nucleótido dan origen a una hipérbola que se hace asintótica (figura 9B). La mitad de la disminución de la velocidad de captación de uracilo se obtiene con un valor de alrededor de 1,5 mM de AMP cíclico. Con 5 mM el AMP cíclico presenta ya su efecto máximo a nivel de permeabilidad de la célula.

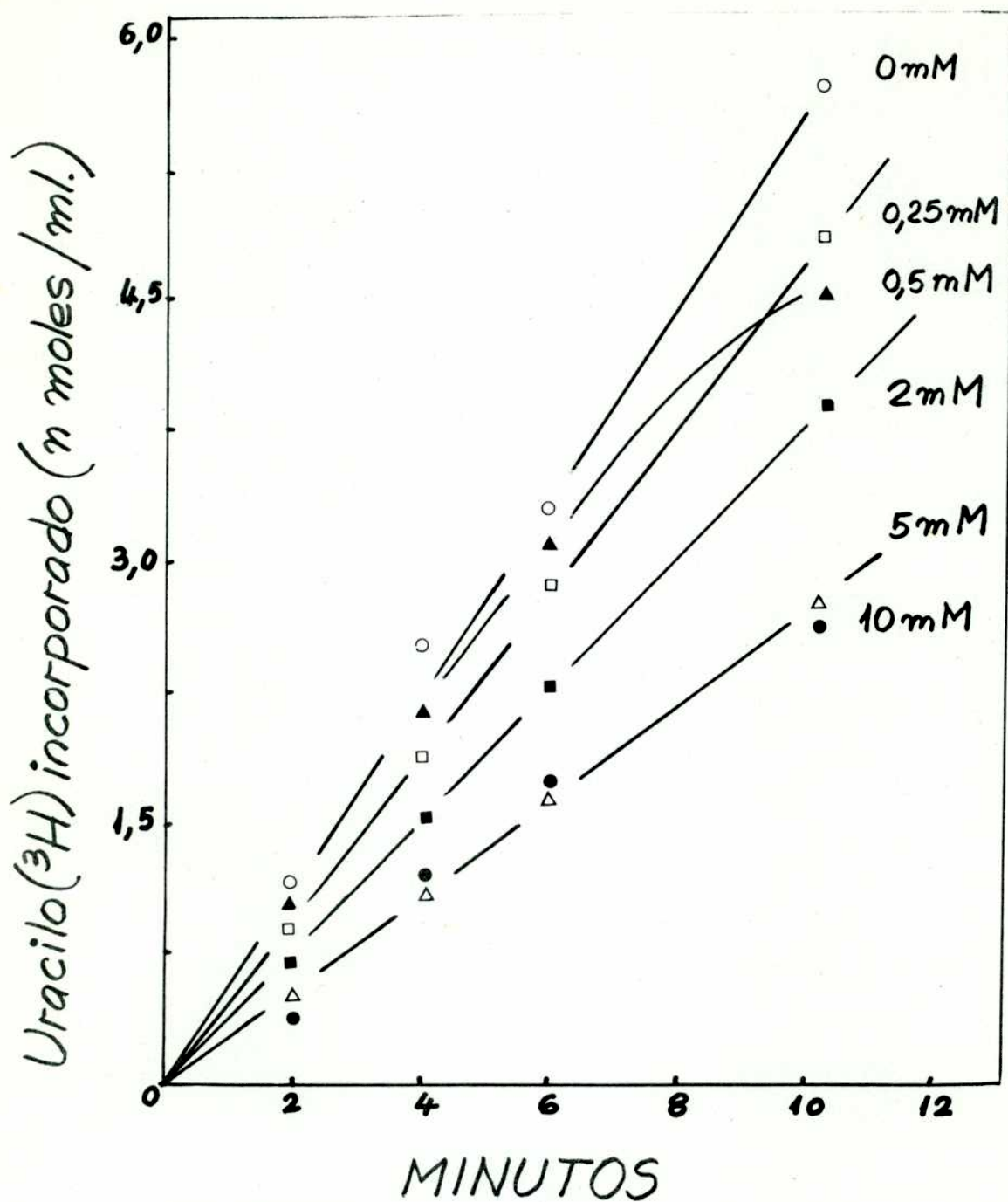


Fig. 9.A

Curva de concentración de AMP cíclico.
 Gráfico de incorporación total de uracilo (^3H) en función del tiempo para cultivos de Hfr 3000 en glucosa con cantidades variables de AMP cíclico entre 0 y 10 mM. Ensayo: 100 μl de bacterias llevadas a igual densidad óptica + uracilo (^3H) 7 μM 27500 cpm/mol en un volumen final de 115 μl .

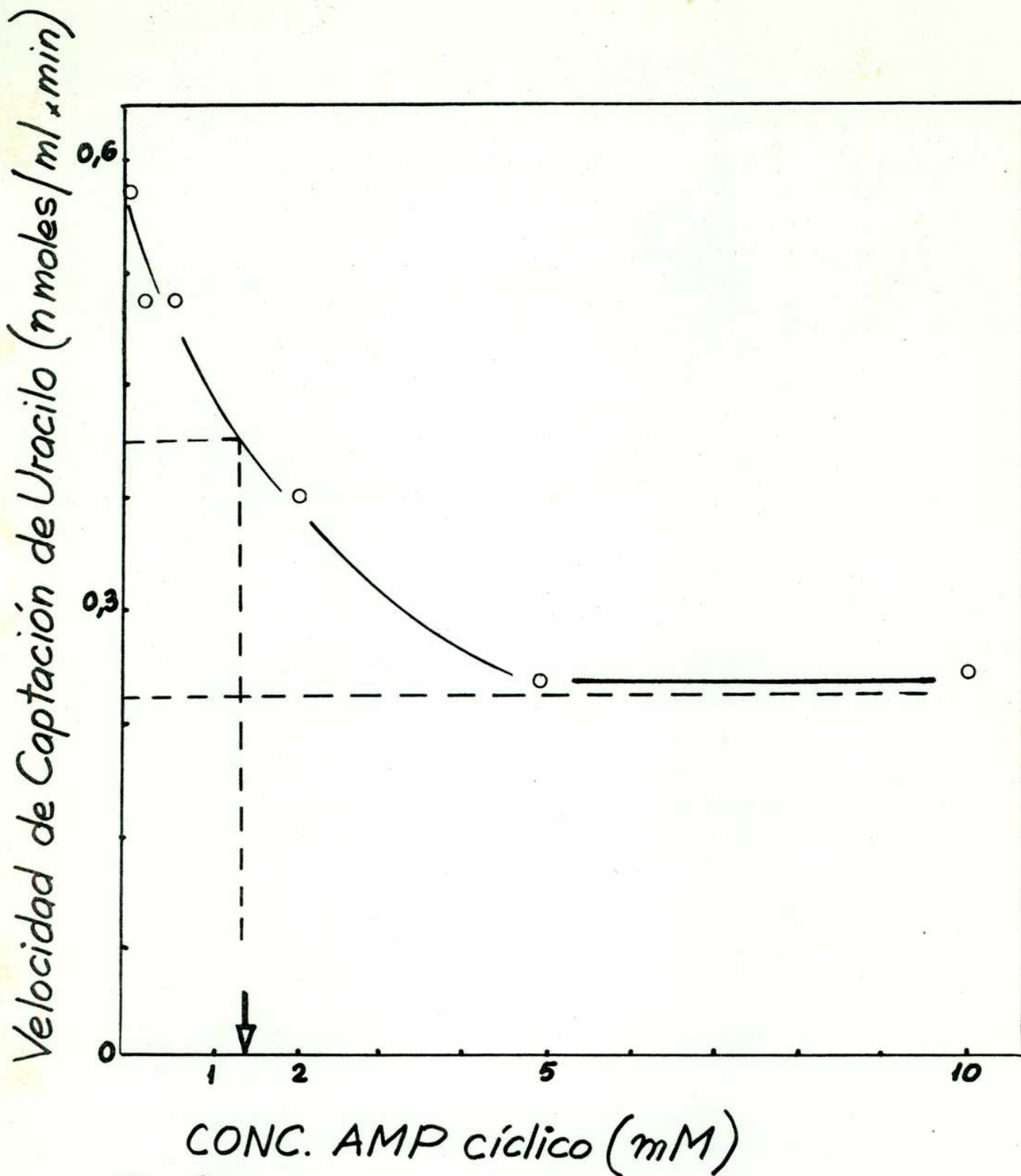


Fig. 9.B.

Curva de concentración de AMP cíclico.
 Gráfico de velocidad inicial de captación de uracilo (^3H) en función de la concentración de AMP cíclico. Las velocidades iniciales se obtienen de la figura 9.A. (ver texto).

CONTROL DE INCORPORACION DE URACILO EN CULTIVOS DE ESCHERICHIA COLI CRECIDOS A MENOR TEMPERATURA

Una de las cuestiones más importantes a resolver es si la inhibición del transporte de uracilo por el AMP cíclico es la consecuencia del menor crecimiento de las bacterias en presencia de este último; o por el contrario, si uno de los factores que determinan la velocidad de crecimiento es la magnitud del transporte de precursores, en este caso específico del uracilo.

Una forma de dilucidar esta alternativa de causa-efecto sería alterar de algún modo el crecimiento de los cultivos por la variación de algún factor distinto del AMP cíclico y observar que ocurre a nivel del transporte. Por ejemplo si luego de disminuir la velocidad de crecimiento se observa que el transporte no disminuye, podría pensarse que este último parámetro no es necesariamente una función del primero.

Como se observa en la figura 10 el transporte de uracilo es independiente de la velocidad de crecimiento de la bacteria. Si bien a 35° y 33 ° C se obtienen tiempos de duplicación que se acercan a los correspondientes a cultivos crecidos a 37°C en presencia de AMP cíclico, la incorporación de uracilo ($\frac{3}{H}$) no varía en los cultivos hechos a diferentes temperaturas.

En la tabla 1 se detallan los tiempos de generación obtenidos.

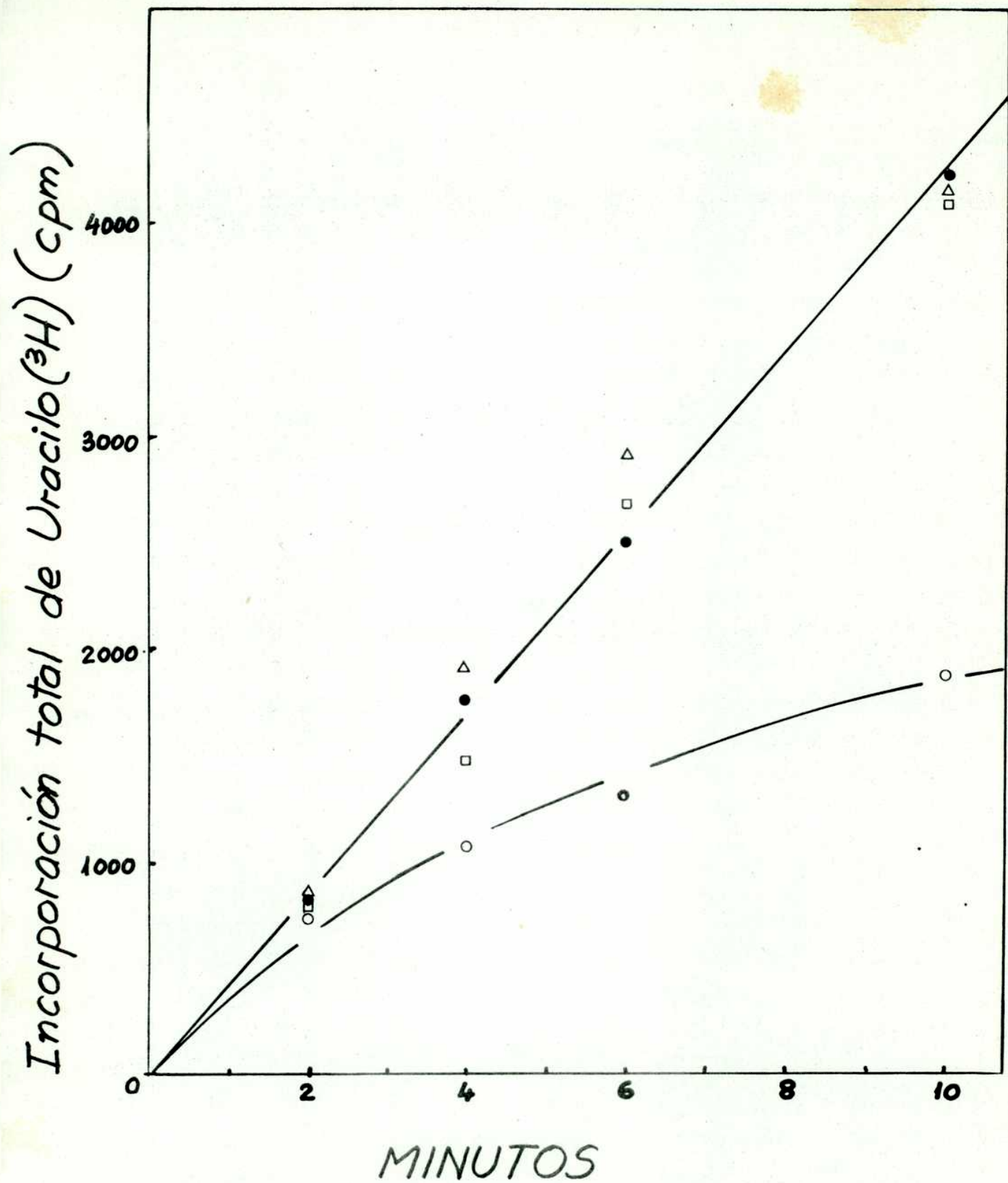


Fig.10

nidos a diferentes temperaturas y el correspondiente al cultivo en presencia de AMP cíclico a 37°C.

