

El gen *narG* Y EL OPERÓN *moa* (ABCDE) COMO POSIBLES REGULADORES DE LA RESPIRACIÓN ANAERÓBICA DEL NITRATO, EN *Escherichia coli* K12

Mariemma Ortega de López

Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.

Resumen

Las mutaciones *narC-8* y *narC-78*, ambas en el operón *narC(narGHJI)*, confieren el fenotipo Nit- y bloquean la expresión de la fusión transcripcional $\Phi(moa::lac)_{25}$, en *E.coli* K12. Ambas mutaciones fueron estudiadas comparativamente en el presente trabajo e identificadas como *narG-*. Los análisis de dominancia en trans mostraron que los niveles de restauración Nit+ fueron influenciados por el crecimiento con molibdeno, la mutación particular y el genotipo bacteriano. El ensayo de inmunoelectroforesis indicó diferencias en el reconocimiento de la subunidad α de la NRA. El mapeo por ligamiento reveló el orden secuencial *narG-78*. *narG-8* ... *trp*. Los análisis genéticos con cepas isogénicas evidenciaron que, la recombinación substitutiva de *narG-* por *narG+*, restauró la expresión de la fusión y viceversa. Los análisis de dominancia en trans con cepas isogénicas mostraron, sorprendentemente, que la restauración Nit+ fue (i) mediada por el operón *moa(ABCDE)+* y (ii) condicionada por la mutación doble $\Phi(moa::lac)_{25}$ *narG-78*. Los resultados obtenidos confirmaron el papel regulador de *narG+* sobre la expresión transcripcional de *moa*, y sugirieron un posible papel regulador de ambos (*narG,moa*) en la respiración del nitrato.

Palabras claves: $\Phi(moa::lac)$; regulación *moa narG*; *mol*; *nar*; respiración del nitrato; *E.coli*; NRZ.

Abstract

The *narG* gen and *moa(ABCDE)* operon as possible regulators of the nitrate anaerobic respiration, in *Escherichia coli* K12.

In *E. coli* K12, both *narC-8* y *narC-78* mutations of the *narC(narGHJI)* operon confer the Nit- phenotype and block the expression of the $\Phi(moa::lac)_{25}$ transcriptional fusion. In the present work, both mutations were comparatively studied and identified as *narG-*. *Trans*-dominance analysis showed that Nit+ restoration levels were influenced by growing with molybdenum, particular mutation and bacterian genotype. Immunoelectrophoresis assay indicated differences in the NRA α subunit recognition. Mapped-linking revealed the sequential order ... *narG-78*... *narG-8* ... *trp*. Genetic analysis evidenced in isogenic strains that, the *narG+* substitutive recombination by *narG-*, restored the fusion expression and viceversa. Surprisingly, *trans*-dominance analysis showed in isogenic strains that Nit+ restoration was (i) *moa(ABCDE)+* operon mediated and (ii) $\Phi(moa::lac)_{25}$ *narG-78* double mutation conditioned. The results obtained confirmed the *narG+* regulatory role over the *moa* operon transcriptional expression and suggested a regulatory role of both (*narG+,moa*) in the nitrate respiration.

Key words: $\Phi(moa::lac)$; *moa narG* regulation; *mol*; *nar*; nitrate respiration; *E. coli*; NRZ.

INTRODUCCIÓN

La respiración anaeróbica del nitrato en *E. coli*, está acoplada a una cadena transportadora membranal, donde la molibdoenzima Nitrato Reductasa A (NRA) (la apoNRA + el molibdocofactor, MoCo) cataliza la reducción del nitrato a nitrito (Haddock y Jones 1977, Stewart 1988, Wootton et al. 1991). Es una de las vías de oxidorreducción inducibles que posee esa bacteria entérica (Ingledew y Poole 1984, Stewart 1993) y muestra gran similitud con la identificada en bacterias desnitrificantes (Berks et al. 1995). El operón *narC(GHJI)* (anteriormente *chlC*) (Puig y Azoulay 1967, Puig et al. 1969b, Stewart et al. MacGregor 1982, Shanmugan et al. 1992), mapea en el minuto 27

del cromosoma de *E. coli* y codifica para la apoNRA (Bachmann, 1990, Bonnefoy-Orth et al. 1981, Edwards et al. 1983, Fimmel y Haddock 1979, Sodergren y Demos 1988). El operón *narZYWV* codifica para la apoproteína de una segunda Nitrato Reductasa, llamada NRZ (Bonnefoy-Orth et al. 1987) difiere en sus propiedades con respecto a la NRA y su síntesis aparentó ser constitutiva (Blasco et al. 1990, Blasco et al. 1992, Iobbi et al. 1987).