TABLA 1

TEMPERATURA	AMP CICLICO	TIEMPO DE DUPLIC (MIN)
37°C		64
37°C		90
35°C		75
33°C		82

Se puede deducir por lo tanto, que el efecto del AMP cíclico a nivel de permeabilidad no es mera consecuencia de un ritmo menor de crecimiento en este caso, sino que es independiente del mismo.

FIG. 10: Experimentos de incorporación de uracilo (³H) en *E. coli* Hfr 1100 cultivada en medio mínimo con glucosa 20 mM a distintas temperaturas. ● 37°C □ 35°C Δ 33°C sin agregado de AMP cíclico, y a 37°C ○ con AMP cíclico 5 mM final. Aliquotas de 100 μl de bacterias llevadas a igual densidad óptica + uracilo (³H) 7 μM 30000 cpm/nmol en un volumen final de 115 μl.

ESPECIFICIDAD DEL EFECTO DEL AMP CICLICO

El agregado de ATP, ADP o AMP a cultivos de *Escherichia coli* Hfr 1100 no altera el ritmo de crecimiento de los mismos (15).

Asimismo, dichas sustancias que estructuralmente se asemejan al AMP cíclico no presentan actividad depresora de la permeabilidad bacteriana (tabla 2).

TABLA 2

TIEMPO DE ENSAVO (MIN)	SIN	AMP			
	AGREGADO	CICLICO	AMP	ADP	ATP
	nmoles incorporados/D.O a 560 nm				
2	0,13	0,08	0,14	0,11	0,10
4	0,27	0,17	0,29	0,23	0,24
6	0,41	0,25	0,42	0,38	
10	0,69	0,43	0,81		0,71

Tabla 2- Especificidad del efecto del AMP cíclico :Incorporación total de uracilo (³H) en alícuotas de 100 µl de bacterias cultivadas en medio con glucosa y los agregados detallados en cada caso. Uracilo (³H): 7 µM 27500 cpm/nmol en 115 µl de volumen final.

Esto demuestra que la inhibición de la permeabilidad por parte del AMP cíclico no se debe a un fenómeno tóxico sobre la bacteria; ya que los análogos estructurales del mismo en igual concentración no tienen acción alguna. Por ende, se trata de una acción específica del nucleótido cíclico no reemplazable por sustancias de fórmula similar.

Asimismo debe recordarse que la total viabilidad de las bacterias tratadas con AMP cíclico fue controlada por recuento de colonias en agar y se comprobó la inexistencia de un posible efecto tóxico del nucleótido.

MECANISMO DE ACCIÓN DEL AMP CÍCLICO

Como se mencionó anteriormente, en bacterias el CAP es la proteína receptora del AMP Cíclico. El complejo CAP - AMP cíclico tiene la habilidad de unirse al DNA, con una afinidad mucho mayor que CAP libre. Esta unión de CAP - AMP cíclico al DNA se efectúa a nivel del locus promotor de los operones represibles por catabolitos y es un requisito fundamental para que se inicie el proceso de transcripción de los citados operones por parte de la RNA polimerasa (32) (33). Es por ello que todo efecto del AMP cíclico en que el CAP interviene se verifica a nivel de transcripción genética y viceversa.

A fin de investigar el mecanismo de acción del AMP cíclico en el transporte del uracilo, se utilizó una cepa mutante de *E. coli* Hfr 1100 que Perlman y Pastan designaron como PP 47 (ver Materiales y Métodos). Esta mutante es CAP⁻ o sea que no produce proteína receptora del AMP cíclico.

Un estudio comparativo con la cepa parental PP6 (Hfr 1100) demuestra que en la mutante CAP⁻ no tiene lugar la reducción de la permeabilidad frente al uracilo por acción del AMP cíclico (figuras 11A-11B).

Esto indica que el mecanismo de acción del efector AMP cíclico ocurre probablemente también en este caso a través de la proteína receptora CAP, a nivel de transcripción genética (34).

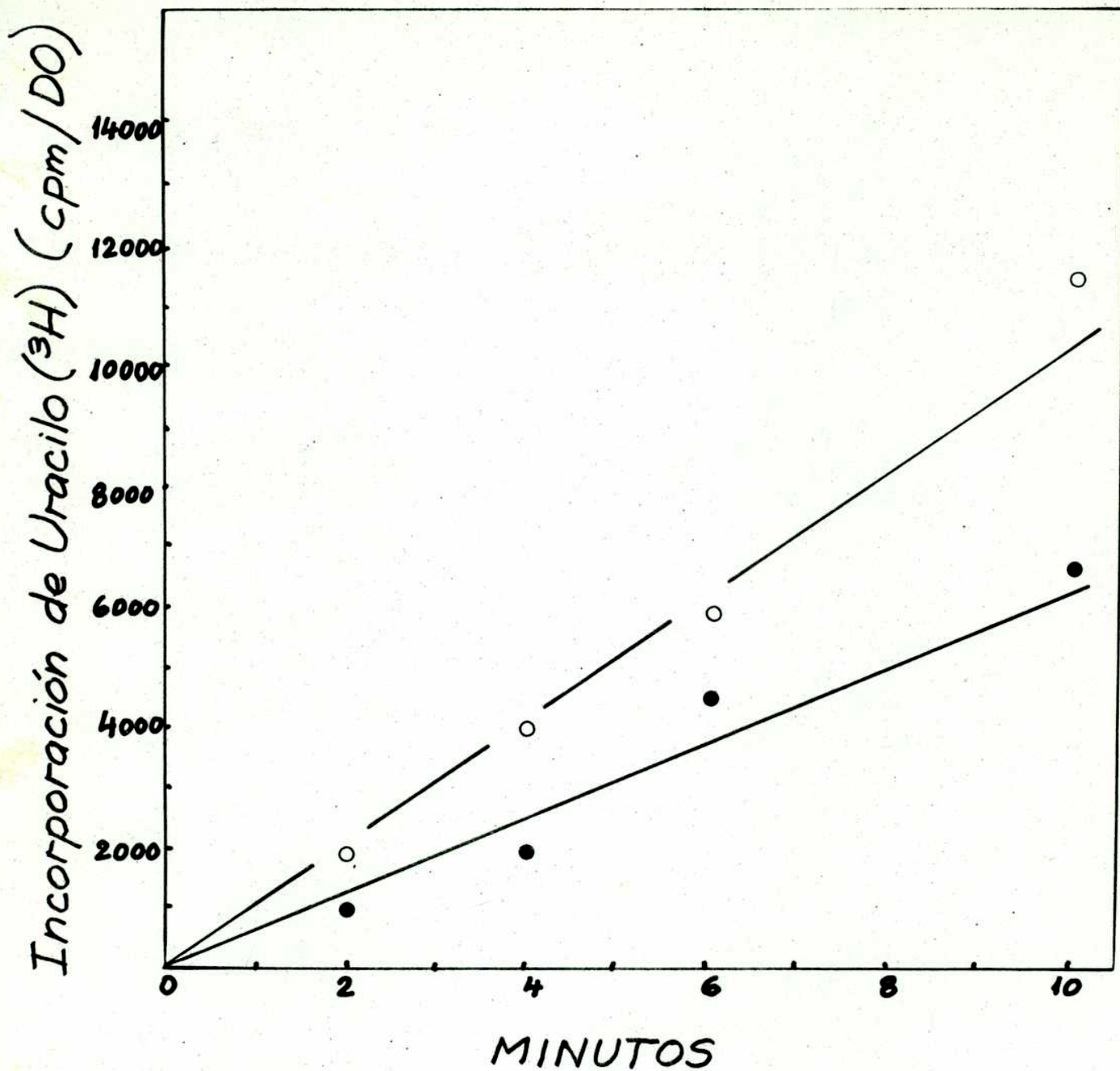


Fig. 11.A

Mecanismo de acción del AMP cíclico.

Transporte de uracilo en *E. coli* Hfr 1100. Aliquotas de 100 μ l de bacterias incubadas con uracilo (3 H) 7 μ M 30000 cpm/mmol en 115 μ l de volumen final

○ Sin AMP cíclico. ● con AMP cíclico 5 mM agregado al cultivo.

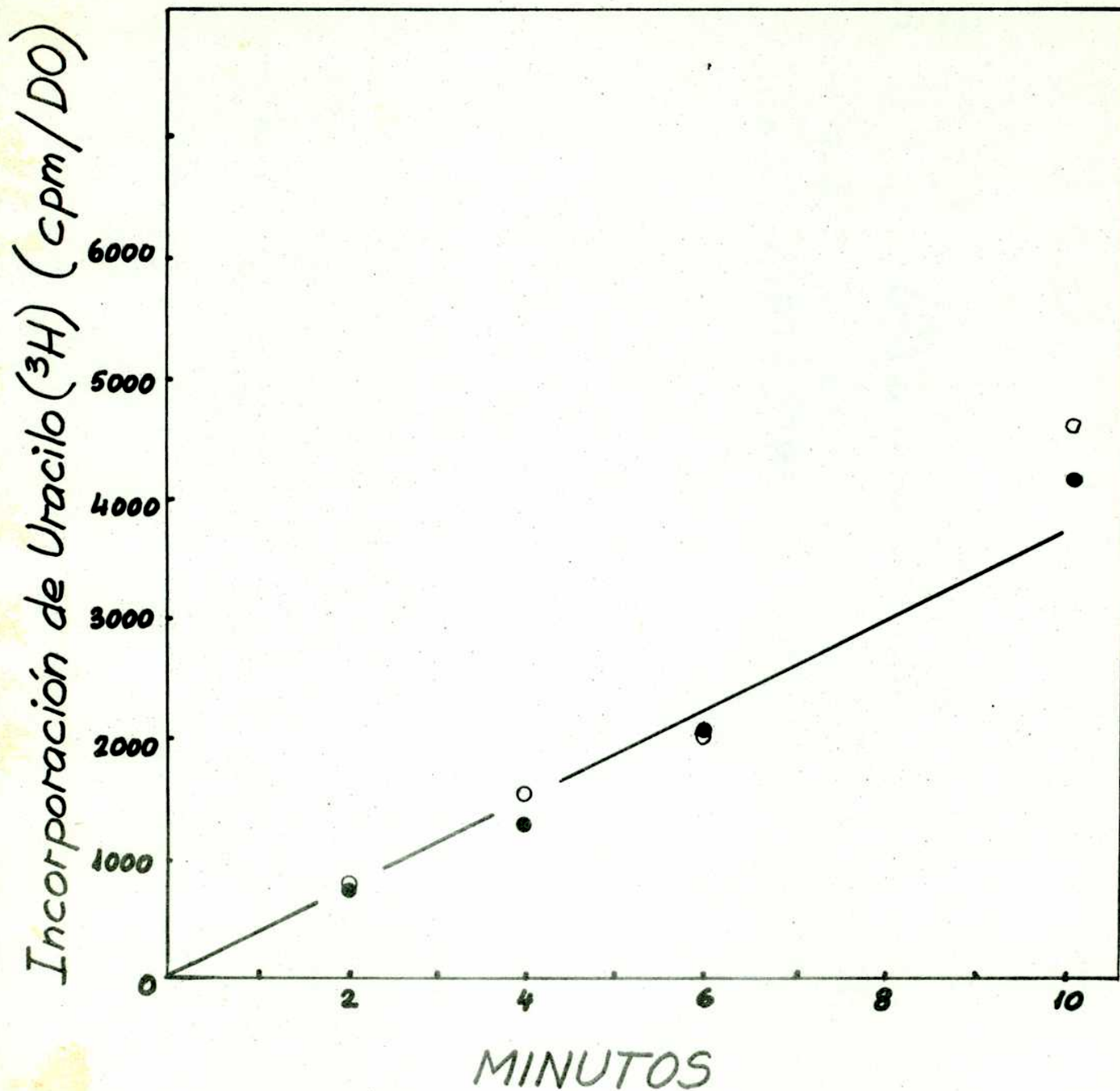


Fig. 11.B.