Los genes *mol*, incluyen *moa*, *mob*, *mod*, *moe*, *mog* (anteriormente *chl*) y *molR* (Puig y Azoulay 1967, Lee et al. 1990, Shanmugan et al. 1992, Puig et al. 1969a, Dagert y Puig 1976), determinan la biosíntesis del MoCo (Miller y Amy 1983, Johnson y Rajagopalan 1987a, b, Stewart 1988, Pitterle y Rajagopalan 1989, Santini et al. 1989, Giordano et al. 1990, Johnson et al.

1990, Lee et al. 1990, Santini et al. 1992, Rivers et al. 1993).

Estudios con fusiones transcripcionales mostraron que la expresión del operón *narC* fue inducida en anaerobiosis con nitrato y sensible a los niveles de molibdato (Stewart 1988). Las proteínas NarL NarX y sus equivalentes NarP NarQ, en presencia del nitrato, inducen la expresión transcripcional del referido operón (Stewart 1982, Iuchi y Lin 1987, Li y Demos 1988, Rabin y Stewart 1992, Chiang et al. 1992, Stewart 1993, Li et al. 1994, Walker y Demos 1994), pero contrariamente reprimen la biosíntesis de otras vías de oxidorreducción, cuyo potencial redox es inferior al generado durante la respiración del nitrato (Li et al. 1994, Stewart 1993, Walker y Demos 1993). Los genes *mol*, parecen ejercer un papel negativo, mediado por la acción del MoCo (Pascal et al. 1982, Baker y Boxer 1991).

Con respecto al operón *moa*, la expresión de fusiones transcripcionales/traduccionales en medio LB, alcanzó niveles elevados en anaerobiosis y pudiera ser sensible a la represión por el MoCo (Baker y Boxer 1991). Contrariamente, en nuestro laboratorio, se observó que los niveles de expresión de una fusión transcripcional $\Phi(moa::lac)$ fueron relativamente bajos, en los medios sintéticos, e incrementaron durante el crecimiento aeróbico en fase exponencial (Ortega de L. 1985), similar a la biosíntesis del MoCo (Miller y Amy 1983); el genotipo de la cepa bacteriana (Díaz y Ortega de L. 1989), la edad del cultivo (Díaz y Ortega de L. 1989), el estado fisiológico de las células (Ortega de L. 1985, 1995) y la composición del medio de crecimiento (Ortega de L. 1994a, Meza et al. 1995) actuaron como moduladores; la expresión fue sensible a la represión transitoria y catabólica por glucosa (Ortega de L. 1985, 1994a, 1995) y a concentraciones variables de nitrato, azida y nitritos, respectivamente (Ortega de L. y Díaz 1995); las mutaciones *chlC-8* (Puig et al. 1969b) y *narC-MM78* (Ball y Ortega 1985), bloquearon totalmente la expresión de la fusión confirieron el fenotipo Lac- (Díaz y Ortega de L. 1988, 1992, Ortega de L. y Díaz 1995, Ortega de L. resultados inéditos).

La posible participación acoplada de circuitos de control genético que, permitirían un balance adecuado entre la biosíntesis de la NRA y del MoCo (Ortega de L. y Díaz 1995), fue estudiada en el presente trabajo. Las mutaciones *narC-8* y *narC-78* se analizaron comparativamente, además se evaluaron sus efectos sobre la expresión transcripcional de la fusión $\Phi(moa::lac)_{25}$ y la respiración anaeróbica del nitrato, utilizando cepas isogénicas construidas para tal fin.

METODOLOGÍA

1. Cepas y condiciones de crecimiento. Las cepas se describen en la Tabla 1. Las bacterias se incubaron a 30°C.

Los cultivos aeróbicos se crecieron con agitación fuerte, en fiolas de 250 ml conteniendo 10 ml de medio, y los anaeróbicos sin agitación, en tubos totalmente llenos con el medio.

2. Medios de cultivo. La composición de los medios mínimos, ricos y diferenciales (DOC) fue descrita (Miller 1972, Ortega de L. 1994a). El medio diferencial semisintético TNC contenía (/l): sales de medio mínimo agarizadas y suplementadas con 0.1 g de cloruro de 2,3,5 trifenil tetrazolio (TTC), 2 g de KNO₃, 2 g de casaminoácidos, 2 g de glucosa y vitamina B1 (Ortega de L. 1994b). Como fuente de carbono se utilizaron 2 g/l de glucosa o lactosa. Cuando fue necesario se adicionó (/ml): 20 mg de triptófano, 15 µg de tetraciclina (Tc) y 50 µg de ampicilina (Ap).

3. Técnicas genéticas. La transducción mediada por el fago P1_{vir} se realizó por el procedimiento de Lennox previamente descrito (Miller 1972). Los análisis de dominancia en *trans*, se realizaron con cepas merodiploides obtenidas por transformación con ADN plasmídico, extraído por lisis alcalina y su presencia verificada en geles (Sambrook et al. 1989).

4. Caracterización de cepas bacterianas. Los ensayos fenotípicos se realizaron según lo descrito Miller 1972). La reducción fisiológica del nitrato (Nit+) (Puig y Azoulay 1967) y la reversión fenotípica por molibdato 10⁻³ M (Glaser y Demos 1971), fueron valoradas espectrofotométricamente por la acumulación de nitritos en cultivos de una noche. Las colonias rojas (TNC+) se detectaron creciendo en medio agarizado TNC y fueron Nit- (Ortega de L. 1994b), las incoloras (TNC-) fueron Nit+. La liberación de gas (Gas+) se verificó en tubos Durham (Puig y Azoulay 1967).

5. Inmunolectroforesis. Células inducidas una noche (anaerobiosis + nitrato) fueron rotas en una prensa French, obteniéndose fracciones solubles y membranales (Blasco et al. 1992). Se utilizó suero de conejo anti-subunidad α de la NRA de *E. coli* (Blasco et al. 1992). La técnica "rocket" se aplicó (Graham et al. 1980), adicionando el antisuero a la agarosa, y bajo las condiciones descritas (Blasco et al. 1992).

Tabla 1. Lista de cepas utilizadas. Todas las cepas son F-, excepto la OM86. En el presente trabajo, las mutaciones *narC-8* y *narC-78* fueron identificadas como *narG-8* y *narG-78*, respectivamente. LCB = Laboratoire de Chemie Bactérienne (CNRS, Marsella, Francia)
OEG = Laboratorio Organización y Expresión del Gen.

| Cepa | Genotipo / Fenotipo relevante | Procedencia |
|------------------------------------|--|------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> K12 | | |
| MM78 | PC90 <i>narC-78</i> / ChI^R TNC+ Nit- Tc^R | Ortega de L, Diaz1995 |
| OM86 | CSH41 $\Phi(\text{moa}::\text{lac})25$ / TNC+ Nit- Gas- Lac+ | Ortega de L, 1985 |
| LCB238 | <i>metB-1 lacY-1 malA-1 rpsL-134 zch237::TnI0(Tc^R)</i> | Colecc. LCB |
| LCB239 | <i>metB-1 lacY-1 trpA-43 malA-1 rpsL-134 zch2-39::TnI0(Tc^R)</i> | Colecc. LCB |
| LCB426 | <i>thi-1 leu-6 suc-10 galT-27 rpsL-129 chlC-8</i> / ChI^R Nit- | Puig et al. 1969b |
| RK5265 | $\Delta(\text{argF lac})\text{lacU169 araD139 rpsL gyrA mon narG-202 TnI0} / \text{Tc}^R$ Nit- | V. Stewart |
| PK27 | Prototrofa | J. DeMoss |
| MC4100 | $\Delta(\text{arg Flac})\text{lacU169 araD-139 rpsL-150 relA-1 ptsF rbsR fibB}$ | Silhavy et al. 1984 |
| M120 | $\Delta(\text{lac pro}) \text{ilv met his trp gal rpsL } \lambda^R$ | Ortega de L |
| M121 | M120 <i>trp+ narC-8</i> / TNC+ Nit- | Ortega de L. |
| M128 | M120 <i>trp+ </i> $\Phi(\text{moa}::\text{lac})25$ / Gal+ Trp+ TNC+ Lac+ (termoestable) | Ortega de L. Nit- Gas- |
| M141 | M121 $\Phi(\text{moa}::\text{lac})25$ / Gal+ Gas- Lac- | Ortega de L. |
| JM1 | M120 <i>trp+ narC-78</i> / TNC- Nit- | Ortega L, Diaz 1995 |
| JM5 | JM1 $\Phi(\text{moa}::\text{lac})25$ / Gal+ Gas- Lac- | Ortega L, Diaz1995 |
| OEG285 | M121 pSJE100 / Ap^R | Este trabajo |
| OEG286 | JM1 pSJE100 / Ap^R | Este trabajo |
| OEG280 | M141 pSJE100 / Ap^R | Este trabajo |
| OEG281 | JM5 pSJE100 / Ap^R TNC- Nit+ Gas+ | Este trabajo |
| OEG309 | M141 pVA70 / Ap^R | Este trabajo |
| OEG310 | JM5 pVA70 / Ap^R | Este trabajo |
| OEG314 | OEG281 Plas-(espontánea)/ Ap^S TNC+ Nit- Gas- | Este trabajo |
| OEG326 | JM1 pVA70 / Ap^R TNC- Nit+ Gas+ | Este trabajo |
| OEG327 | M121 pVA70 / Ap^R TNC- Nit+ Gas+ | Este trabajo |
| OEG328 | LCB426 pFB71 / Ap^R TNC- Nit+ Gas+ | Este trabajo |
| OEG331 | MM78 pFB71 / Ap^R TNC- Nit+ Gas+ | Este trabajo |
| OEG333 | JM1 pFB71 / Ap^R TNC- Nit+ Gas+ | Este trabajo |
| OEG334 | M121 pFB71 / Ap^R TNC- Nit+ Gas+ | Este trabajo |
| LCB2044 | LCB333 [<i>thr-1 leu-6 thi-1 lacY-1 rpsL supE-44 tonA-21 (P/O narG-H)25 Tn5</i>]pVA70 / $\text{Kn}^R \text{ColB}^R$ Nit- Ap^R | Colecc. LCB |
| LCB2072 | LCB325 (prototrofa, Lac-) pFB71 / Cm^R | Colecc. LCB |
| SE5000 | MC4100 <i>recA</i> pSJE100 / $\text{Sm}^S \text{Nx}^R \text{Ap}^R$ | D. Boxer |
| Plásmidos | | |
| pVA70 | pJF119EH <i>narGHJI(Ptac PnarA)</i> lacI^O / Ap^R | V. Augier |
| pFB71 | pACYC184 <i>narG(PnarA)</i> / $\text{Cm}^R \text{Ap}^R$ | Colecc. LCB |
| pSJE100 | pUC9 <i>moaA-E(Ppmao)</i> / Ap^R | S. Hinton |
| Fagos | | |
| P1vir | | Colecc. OEG |