Mecanismo de acción del AMP cíclico.
 Transporte de uracilo en *E. coli* Hfr 5333 CAP⁻ cultivada en medio mínimo con glucosa y casaminocidos 0,1%. Experimento idéntico al de la figura 11-A.
 ○ sin AMP cíclico. ● con AMP cíclico 5 mM.

A diferencia de lo que ocurre en el caso de las enzimas inducibles cuya síntesis es promovida por el AMP cíclico en presencia de CAP (5), aquí la/s proteína/s encargada/s de facilitar el transporte de uracilo se sintetizaría menos. Este sería el caso de un control negativo.

Podría ocurrir sin embargo que por efecto del complejo CAP - AMP cíclico se estimulara la síntesis de un factor proteico que a su vez controlara la permeabilidad para ciertos precursores; Esto ya implicaría la existencia de un control positivo.

ESTUDIO DE LA CEPA DEFICIENTE EN ADENILATO CICLASA

El nivel endógeno de AMP cíclico en la bacteria está regulado por tres mecanismos diferentes: a) control de su síntesis; b) control de su degradación y c) expulsión de la célula.

Las enzimas que catalizan los procesos a) y b) son la adenilato ciclasa y la fosfodiesterasa respectivamente. Faltando cualquiera de esas enzimas el metabolismo bacteriano se altera y la bacteria muestra un comportamiento muy distinto ante diversos factores respecto de las cepas salvajes parentales.

En la cepa CA 8306 (ver Materiales y Métodos) una mutante ciclasa negativa (cya^-) (28) existe una delección en el gen correspondiente a la adenilato ciclasa de modo que carece de AMP cíclico por ausencia de la enzima que lo sintetiza. El crecimiento de esta bacteria es imposible en fuentes de carbono cuyos operones son inducibles a menos que se suplemente el medio de cultivo con una pequeña cantidad de AMP cíclico (0,1 a 0,5 mM).

Dada la ausencia total de AMP cíclico, se esperaría en esta mutante que la incorporación de precursores fuera comparativamente mayor que en la cepa parental que contiene una cierta cantidad del nucleótido. Eso es lo que efectivamente ocurrió en la captación de uracilo (H) (figura 12).

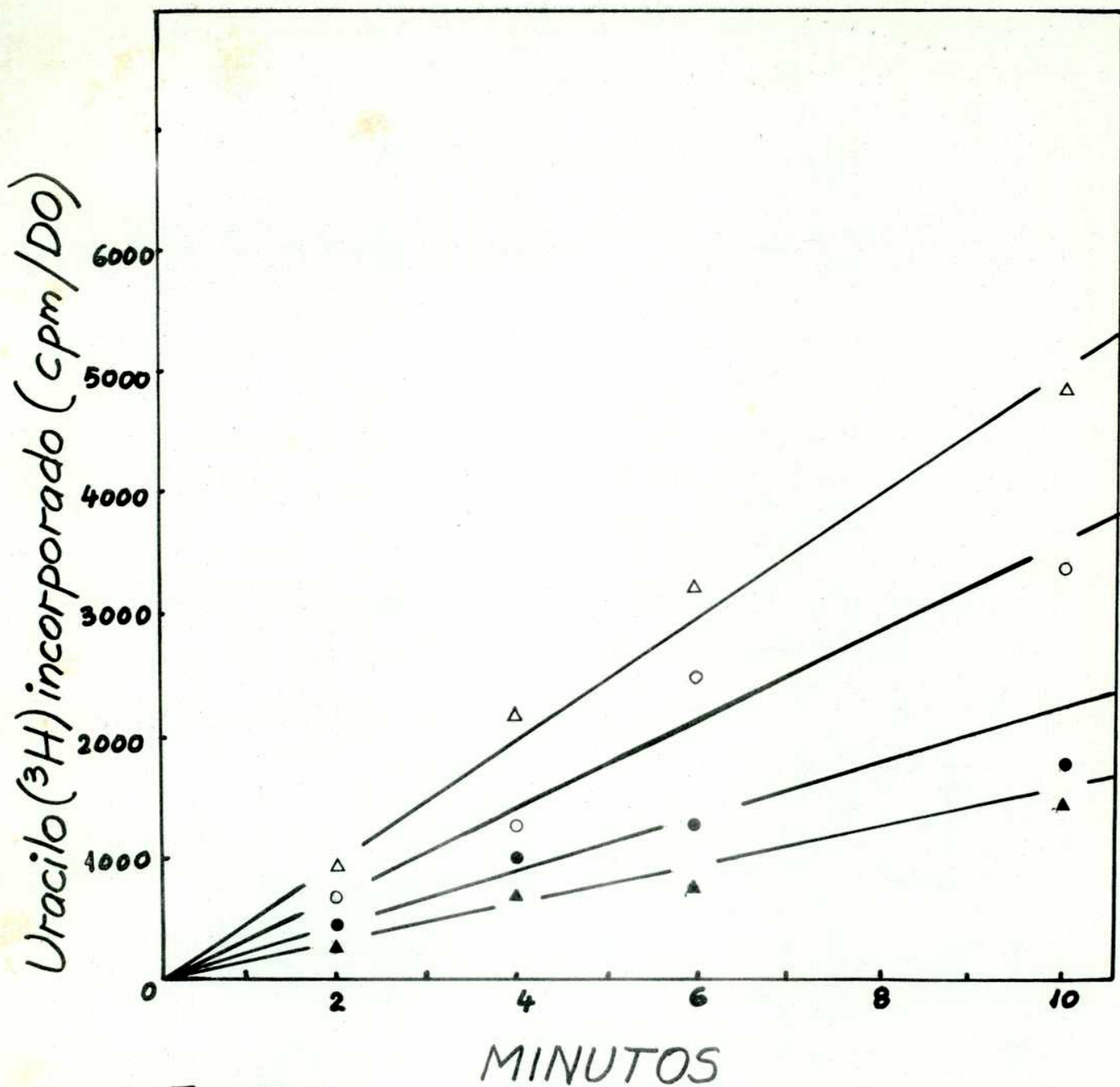


Fig. 12

Estudio de la cepa deficiente en adenilato ciclasa.

Ensayo de transporte de uracilo (^3H) en cepas de *E. coli* CA 8000 y CA 8306 (*cya*⁻) cultivadas en medio mínimo con glucosa y caseína 0,1%.

Alícuotas de 100 μl de bacterias se incubaron con uracilo (^3H) 7 μM 30000 cpm/nmol en un volumen final de 115 μl . Δ CA 8306, \blacktriangle CA 8306 con AMP cíclico 5 mM, \circ CA 8000, \bullet CA 8000 con AMP cíclico 5 mM.

En consecuencia en la cepa CA 8306 (cya⁻) es observable una mayor diferencia entre las curvas de tiempo obtenidas con cultivos en ausencia y en presencia de AMP cíclico con respecto a las correspondientes a la cepa parental CA 8000.

DETERMINACION DE LA INDUCIBILIDAD DEL SISTEMA DE TRANSPORTE

Es característica de ciertos sistemas de transporte la de ser inducible por el metabolito transportado o análogos del mismo. El sustrato actúa como inductor de la expresión genética de las enzimas que catalizan su incorporación.

Por ejemplo el sistema de incorporación de la lactosa en *E. coli* incluye la síntesis de tres enzimas inducibles que están codificadas en el mismo operón; una de ellas es la galactósido permeasa que cataliza la captación del sustrato. Este sistema se induce por la presencia de lactosa u otros β -galactósidos. Por otro lado existen precursores que son transportados por un sistema de transporte constitutivo, que se halla habilitado en forma permanente sin necesidad de ser inducido. Generalmente son sistemas enzimáticos no muy específicos que intervienen en la permeabilidad de varios sustratos.

El caso del uracilo y otras bases pirimidínicas es poco conocido en este aspecto. Con el fin de determinar si esta base es transportada por un sistema inducible, se hicieron cultivos de la cepa salvaje Hfr 1100 de *E. coli* en medio salino mínimo con glucosa con o sin el agregado de AMP cíclico y en dos de ellos se incluyó uracilo 0,1 ml. Luego de lavadas y filtradas las bacterias para remover el uracilo, se resuspendieron en medio mínimo sin agregado del mismo.

Los experimentos de transporte con uracilo (H) mostrados en la tabla 3 revelan que el sistema de transporte de uracilo no es inducible, dado que las velocidades de captación del sustrato son equivalentes independientemente de la presencia del uracilo en el medio de cultivo.

Por otra parte, se realizaron algunos experimentos con la cepa de E. coli 3040 (ura⁻) que no es capaz de sintetizar el uracilo y depende de su aporte exógeno para crecer. Estas bacterias luego de cosechadas y resuspendidas en un medio carente de uracilo, y ayunadas del precursor por 45 minutos, lo incorporan con mayor avidez.

Es dable observar aquí también el efecto depresor de la permeabilidad celular protagonizado por el AMP cíclico agregado al cultivo. Probablemente sería necesario agregar mayor cantidad de AMP cíclico para obtener un efecto comparable con las otras cepas dada la condición de ayuno del precursor en esta cepa.

CEPA DE E. COLI	TIEMPO DE ENSAYO (MINUTOS)	URACILO 0,1mM como inductor	sin adiciones con AMP cíclico 5 mM ³ <u>mmoles incorp.uracilo (H)</u> <u>densidad optica</u>	
	2	NO	0,13	0,08
	4		0,26	0,17
	6		0,41	0,23
	10		0,56	0,41
Hfr 1100	2	SI	0,14	0,08
	4		0,24	0,19
	6		0,33	0,26
	10		0,54	0,40
3040*	2	como requeri miento	0,26	0,20
	4	SI	0,49	0,29
	6		0,64	0,40
	10		0,86	0,60

TABLA 3: Captación total de uracilo (H)³ en alícuotas de cepas Hfr 1100 y 3040. Se cultivó en ausencia o en presencia de uracilo 0,1 mM según se indica. Ver detalles en el texto. Bacterias: 100 µl y uracilo (3H) 7 µl; 30000 cfu/mmol en 115 ul de volumen final.

* El medio de cultivo de la cepa 3040 contiene uracilo 0,1 mM y arginina 20 µg/ml que son requerimientos esenciales.

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE TRANSPORTE

Existen diferentes mecanismos de transporte de sustancias a través de membranas celulares. La distinción se basa en consideraciones cinéticas y termodinámicas. Sobre la base de las características termodinámicas del proceso, pueden catalogarse dos grupos de mecanismos: por un lado, aquéllos que solamente proceden a favor de un gradiente de concentración, y por el otro aquéllos que pueden operar en contra de dicho gradiente, concentrando el soluto. Por supuesto que el primer grupo no consume energía mientras que sí lo hace el segundo.

Dentro del primer grupo se incluyen los mecanismos de transporte por difusión pasiva y por difusión facilitada. El sistema de difusión pasiva no requiere la existencia de sistemas enzimáticos y simplemente está condicionado por la naturaleza del soluto. Por el contrario la difusión facilitada cuenta con un sistema enzimático de transportadores o "carriers" y cinéticamente se comporta como un sistema saturable por la concentración del soluto. Tales "carriers" poseen sitios estereoespecíficos en los cuales se produce una unión reversible de las sustancias a transportar.

En el segundo grupo se incluyen dos mecanismos: el de transporte activo y el de translocación de grupos (35). En ambos se requiere energía, pero mientras que en el transporte activo la misma

se emplea para activar al sistema transportador, en el segundo se la utiliza para introducir una modificación química en la sustancia transportada. En este último caso, el proceso de transporte es esencialmente irreversible y por ello la translocación de grupo también es denominada como transporte vectorial.

La sensibilidad a inhibidores específicos es una característica de los sistemas de transporte mediado, que incluyen a la difusión facilitada y especialmente a los del segundo grupo.

Los inhibidores pueden ser competitivos de la entrada del sustrato a nivel de los sitios en la proteína "carrier", bloqueadores de grupos SH de dichas proteínas ej. NEM, PCMB o de grupos amino ej. DNFB, etc.

A fin de caracterizar el mecanismo de transporte de uracilo en *E. coli* se ha ensayado el efecto de diversos inhibidores (tabla 4). El arseniato es capaz de competir con el fosfato en la fosforilación del ADP impidiendo la formación de ATP. El 2; 4 dinitrofenol es desacoplante de la fosforilación oxidativa mientras que la oligomicina es un inhibidor de la transferencia de energía en el sistema que sintetiza ATP en dicha fosforilación. La N-Etil maleimida bloquea grupos sulfhidrilo de las proteínas.

En mayor o menor grado todos estos inhibidores resultaron efectivos en las concentraciones usadas, que no son extremas, lo que sugiere la conclusión de que estamos en presencia de un transporte mediado, probablemente activo.

TIEMPO DE ENSAYO (MINUTOS)	Sin adic	Arseniato 10^{-2} M	Oligomici na 10^{-3} M	2-4 DNP 10^{-3} M	N - E - M $0,5 \times 10^{-3}$ M
	nmoles uracilo (³ H) incorporados				
2	0,07	0,04	0,06	0,05	0,005
4	0,14	0,09	0,10	0,08	0,004
6	0,21	0,12	0,15	0,11	0,004
10	0,29	0,20	0,20	0,07	0,005

Tabla 4: Estudio de la acción de inhibidores

Se mide incorporación total de uracilo (³H) a 100 μ l de *Escherichia coli* cultivadas en medio AG con glucosa 20 mM.

Ensayo: uracilo (³H) 7 μ M; 30000 cpm/nmol y los inhibidores que se indican en cada caso. Volúmen final 120 μ l.

Técnica: según $D_2 - D_3$.

CINETICA DE LA INCORPORACION DL URACILO

Era necesario caracterizar el sistema de transporte de uracilo desde el punto de vista cinético y además determinar cómo se afecta dicho sistema por el agregado de AMP cíclico a los cultivos de *E. coli*.

Los datos de velocidades de incorporación de uracilo ³ (H) se obtuvieron haciendo curvas de tiempo de la captación del precursor marcado a diversas concentraciones del mismo y determinando en cada caso la pendiente de la misma extrapolada al origen.

Considerando las velocidades iniciales (extrapolando a tiempo igual a cero) como exentas de efectos de saturación, inhibición por producto o consumo de sustrato, se representaron las mismas versus las concentraciones correspondientes de uracilo (figura 13). Se obtuvo una cinética michaeliana de saturación lo que caracteriza a un sistema de transporte mediado.

En el gráfico de Lineweaver-Burk (39) que representa las inversas de velocidades de incorporación respecto de las inversas de concentraciones de uracilo (figura 14), se observa el efecto del AMP cíclico sobre la velocidad máxima del sistema, que sufre una disminución. El K_m (constante de Michaelis) parámetro cinético cuya inversa mide la afinidad, no se altera, su valor es de $0,60 \mu\text{M}$ mientras que la velocidad máxima desciende de $1,33$ a $0,83$ nmoles de ura-

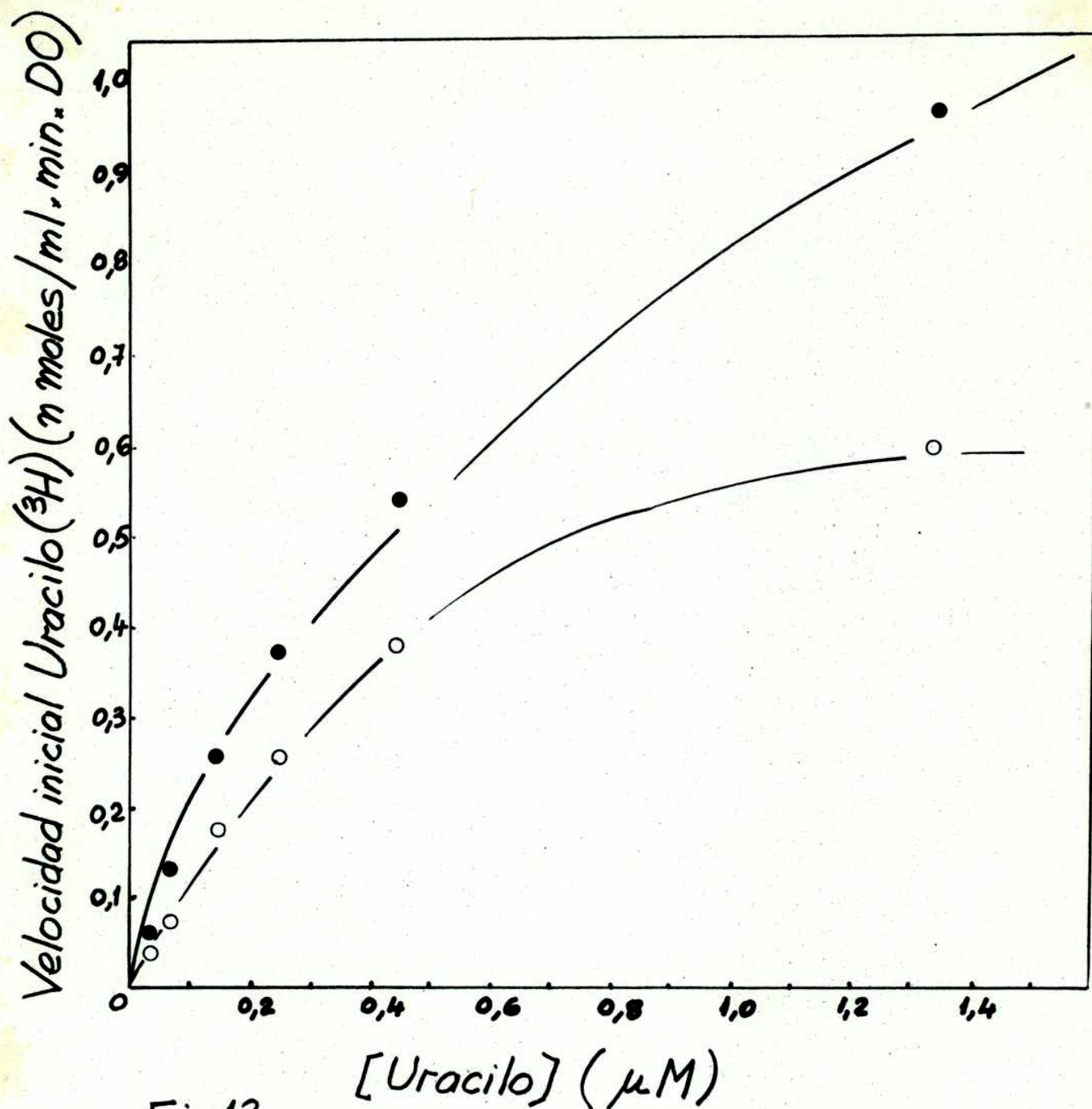


Fig. 13.

Representación de Michaelis de la cinética de incorporación de uracilo (^3H).
 Ensayo: 100 μl de bacterias cultivadas \circ con o \bullet sin el agregado de AMP cíclico se incubaron con uracilo (^3H) en concentración variable entre 0,03 μM 20000 cpm/pmol y 1,33 μM 400 cpm/pmol en un volumen final de 115 μl .

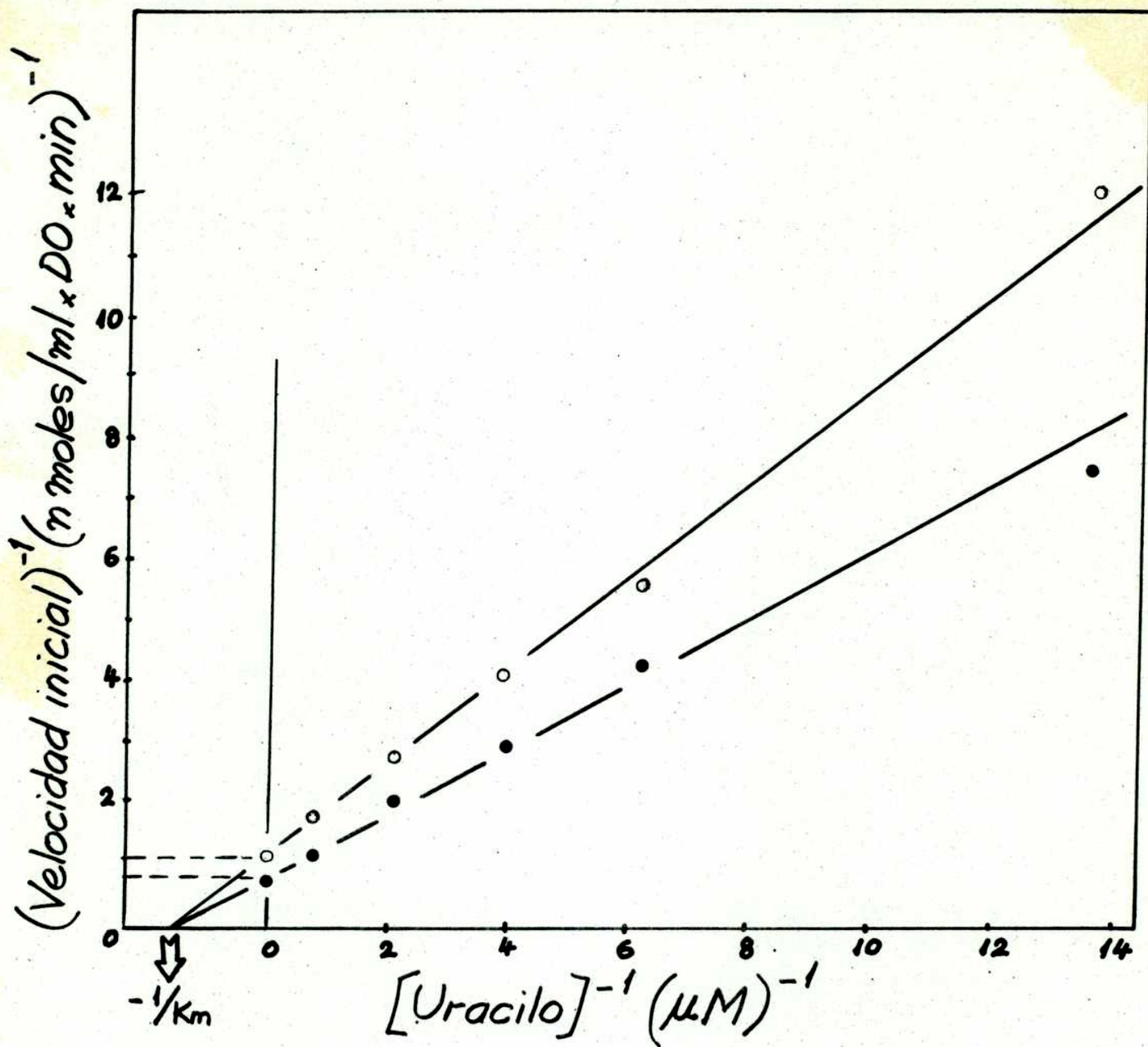


Fig. 14.

Gráfico de Lineweaver-Burk.

Los valores graficados son inversas de los correspondientes a la figura 13.

○ con y ● sin el agregado de AMP cíclico.

cilo incorporados por minuto, por unidad de densidad óptica a 560 nm y por ml de cultivo bacteriano.