6. Ensayos enzimáticos. La actividad β galactosidasa (β Gal) se determinó siguiendo la hidrólisis del ONPG en células permeabilizadas (SDS+cloroformo) (Miller 1972), previamente tratadas con cloranfenicol (50 $\mu\text{g/ml}$) y mantenidas en frío. La actividad específica Glu-NRA se estimó cuantificando la reducción fisiológica del nitrato (Puig y Azoulay 1967) y la concentración de proteínas (Lowry et al. 1951). El valor obtenido (mmoles de nitritos/ml/mg proteínas) se utilizó para calcular el porcentaje de restauración Nit+, respecto a la cepa silvestre M120: 100 x (Actividad Glu-NRA/378).

Tabla 2. Restauración Nit+ mediada en *trans* por el operón *narC(narGHJI)* y el cistrón *narG*, respectivamente. Las cepas bacterianas LCB426 y MM78 son portadoras originales de las mutaciones bajo estudio. Las M121 y JM1 son derivados isogénicos de la M120 (Tabla 1). El porcentaje de restauración se calculó según Metodología (Ensayos enzimáticos).

| Cepa receptora | Restauración mediada por <i>narGHJI</i> (pVA70) | <i>narG</i> (pFB71) |
|------------------------|---|---------------------|
| <i>narG-78</i> (MM78) | 27% (OEG311) | 20% (OEG331) |
| <i>narG-78</i> (JM1) | 93% (OEG326) | 53% (OEG333) |
| <i>narG-8</i> (LCB426) | 50% (OEG312) | 40% (OEG328) |
| <i>narG-8</i> (M121) | 80% (OEG327) | 69% (OEG334) |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización genética, fisiológica e inmunológica de las mutaciones *narC-78* y *narC-8*.

Los operones *narXL narC(GHJI)* y el gen *narK* mapean en el minuto 27 del cromosoma de *E. coli* K12 (Stewart y MacGregor 1982, Stewart et al. 1989). Las mutaciones bajo estudio fueron clasificadas como *narC-8* (Puig et al. 1969b) y *narC-78* (Ball y Ortega de L. 1985), por conferir el fenotipo Nit- (Puig y Azoulay 1967), ser defectivas en la actividad BV-NRA y mostrar ligamiento con *trp* (Puig et al. 1969b, Stewart y MacGregor 1982, Bachmann 1990, Ortega de L. y Díaz 1995).

Preliminarmente se consideraron como posibles *narG-* (Ortega de L. y Díaz 1995), al comparar con el valor de actividad BV-NRA que caracteriza cada gen *nar* mutado (Stewart y MacGregor 1982).

La localización de las mutaciones *nar78* y *narC-8*, dentro del operón *narC(GHJI)*, fue corroborada mediante los análisis de dominancia en *trans* con el plásmido pVA70 (*narC+*). Se seleccionaron

merodiploides Amp^R y todos resultaron TNC-. La restauración Nit+ fue superior en los OEG326 y OEG327, derivados de las receptoras isogénicas (Tabla 2). Diferencias notorias, entre las mutaciones *narC*-, se observaron en los OEG311 y OEG312, derivados de las receptoras no isogénicas. El crecimiento con molibdeno favoreció la restauración, pero en este caso: (i) los valores máximos correspondieron a los merodiploides OEG311 (142%) y OEG312 (67%) y (ii) no hubo diferencias notorias entre los merodiploides OEG326 (32%) y OEG327 (25%).