Estos resultados demuestran que la afinidad del precursor por su sitio específico en la membrana no disminuye por la presencia del AMP cíclico, alterándose sin embargo, la eficiencia del sistema de transporte.

EFFECTO DE LA URIDINA SOBRE LA INCORPORACION DE URACILO

El transporte de nucleósidos en bacterias no ha sido muy estudiado, y menos aún el de pirimidinas o sea uridina, citidina y timidina. Existen evidencias que demuestran que se trata de un transporte activo (36) y que los mismos nucleósidos sirven como fuente de energía.

La uridina en su mayor parte es incorporada como nucleósido intacto y desdoblada a uracilo y ribosa 1P en el interior de la célula. El uracilo es excretado en parte y la ribosa 1P retenida (37). Otro mecanismo alternativo para la uridina es la posibilidad de desdoblarse en uracilo y ribosa 1P en el espacio periplásmico: en este caso, el uracilo entra y la ribosa 1P no es transportada. A partir de este punto este proceso sería común con el de captación de uracilo que se transforma directamente en el nucleósido monofosfato 5' UMP a través de la enzima uracilo-fosforribosil transferasa.

Antes de describir la reacción antedicha es preciso aclarar lo que se entiende por espacio periplásmico.

El espacio periplásmico está comprendido entre la capa de lipopolisacárido de la pared bacteriana que lo limita exteriormente y la membrana plasmática. En esta región se hallan una serie de enzimas cuyo contacto con la superficie celular es evidente por cier-

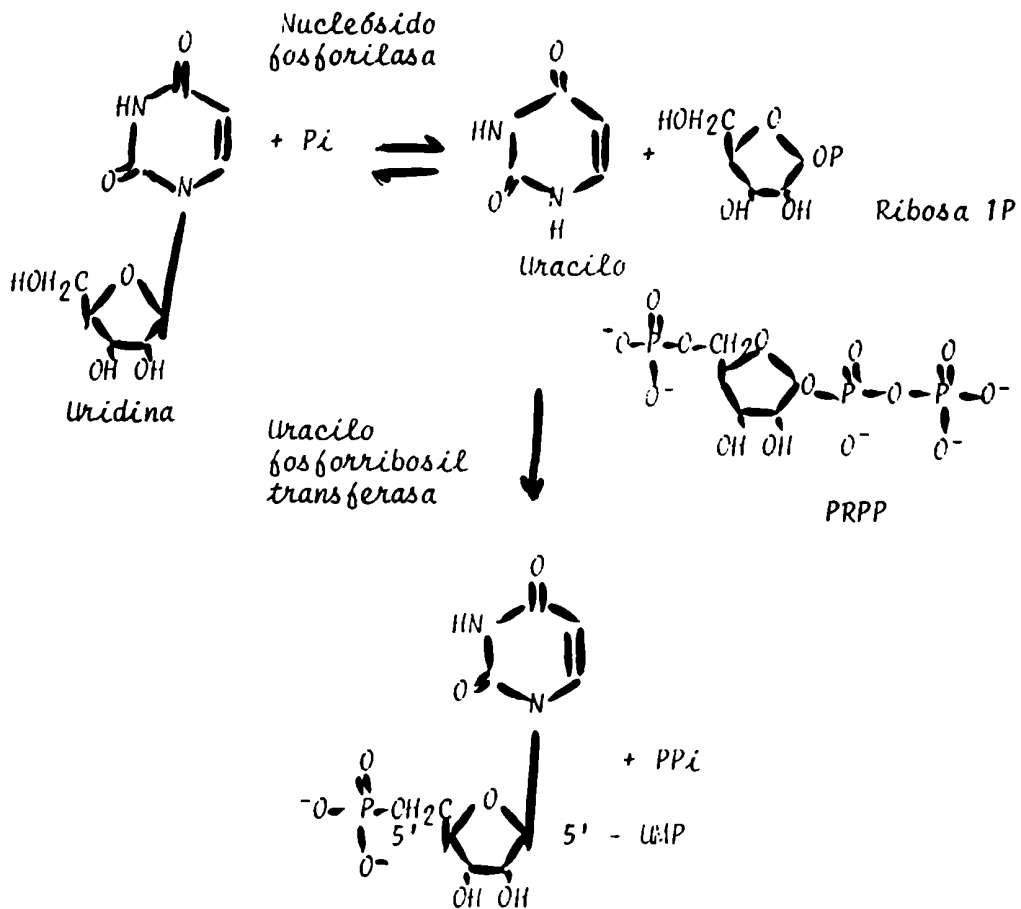
tas características (38): 1) son liberadas de la bacteria al someter a ésta a un shock osmótico luego de un tratamiento previo con EDTA, tal que se mantenga la integridad de la membrana y la viabilidad de la célula al final del proceso. 2) su actividad es medible en células intactas aún con sustratos que no atraviesan la membrana bacteriana. 3) se pueden reconocer por estudios histoquímicos.

Se trata en general de enzimas hidrolíticas como nucleasas y fosfatasas o bien de proteínas que intervienen en el transporte de azúcares, aminoácidos, etc. Se ha observado que luego del shock osmótico se reduce la captación de metabolitos mediada por estas proteínas.

Parece general la observación de que este grupo de "enzimas de superficie" en E. coli y otras bacterias gram-negativas, se convierte en exo-enzimas en las gram-positivas, o sea en enzimas que se excretan al medio.

La uracilo fosforribosil transferasa está presente en el espacio periplásmico bacteriano en la mayoría de las cepas de E. coli; sin embargo existen algunas como el E. coli B que no cuentan con dicho sistema enzimático (24).

Volviendo al paso metabólico que comparten ambos precursores de la síntesis de RNA: el uracilo y la uridina en bacterias, se tiene la siguiente secuencia de reacciones.



En experimentos de incorporación de uracilo³ (H) en presencia de uridina se pudo determinar el efecto competitivo del nucleósido sobre la base correspondiente (figura 16).

Se logró determinar el K_i (constante del inhibidor) utilizando la ecuación :

$$K_i = \frac{i}{K_p / K_m - 1} \quad (\text{Dixon y Webb - Enzymes pág. 328})$$

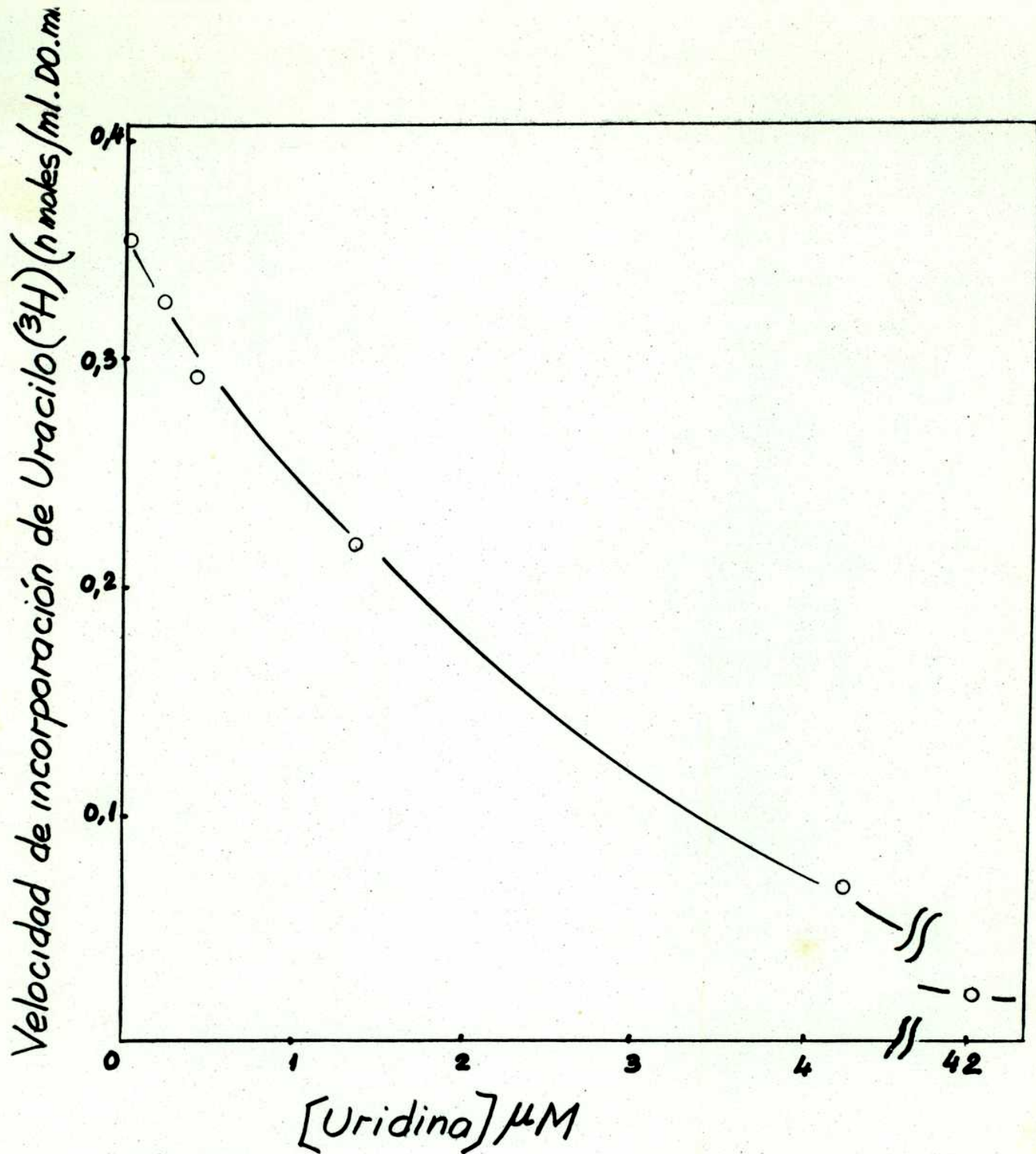


Fig. 15.

Efecto de la uridina sobre la incorporación de uracilo.
 Se incubaron 100 μl de bacterias con uracilo (^3H) 0,46 μM 1200 cpm/pmol y uridina en concentración variable en un volumen final de 115 μl .

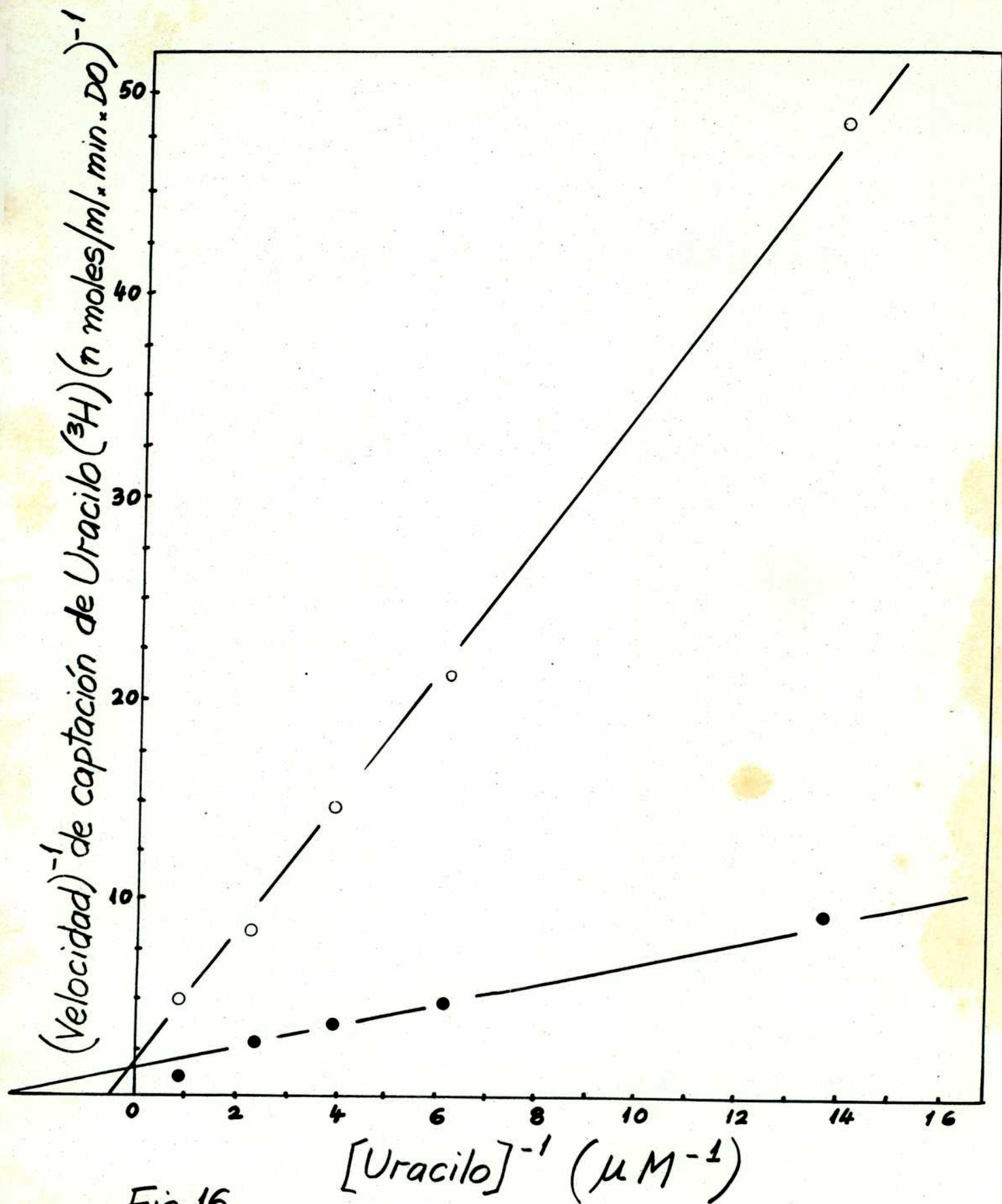


Fig. 16.

donde K_p es la constante de afinidad aparente de la enzima para el uracilo en presencia de uridina y cuyo valor, así como el de K_m se obtiene del gráfico de Lineweaver-Burk (39).