La localización particular de las mutaciones, dentro del cistrón *narG*, se demostró primeramente a través de los análisis de dominancia en *trans* con el plásmido pFB71 (*narG*+). Todos los merodiploides Amp^R resultaron TNC- y los porcentajes de restauración Nit+ fueron inferiores a los obtenidos con el operón *narC*+ completo (Tabla 2). Un argumento a favor se obtuvo al evaluar, por inmunoelectroforesis, la presencia de la subunidad α de la apoNRA, codificada por el cistrón *narG* (Stewart y MacGregor 1982, Bachman 1990). Contrario a las cepas *narG*+ (Blasco et al. 1992), el reconocimiento de las fracciones soluble y membranal con el antisuero, fue ligeramente visible en la cepa haploide *narG*-8 y no detectable en la *narG*-78. Esto último, podría indicar un efecto particular de la mutación *narG*-78, bien sea por (i) disminución en la concentración intracelular de la subunidad α (biosíntesis deficiente o nula, mayor degradación proteolítica) o (ii) inactivación inmunológica (cambio de configuración o pérdida de los epítopes respectivos). El orden relativo de las mutaciones se determinó a través de mapeo por ligamiento. La cepa receptora (LCB239) presentaba el transposón Tn10 (Tc^R) entre *narC*+ y *trp*- (Tabla 1). Como se esperaba, todos los Trp+ que, resultaron TNC+, fueron Tc^S Nit-. Los porcentajes de cotransducción (Tabla 3) indicaron que (i) la mutación *narG*-78 (20%) está más próxima al inicio del operón *narC*(*GHJI*) y (ii) la *narG*-8 (29%) más distal (Fig. 1).

Tabla 3. Ligamiento de las mutaciones *narG* con el operón *trp*. Los fenotipos y genotipos fueron descritos (Tabla 1). Los TNC+ y TNC- fueron Nit- y Nit+, respectivamente. Se utilizó la cepa receptora LCB239 con el Tn10 insertado entre *narC*+ y *trp*- (TNC- Gas+ Tc^R Trp-).

| Cepa Donante | Marcador de selección | Porcentaje de cotransducción |
|---|-----------------------|--|
| Φ(<i>moa::lac</i>)25 <i>narG</i> -78 TNC+ Gas- Tc ^S Trp+ (JM5) | Trp+ | 20% TNC+ Gas+ Tc ^S (40/200) |
| Φ(<i>moa::lac</i>)25 <i>narG</i> -8 Gas- Tc ^S Trp+ (M141) | Trp+ | 29% TNC+ Gas+ Tc ^S TNC+ (57/200) |

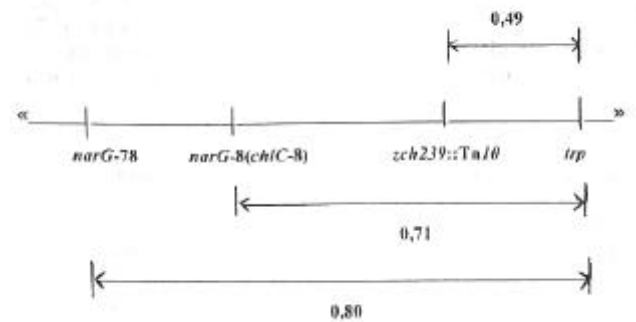


Fig. 1. Orden secuencial de las mutaciones *narG*. La posición relativa de las mutaciones sobre el cromosoma de *E. coli* K12 fue determinada por ligamiento con *trp* (Tabla 3). Las unidades del mapa se expresaron como: 100 - (% de cotransducción). La distancia del Tn10 al operón *trp* fue determinada por cotransducción en la cepa LCB109 (M.-C. Pascal, comunicación personal).

Efectos de las mutaciones *narG* sobre la expresión de la fusión F (*moa::lac*)25.

Las mutaciones bajo estudio, renombradas como *narG*-8 y *narG*-78 en el presente trabajo, ocasionan un bloqueo en la expresión de la fusión transcripcional Φ(*moa::lac*)25, evidenciado por la incapacidad de crecer y fermentar la lactosa, así como la ausencia de actividad enzimática βGal (Díaz y Ortega de L. 1988, 1992, Ortega de L. y Díaz 1995). El bloqueo transcripcional fue confirmado por inmunotransferencia, con antisuero βGal (Meza et al. 1995), así las mutaciones *narG* afectarían la activación del promotor *Pmoa*.

El papel regulador fue corroborado por transducción, utilizando cepas donantes con el Tn10 adyacente al operón *narC* (Tabla 1). El análisis de los clones Tc^R indicó que (i) con la recombinación sustitutiva de *narG*- por *narG*+ se perdía el fenotipo Lac+, pero (ii) la sustitución recíproca lo restauraba (Tabla 4).

Tabla 4. Expresión transcripcional de la fusión Φ(*moa::lac*)25 en presencia de los genotipos *narG*- y *narG*+, respectivamente. Los fenotipos y genotipos fueron descritos (Tabla 1). La RK5265 contiene un Tn10 ligado al operón *narC* (M-C Pascal, comunicación personal). Todos los transductantes Tc^R conservaron el fenotipo TNC+ (Nit-).

| Cruce Donante | Receptora | Marcador de Selección | Porcentaje de cotransducción |
|---|---|-----------------------|------------------------------|
| RK5265 <i>narG</i> - Tc ^R TNC+ | OM86 Φ(<i>moa::lac</i>) TNC- Gas- Lac+ Tc ^S | Tc ^R | 4% Lac- TNC+ Gas- (3/70) |
| LCB23 <i>NarG</i> + Tc ^R TNC+ | M141 <i>narG</i> -8 Φ(<i>moa::lac</i>) TNC- Gas- Lac- Tc ^S | Tc ^R | 9% Lac+ TNC+ Gas- (6/70) |

Efectos mediados por los operones silvestres *moa(A-E)* y *narGHJI*, en posición *trans*, sobre la expresión de la fusión $\Phi(moa::lac)25$.

Como hipótesis de trabajo, se propuso que los operones *narC* y *moa* participan en un circuito de control genético que regularía la expresión del operón *moa* (Ortega de L. y Díaz 1995).

Para evidenciar ese supuesto mecanismo, se realizaron estudios de dominancia en *trans* con los plásmidos pVA70 (*narGHJI*) y pSJE100 (*moa+*), respectivamente. Cepas receptoras, con la doble mutación $\Phi(moa::lac)25 narG-$, se utilizaron para obtener los merodiploides Ap^R. De cien clones ensayados en cada cruce, todos continuaron Lac⁻, por ser incapaces de crecer y fermentar el azúcar, durante una noche de crecimiento; además, cinco fueron valorados enzimáticamente y no se detectó β Gal. Como se esperaba, la presencia de la fusión $\Phi(moa::lac)25$ en los merodiploides, les confirió el fenotipo Gas⁻ (Tabla 1) e impidió la restauración Nit⁺ (Tabla 5), mediada por el operón *narGHJI* en *trans* (Tabla 2). Ese efecto pleiotrópico se debe a la ausencia de un MoCo requerido simultáneamente en la activación de la apoNRA y de otras apoenzimas como la FDH-H del sistema Formiato Hidrógeno Liasa (responsable de Gas⁺) (Puig y Zoulay 1967, Puig et al. 1969^a, Miller y Amy 1983, Johnson y Rajagopalan 1987a, b, Stewart 1988, Pitterle y Rajagopalan 1989, Santini et al. 1989, Giordano et al. 1990, Johnson et al. 1990, Lee et al. 1990, Santini et al. 1992, Rivers et al. 1993).

Tabla 5. Restauración Nit⁺ mediada en *trans* por los operones *narC(narGHJI)* y *moa(ABCDE)*, respectivamente. Los fenotipos y genotipos fueron descritos (Tabla 1). El porcentaje de restauración se calculó según Metodología (Ensayos enzimáticos). ND = no detectable.

| Plásmido | Receptora | Restauración Nit ⁺ |
|---------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| <i>narGHJI</i> (pVA70) | $\Phi(moa::lac)25 narG-8$ (M141) | ND (OEG309) |
| | $\Phi(moa::lac)25 narG-78$ (JM5) | ND (OEG310) |
| <i>moa</i> (pSJE100) | $\Phi(moa::lac)25 narG-8$ (M141) | ND (OEG280) |
| | $\Phi(moa::lac)25 narG-78$ (JM5) | 37% (OEG281) |
| | $\Phi(moa::lac)25$ (M128) | 100% (OEG270) |
| | <i>narG-8</i> (M121) | ND (OEG285) |
| | <i>narG-78</i> (JM1) | ND (OEG286) |

Sorprendentemente, se observó la restauración simultánea Gas⁺ Nit⁺ mediada por el operón *moa+*, siendo además alelo-específica *narG-78* y dependía de la fusión $\Phi(moa::lac)25$ (OEG281). El valor alcanzado para Nit⁺ fue sólo del 37% (Tabla 5) y no incrementó con molibdeno. La acción doblemente restauradora de *moa+* se corroboró al obtener derivados espontáneos Ap^S que, además perdieron (i) los fenotipos Nit⁺ Gas⁺ y (ii) el pSJE100.