Otro método que se empleó para obtener el valor de K_i es el de Dixon que representa $1/v$ versus i (figura 17) a concentraciones variables del inhibidor uridina. Con ambos métodos el valor de K_i (uridina) fue similar: $0,75 \mu\text{M}$. Este valor de K_i es prácticamente coincidente con el obtenido para el K_i de uracilo, lo que significa que existen afinidades similares por el sustrato y el inhibidor en los sitios de la proteína transportadora.

La figura 15 muestra la inhibición casi total de la incorporación de uracilo (^3H) por cantidades crecientes de uridina.

El hecho de que la uridina modifique el K_m del sistema para el uracilo y no su velocidad máxima, implica que se trata de una inhibición competitiva y que ambos, sustrato e inhibidor, poseen al menos un mecanismo común de transporte. En este caso todos los sitios de transporte utilizables por el uracilo también pueden ser utilizados por la uridina.

FIG. 16: Efecto de la uridina sobre la incorporación de uracilo. Incorporación de uracilo (^3H) en concentraciones variables entre $0,03$ y $1,33 \mu\text{M}$ sin \bullet y con \circ el agregado de uridina $5 \mu\text{M}$. Ensayo: $100 \mu\text{l}$ de bacterias + uracilo (^3H) entre 400 y 2000 cpm/pmol en $115 \mu\text{l}$ de volumen final.

(Velocidad)⁻¹ de incorporación de Uracilo (³H) $\left(\frac{\mu\text{ moles}}{\text{mL} \cdot \text{D.O.} \cdot \text{min.}}\right)$

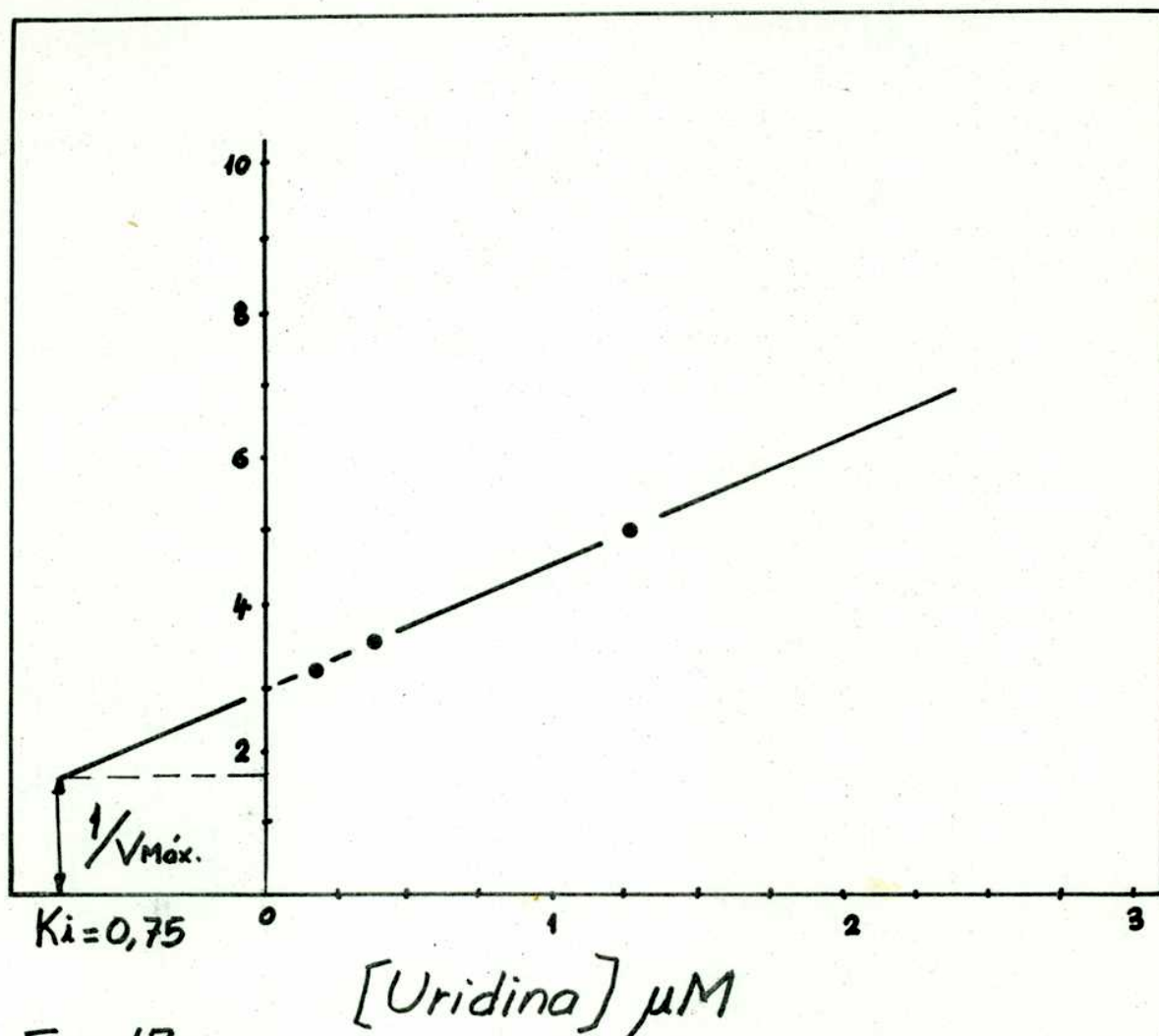


Fig. 17.

Efecto de la uridina sobre la incorporación de uracilo (³H).
Cálculo del valor de K_i para uridina según gráfico de Dixon (ver texto).
Los datos provienen del experimento graficado en la figura 15.

EFFECTO DEL URACILO SOBRE LA INCORPORACION DE URIDINA

Si es cierto que el uracilo posee un sistema de transporte que es compartido por la uridina, sería útil demostrar si la inversa es cierta. Esto es, si el uracilo es capaz de utilizar todos los sitios que transportan uridina.

Como primera aproximación se han realizado experimentos de incorporación de uridina (H) a una concentración fija, a tiempos muy cortos y se lo ha competido con cantidades variables de uracilo. La curva de incorporación instantánea de uridina es decreciente en función de la concentración de uracilo presente, pero no hay inhibición total de la captación de uridina (figura 18).

Existe un remanente de incorporación de uridina (H), aún cuando la concentración de uracilo agregada llegue a 1000 veces el valor correspondiente de la uridina. El valor de este remanente es significativo en cuanto a su aporte a la incorporación total del nucleósido, ya que constituye alrededor de un 30% de la misma.

De aquí surge que el mecanismo de transporte compartido por el uracilo y la uridina es responsable del 70% de la incorporación del nucleósido, existiendo a la vez para la uridina un sistema independiente que da cuenta del resto.

Es posible dar un tratamiento cinético más completo a este caso de inhibición parcialmente competitiva, desarrollando los

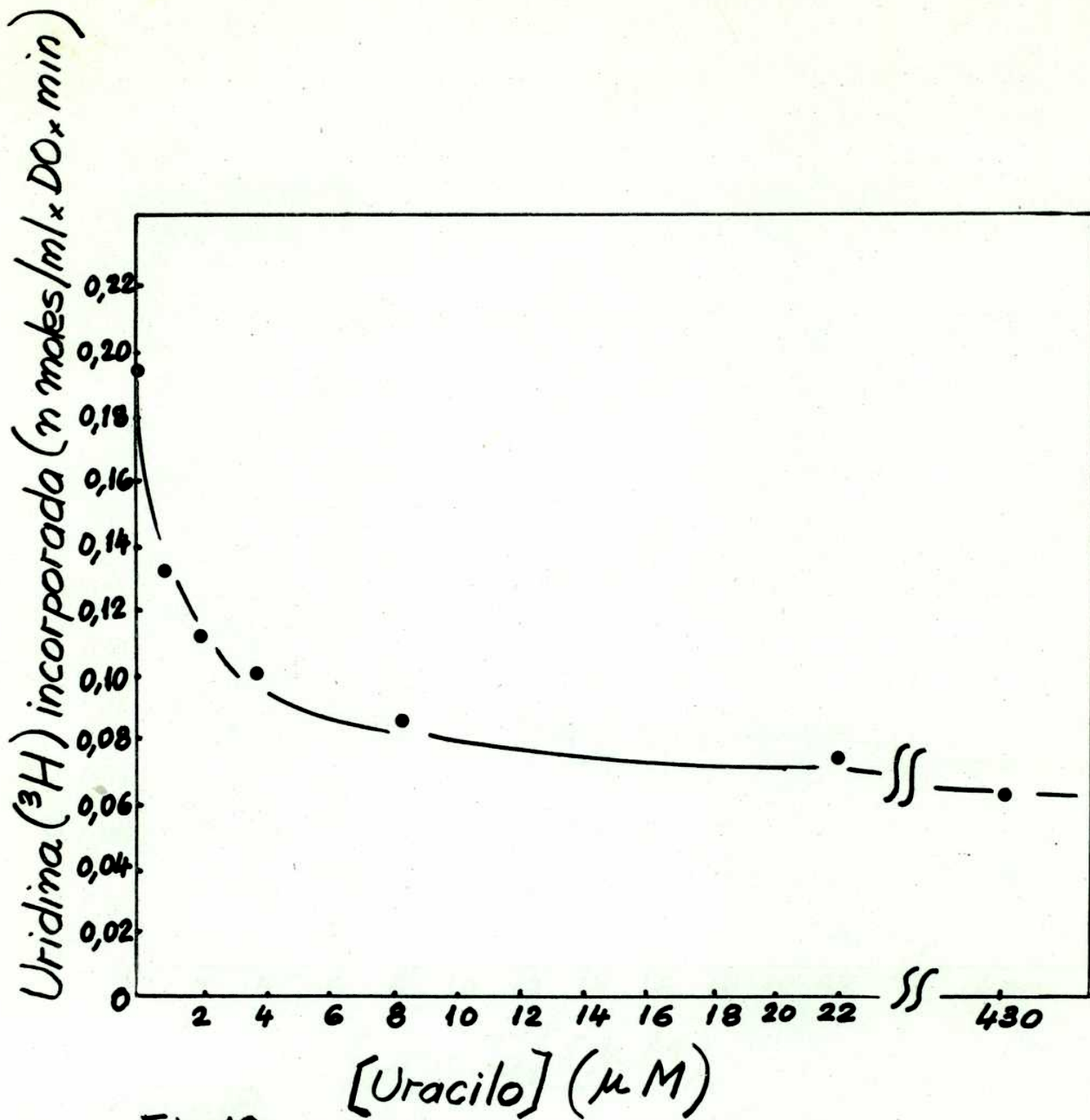


Fig. 18.