Por lo tanto, los resultados obtenidos permitieron evidenciar un papel posiblemente regulador de *moa+* sobre la manifestación del fenotipo Nit⁺. La acción condicionante de la mutación doble *narG-78* $\Phi(moa::lac)25$, permite sugerir la participación de diferentes factores que se conjugan. Si bien las dos mutaciones *narG* bajo estudio, mapean dentro del cistron que codificada para la subunidad α de la apoNRA donde se une el MoCo), (i) la *narG-78* está más próxima al inicio del promotor *PnarC* y (ii) no se detectó reconocimiento inmunológico con el suero anti-subunidad α .

La acción conjugada de la mutación doble *narG-78* $\Phi(moa::lac)25$, en la restauración Nit⁺ Gas⁺ mediada por *moa+*, pudiera estar indicando la presencia de mutaciones compensadas. De ser cierta tal consideración, permite sugerir la formación de agregados hetero-oligoméricos (α -/Moa⁻) capaces de reconocer al MoCo (sintetizado en presencia de *moa+*) y, junto con las subunidades de la apoNRA, conformarían una NRA parcialmente activa. En una cepa haploide *moa+ narG-78* (JM1) (Tabla 5), se formarían agregados (α -/Moa⁺) incapaces de conformar una NRA activa (Nit⁻); tal agregación molecular pudiera ocasionar un cambio conformacional que explicaría el reconocimiento inmunológico no detectable con el suero anti-subunidad α .

Como modificaciones del modelo anterior, se proponen dos mecanismos basados en las consideraciones siguientes:

i. La subunidad α de la apoNRA estaría totalmente ausente y pudiera intercambiarse con aquella equivalente en la NRZ (Blasco et al. 1992). El hetero-oligómero contiene entonces la subunidad codificada por el cistron *narZ* (equivalente a *narG*). Las NR heterólogas son activas, pero más sensibles a la proteólisis (Blasco et al. 1992).

ii. El MoCo reprime la expresión transcripcional de los operones *narGHJI* (Pascal et al. 1982), *moa* (Baker y Boxer 1991) y *mod* (Maupin-Furflow et al. 1995), pero con la fusión $\Phi(moa::lac)25$ se disminuiría la biosíntesis del mismo. Entonces, la biosíntesis de la subunidad α incrementa y se favorece la formación de agregados homo (α -/ α -) y no hetero-oligoméricos.

CONCLUSIONES

1. Las mutaciones bajo estudio mapean dentro del mismo cistrón, pero la *narG-78* está más próxima al inicio del operón *narC(GHJI)* que la *narC-8*.
2. Las mutaciones variaron, con respecto a (i) los niveles de restauración Nit+, (ii) las influencias ejercidas por el molibdeno y el genotipo bacteriano; (iii) el reconocimiento inmunológico de la subunidad α de la NRA.
3. La acción en *trans* del operón *moa(A-E)+* (pSJE100) restauró Nit+ Gas+, específicamente en presencia de la mutación doble $\Phi(moa::lac)$ 25 *narG-78* (cepa OEG281).
4. El papel regulador transcripcional positivo del cistrón *narG+*, sobre la expresión de la fusión $\Phi(moa::lac)$ 25, fue comprobado mediante análisis por recombinación.

AGRADECIMIENTOS

Se le agradece al Dr. F. Blasco su amabilidad al suministrar los plásmidos pVA70 y pFB71, y a su equipo de investigación por el apoyo técnico en los ensayos de inmunolectroforesis (Laboratoire de Chimie Bactérienne, CNRS, Marseille, France). Al Dr. M. Chippaux por las cepas y comentarios (Laboratoire de Chimie Bactérienne, CNRS, Marseille, France). Al CDCHT (Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela) por el aporte financiero.

REFERENCIAS

Bachmann B. 1990. Linkage Map of *Escherichia coli* K-12. Edition 8. Microbiol. Rev. 54: 130-197.

Baker K, Boxer D. 1991. Regulation of the *chlA* locus of *Escherichia coli* K12: Involvement of the molybdenum cofactor. Mol. Microbiol. 5: 901-907.

Ball M, Ortega de L. M. 1985. Aislamiento y caracterización de mutantes de *Escherichia coli* K12 *chl::Tn10(Tet^R)*. Suplemento de Acta Científica Venezolana 36.

Berks B, Page D, Richardson D, Reilly A, Cavill A, Outen F, Ferguson S. 1995. Sequence analysis of subunits of the membrane-bound nitrate reductase from a denitrifying bacterium: the integral membrane subunit provides a prototype for the dihaem electron-carrying arm of a redox loop. Mol. Microbiol. 15: 319-331.