Efecto del uracilo sobre la incorporación de uridina.
 Ensayo: 100 μl de bacterias + uridina (³H) 0,5 μM 800 cpm/pmol y uracilo variable, en un volumen final de 110 μl.

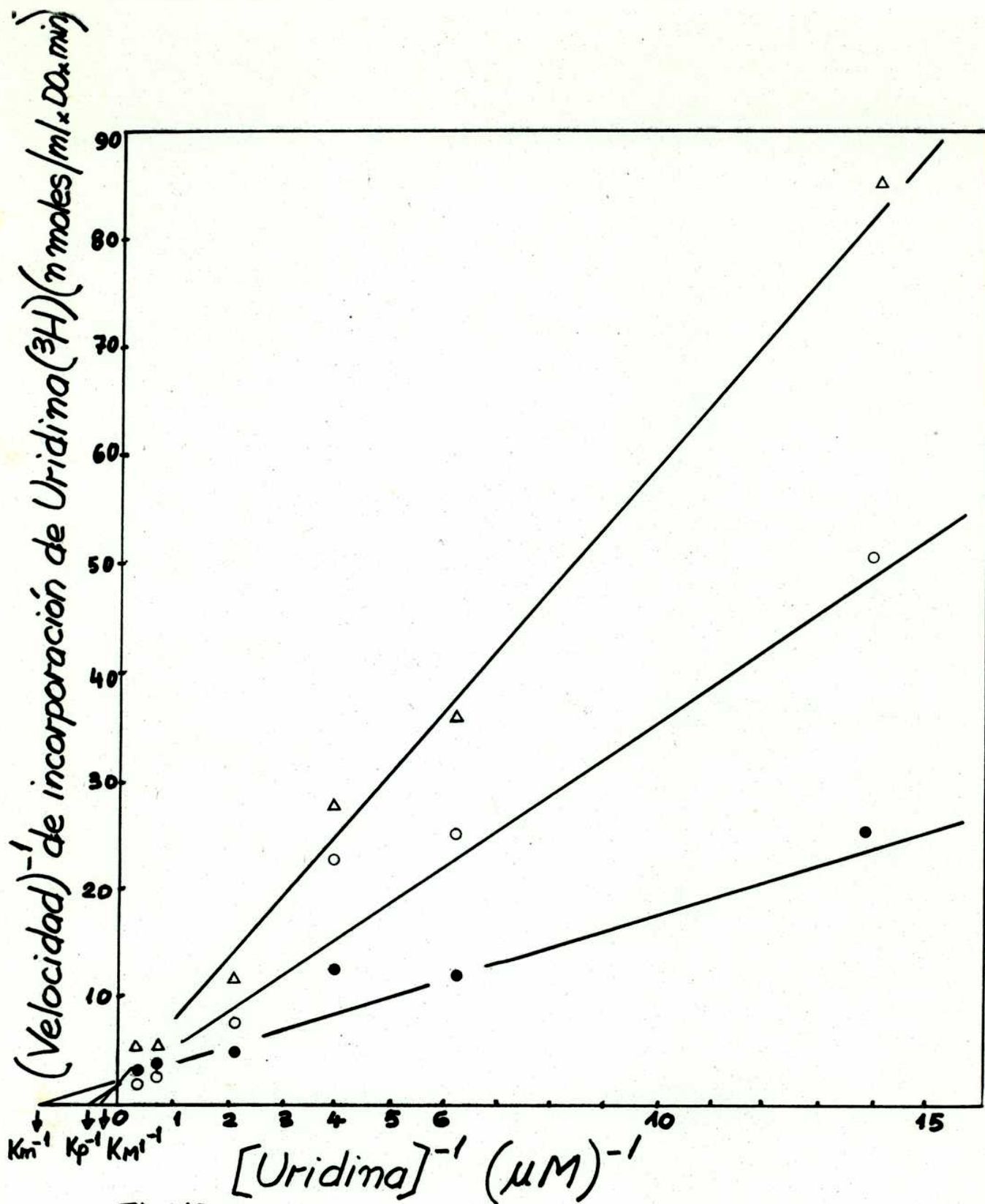


Fig. 19.

Efecto del uracilo sobre la incorporación de uridina.
 Gráfico de Lineweaver-Burk. ● sin agregado de uracilo ○ con uracilo $2,5 \mu\text{M}$
 △ con uracilo $250 \mu\text{M}$. Ensayo: bacterias $100 \mu\text{l}$; uridina (^3H) variable entre $0,25$ y $5 \mu\text{M}$ (85 cpm/pmol y 1700 cpm/pmol) volumen final $115 \mu\text{l}$.

experimentos de inhibición de la incorporación de uridina por el uracilo en condiciones de exceso de inhibidor, lo que provee un dato distinto de K_m aparente que llamaremos K'_m .

Según Dixon (Enzymes pag 328), el valor de K_i toma la forma siguiente:

$$K_i = \frac{i}{\frac{K_p}{K_m} + 1} \left(1 - \frac{K_p}{K'_m} \right)$$

donde K_p y K_m son los utilizados en la sección precedente.

El término que aparece como factor de la expresión del K_i para un sistema competitivo, se hace unitario en dicho caso pues K'_m tiende a infinito, o sea que la afinidad de la enzima por el sustrato en presencia de un exceso de inhibidor totalmente competitivo es prácticamente nula.

En este caso (figura 19) el método de Lineweaver-Burk provee los tres parámetros necesarios para el cálculo del K_i ; a saber

- K_m uridina = 0,66 μM
- K_p uridina a bajo uracilo = 2 μM
- K'_m uridina a alto uracilo = 4 μM
- (i) = 2,5 μM

Se obtiene

$$K_i = 0,62 \mu M$$

Es de notar que el valor de K'_m llega a un máximo de $4 \mu\text{M}$, con lo que la afinidad calculada como inversa de los valores de K_m y K'_m disminuye sólo seis veces: de $1,5$ a $0,25 \mu\text{M}^{-1}$ y no es cero.

En conclusión, el uracilo resulta un inhibidor parcial mente competitivo de la captación de uridina, mientras que esta última es un inhibidor competitivo de la incorporación del primero.

Una síntesis de los parámetros cinéticos calculados para ambos precursores puede apreciarse en la tabla 5.

TABLA 5

EXPERIMENTO	SUSTRATO	INHIBIDOR	AMP cíclico	PARAMETRO	VALOR
1	uracilo			K_M	0,60 μ M
	uracilo			K_M	0,60 μ M
	uracilo			V_M	1,33 nmol/ min.ml
	uracilo			V_M	0,83 nmol/ min.ml
2	uracilo	uridina		V_M	1,0 nmol/ min.ml
	uracilo			V_M	1,0 nmol/ min.ml
	uracilo	uridina		K_i	0,75 μ M
	uracilo	uridina		K_p	3,3 μ M
	uracilo			K_m	0,55 μ M
3	uridina			K_M	0,66 μ M
	uridina	bajo uracilo		K_p	2 μ M
	uridina	alto uracilo		K_i'	4 μ M
	uridina	uracilo		K_i	0,62 μ M
	uridina			V_M	0,4 nmol/ min.ml
	uridina	bajo uracilo		V_M	0,5 nmol/ min.ml
	uridina	alto uracilo		V_M	0,5 nmol/ min.ml

EFFECTO DEL AMP CICLICO SOBRE LA PERMEABILIDAD PARA URIDINA

Una vez reconocida la identidad de uno de los sistemas de transporte de uridina con el correspondiente al uracilo, era lógico pensar que el AMP cíclico ejercería su acción depresora sobre la captación de uridina por este mecanismo.

Se hicieron experimentos de transporte del nucleósido en ausencia y en presencia de una cantidad en exceso de uracilo, con o sin el agregado de AMP cíclico.

De los gráficos se desprende que el AMP cíclico, no sólo actúa sobre el mecanismo común de transporte de uridina y uracilo sino también sobre el otro, que se puede medir en presencia de un exceso de uracilo (figura 20).

En ambos casos resulta evidente un efecto depresor del AMP cíclico sobre la velocidad inicial de incorporación de uridina, en un 25%.

Ese segundo sistema exclusivo de la uridina implica su pasaje a través de la membrana bacteriana como nucleósido intacto, para su posterior transformación en el interior de la célula.

No se ha estudiado aquí en detalle la acción del AMP cíclico sobre este segundo mecanismo, pero es dable observar "a priori" que no se hallaría exento de la influencia del AMP cíclico.

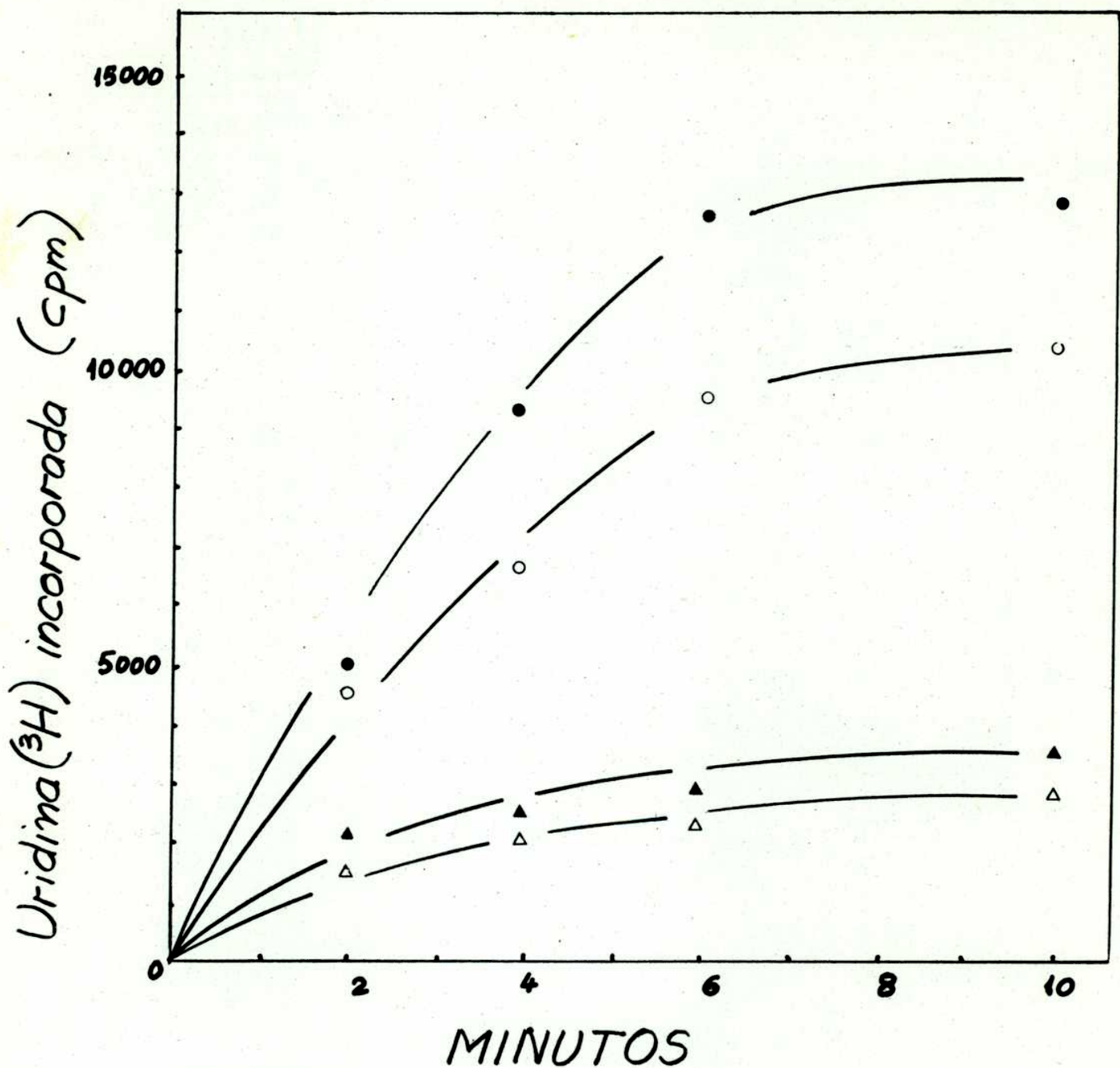


Fig. 20.

Efecto del AMP cíclico sobre la permeabilidad para uridina.
 Curvas de incorporación de uridina (^3H) en función del tiempo en alícuotas de *E. coli* Hfr 1100 de 100 μl con: ○ AMP cíclico 5 mM, △ AMP cíclico 5 mM y uracilo 250 μM . ● sin adiciones, ▲ con uracilo 250 μM . Uridina (^3H) 4,5 μM 100 cpm/pmol en un volumen final de 110 μl en todos los casos.

CONCLUSIONES

A lo largo de este trabajo se ha podido ejemplificar una vez más la importancia del AMP 3' - 5' cíclico como regulador biológico.

Desde el año 1965 en que Makman y Sutherland dieron cuenta de su existencia en las bacterias, el AMP cíclico adquirió especial significación en el conocimiento del control metabólico de los procariotes.

Es estimulador de la síntesis de enzimas inducibles, como la β -galactosidasa revertiendo la represión catabólica y la diauxia. Es capaz de incrementar la competencia para la transformación por DNA en *Hemophilus* y es un regulador del ritmo de crecimiento en *E. coli*.

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, el nucleótido cíclico debe verse además como una sustancia versátil, cuyos niveles controlan el transporte de metabolitos a través de la membrana bacteriana.

Se han podido caracterizar en este estudio parte de los fenómenos que desencadena el agregado de AMP cíclico en el metabolismo de *Escherichia coli*.

Se ha partido de una observación de la disminución de la velocidad de crecimiento de los cultivos de *E. coli* en glucosa en presencia de AMP cíclico.

Se ha constatado que la síntesis de RNA total y de proteínas no se afecta en este caso, y que la disminución de incorporación

de precursores de RNA a material insoluble en TCA observada, es consecuencia de un efecto inhibitorio primario a nivel de permeabilidad celular.

La incorporación total de uracilo (^3H) es menor en bacterias cultivadas en presencia de AMP cíclico, aún cuando se realiza el ensayo en presencia de un inhibidor de la síntesis de RNA como es la rifampicina.

Se comprobó que el efecto observado a nivel de permeabilidad celular, se produce cuando se cultiva a la bacteria en una fuente de carbono que coexiste con bajo nivel de AMP cíclico, como es el caso de la glucosa.

El mecanismo de transporte de uracilo no es afectable, por ulterior agregado del nucleótido, en bacterias cultivadas en glicerol, malato o succinato, para las que se tienen niveles de AMP cíclico normalmente mayores.

Además se vio que la acción del AMP cíclico sobre el transporte a través de la membrana requiere un tiempo de contacto del mismo con la bacteria durante el cultivo, hecho comparable a lo que ocurre en el *Hemophilus* (12) para la competencia para la transformación por DNA. Además la presencia de AMP cíclico en el ensayo no interfiere en la incorporación del precursor.

La concentración del nucleótido capaz de producir el 50% del efecto inhibitorio máximo sobre la velocidad de incorporación del uracilo radioactivo es del orden de 1,5 mM. Con 5 mM se consigue

la inhibición máxima de este proceso que alcanza a un 60% respecto del control sin AMP cíclico.

La disminución de la permeabilidad observada no es causa ni efecto de la producida en el ritmo de crecimiento. No es causa, pues la bacteria es protótrofa y se cultiva en un medio salino mínimo con un exceso de glucosa como única fuente de carbono; de modo que aun que hubiera un control de incorporación de otros precursores en este medio, el mismo no daría cuenta del menor crecimiento. No es efecto, pues logrando tiempos de generación mayores al cultivar la bacteria a menores temperaturas, el transporte de uracilo no disminuye, de modo que resulta independiente del ritmo de crecimiento.

Se ha podido establecer además el mecanismo molecular de la acción del AMP cíclico. La imposibilidad de manifestarse el efecto inhibitorio en una cepa mutante de E.coli: CAP⁻ que no posee la proteína receptora del AMP cíclico, sugiere la necesidad de la existencia del complejo CAP - AMP cíclico como sistema modulador de este proceso a nivel de transcripción genética.

Junto con CAP, el nucleótido cíclico promovería la expresión genética de una proteína o enzima que controlara el transporte de ciertos precursores, o bien impediría que se transcriba el gen de la fosforribosil transferasa y/o otras proteínas involucradas en el transporte.

En cuanto al mecanismo de transporte del uracilo se ha verificado: que no es inducible, y que se trata de un transporte media

do activo, sensible a inhibidores específicos como el 2,4 - dinitrofenol, la N-etil maleimida, el arseniato y la oligomicina.

Posee una cinética de saturación tipo michaeliana y el valor de K_m para el uracilo es de alrededor de $0,60 \mu M$.

En este proceso, el AMP cíclico modifica como resultante la velocidad máxima del sistema, lo que haría pensar en una cantidad menor de sitios enzimáticos o de moléculas de enzimas disponibles en este caso.

Este mecanismo de incorporación de uracilo es común con uno de los dos que posee la uridina, dado que el nucleósido puede incorporarse luego de su transformación a uracilo por la nucleósido fosforilasa, o bien como nucleósido intacto para luego transformarse en el interior de la célula.

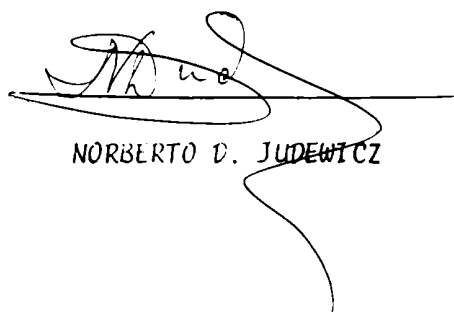
Se ha determinado el valor de K_i para uridina como inhibidor competitivo de la incorporación de uracilo. Inversamente, se vio que este último es sólo un inhibidor parcialmente competitivo del transporte de la uridina, calculándose los parámetros cinéticos del caso.

Finalmente, el AMP cíclico es capaz de disminuir en la misma magnitud, el segundo mecanismo de transporte de la uridina, mediado en presencia de un exceso de uracilo.

Por estudios realizados en otros laboratorios, se ha determinado la participación del AMP cíclico en una variedad de procesos

en bacterias, como la determinación de la relación estructural de los componentes de la superficie celular (40), el transporte de la glucosa 6 - fosfato (41), la producción de flagelos (13), etc.. Estos fenómenos junto con el que aquí nos ocupa, poseen una característica común, que es la de estar asociados física y funcionalmente con los sistemas de membranas de microorganismos (42).

Lo mismo que en eucariotes, el AMP cíclico sería capaz de regular el metabolismo bacteriano a nivel de permeabilidad para los distintos nutrientes (19), permitiendo una entrada selectiva en calidad y cantidad de los mismos de acuerdo a las necesidades celulares. Esto implicaría la posibilidad de extender los resultados observados a nivel de transporte de uracilo, hacia otros precursores de la síntesis de macromoléculas o metabolitos intermedios cuya incorporación estaría también regulada.



NORBERTO D. JUDEWICZ



Dr. HECTOR N. TORRES

BIBLIOGRAFIA

1. Robison, G.A., Butcher, R.W. and Sutherland, E.W. *Cyclic AMP* Cap 12 Academic Press (1971).
2. Jost, J.P. and Rickenberg, H.V. *Annual Review of Biochem.* 40, 741 (1971).
3. Contesse, G., Crépin, M., Gros, F., Ullman, A. and Monod, J. *The lactose operon* p.401 C.S.H.Lab. (1970).
4. Emmer, M., de Crombrughe, B., Pastan, I. and Perlman, R. *Proc. Nat Acad Sci. U.S.* 66, 480 (1970).
5. Zubay, G., Schwartz, D. and Beckwith, J. *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 66, 104 (1970).
6. Pastan, I. and Perlman, R.L. *J. Biol. Chem.* 244, 2226 (1969).
7. Sankaran, L. and Pogell, B.M. *Nature N.B.* 245, 257 (1973).
8. Pastan, I. and Perlman, R.L. *Science* 169, 339 (1970).
9. Perlman, R.L., de Crombrughe, B., and Pastan, I. *Nature* 223, 810 (1969).
10. Perlman, R.L. and Pastan, I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 151 (1969).
11. Ullman, A. and Monod, J. *FEBS Lett.* 2, 57 (1968).
12. Wise, E.M., Alexander, S.P. and Powers, M. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 70, 471 (1973).
13. Yokota, T. and Gots, J.S. *J. Bacteriol.* 103, 513 (1970).

14. Makman, R.S. and Sutherland, E.W. *J.Biol.Chem.* 240, 1309 (1965).
15. Judewicz, N.D., De Robertis, E.M. and Torres, H.N. *Biochem.Biophys. Res.Commun.* 52, 1257 (1973).
16. Johnson, G.S., Friedman, R.M. and Pastan, I. *Proc.Nat.Acad.Sci U.S.* 68, 425 (1971).
17. Otten, J., Johnson, G.S. and Pastan, I. *J.Biol.Chem* 247, 7082 (1972).
18. Jiménez de Asúa, L., Surian, E.S., Flawid, M.M. and Torres, H.N. *Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.* 70, 1388 (1973).
19. Holley, R.W. *Proc.Nat.Acad.Sci.US.* 69, 2840 (1972).
20. Burk, R.R. *Nature* 219, 1272 (1968).
21. Sheppard, J.R. *Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.* 68, 1316 (1971).
22. Hauschka, P.V., Everhart, L.P. and Rubin, R.W. *Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.* 69, 3542 (1972).
23. Kram, R., Mamont, P. and Tomkins, G.M. *Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.* 70, 1432 (1973).
24. Crawford, I., Kornberg, A. and Simms, E.S. *J.Biol.Chem* 226, 1093 (1957).
25. Hochstadt-Ozer, J. and Stadtman, E.R. *J.Biol.Chem* 246, 5312 (1971).
26. Bachman, B.J. *Bact.Reviews* 36, 525 (1972).
27. Perlman, R., Chen, B., de Crombrughe, B., Emmer, M., Gottesman, M., Varmus, H. and Pastan, I. *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.* 35, 419 (1970).
28. Brickman, E., Soll, L. and Beckwith, J. *J.Bacteriol* 116, 582 (1973).

29. Sippel, A. and Hartman, G. *Biochim.Biophys.Acta* 157, 218 (1968).
30. Wehrli, W. and Staehelin, M. *Bact.Reviews* 35, 290 (1971).
31. Buettner, M.J., Spitz, E. and Richenberg, H.V. *J.Bacteriol*, 114, 1068 (1973).
32. Anderson, E.B., Schneider, A.B., Perlman, R.L. and Pastan, I. *J.Biol,Chem.* 246, 5929 (1971).
33. Beckwith, J., Grodzicker, T. and Ariditti, R. *J.Mol.Biol.* 69, 155 (1972).
34. De Robertis, E.M., Judewicz, N.D. and Torres, H.N. *Biochem.Biophys. Res.Commun.* 55, 758 (1973).
35. Kaback, H.R. *Biochim.Biophys.Acta* 265, 367 (1972).
36. Roy - Burman, S. and Visser, D.W. *Biochim.Biophys.Acta* 282, 383 (1972).
37. Von Dippe, P.J., Roy - Burman, S. and Visser, D.W. *Biochim. Biophys.Acta* 318, 105 (1973).
38. Heppel, L.A. *Science* 156, 1451 (1967).
39. Lineweaver, H. and Burk, D. *J.Amer.Chem.Soc.* 56, 658 (1934).
40. Weeks, B.A. and Dobrogosz, W.J. *Abs.Ann.Meet.Am.Soc.Microbiol.* p.174 (1973).
41. Ezzel, J.W. and Dobrogosz, W.J. *Abs.Ann.Meet.Am.Soc.Microbiol.* p.176 (1972).
42. Patrick, J.M. and Dobrogosz, W.J. *Biochem.Biophys.Res.Commun* 54, 555 (1973).

INDICE

	Pág.
<i>Abreviaturas</i>	1
<i>Introducción</i>	2
<i>Materiales y Métodos</i>	15
<i>Resultados</i>	22
<i>Conclusiones</i>	83
<i>Bibliografía</i>	88