Blasco F, Iobbi C, Ratouchniak J, Bonnefoy V, Chippaux M. 1990. Nitrate reductase of *Escherichia coli*: sequence of the second nitrate reductase and comparison with that encoded by the *narGHJI* operon. Mol. Gen. Genet. 222: 104-111.

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, Burini J, Giordano G, Pascal MC, Chippaux M 1987. Presence in the "silent" terminus region of the *Escherichia coli* chromosome of cryptic gene(s)

encoding a new nitrate reductase. Mol. Microbiol. 1: 143-150.

Bonnefoy-Orth V, Lepelletier M, Pascal MC, Chippaux M. 1981. Nitrate reductase and cytochrome b-nitrate reductase structural genes as parts of the nitrate reductase operon. Mol. Gen. Genet. 181: 535 - 540.

Chiang R, Cavicchioli R, Gunsalus R. 1992. Identification and characterization of NarQ, a second nitrate sensor for nitrate dependent gene regulation in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 6: 1913-1923.

Chippaux M, Bonnefoy-Orth V, Ratouchniak 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.

Díaz J, Ortega de L M 1988. Efecto de una mutación *chlC* sobre la expresión del gen *chlA* de *Escherichia coli* K12, en una cepa de fusión *chlA::lac*. Suplemento de Acta Científica Venezolana 39.

Díaz J, Ortega de L M. 1989. Influencia del genotipo sobre la expresión de *chlA* de *Escherichia coli* en cepas de fusión *chlA::lac*. Suplemento de Acta Científica Venezolana 40.

Díaz J, Ortega de L M. 1992. Caracterización de una mutación *nar* que afecta la expresión de una fusión *chlA::lac* en *Escherichia coli* K12. Suplemento de Acta Científica Venezolana 43.

Edwards E, Rondeau S, DeMoss J. 1983. *chlC* (*nar*) Operon of *Escherichia coli* includes structural genes for and subunits of nitrate reductase. J. Bacteriol. 153: 1513-1520.

Fimmel A, Haddock B. 1979. Use of *chlC-lac* fusions to determine regulation of gene *chlC* in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 138: 726-730.

Giordano G, Boxer D, Pommier J. 1990. Molybdenum cofactor requirement for *in vitro* activation of apomolybdoenzymes of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 4: 645-650.

Glaser J, DeMoss J. 1972. Comparison of Nitrate Reductase mutants of *Escherichia coli* selected by alternative procedures. Mol. Gen. Genet. 116: 1-10.

Graham A, Jenkins H, Smith N, Mandrand-Berthelot M, Haddock B, Boxer D. 1980. The synthesis of formate dehydrogenase and nitrate reductase proteins in various *fdh* and *chl* mutants of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 7: 145-151.

Haddock BA, Jones C. 1977. Bacterial respiration. Bacteriol. Rev. 41: 47-99.

Inglede W, Poole R. 1984. The respiratory chains of *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 48: 222-271.

Iobbi N, Palmer T, Whitty P, McNairm E, Boxer D. 1995. The *mod* locus of *Escherichia coli* K-12 required for molybdenum cofactor biosynthesis is expressed at very low levels. Microbiol. 141: 1663-671.

Iobbi N, Santini C, Bonnefoy-Orth V, Giordano G. 1987. Biochemical and immunological evidence for a second nitrate reductase in *Escherichia coli* K-12. Eur. J. Biochem. 168: 451-459.

Iuchi S, Lin E. 1987. The *narL* gene product activates the nitrate reductase operon and represses the fumarate reductase and trimethylamine N-oxide reductase operons in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3901-3905.

- Johnson J, Bastian N, Rajagopalan K.** 1990. Molybdopterin guanine dinucleotide: a modified form of molybdopterin identified in the molybdenum cofactor of dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter denitrificans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 3190-3194.
- Johnson M, Rajagopalan K.** 1987a. *In vitro* system for molybdopterin synthesis. J. Bacteriol. 169: 110-116.
- Johnson M, Rajagopalan K.** 1987b. Involvement of *chlA*, *E*, *M*, and *N* loci in *Escherichia coli* molybdopterin synthesis. J. Bacteriol. 169: 117-125.
- Lee J, Wendt J, Shanmugan K.** 1990. Identification of a new gene *molR* essential for utilization of molybdate by *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 172: 2079-2087.
- Li J, Kustu S, Stewart V.** 1994. *In vitro* interaction of nitrate-responsive regulatory protein NarL with DNA target sequences in the *fdnG*, *narG*, *narK* and *frdA* operon control regions of *Escherichia coli* K-12. J. Mol. Biol. 241: 150-165.
- Li S, DeMoss J.** 1988. Location of sequences in the *nar* promoter of *Escherichia coli* required for regulation by *fnr* and *narL*. J. Biol. Chem. 263: 13700-13705.
- Lowry O, Rosenbrough N, Farr A, Randall R.** 1951. Protein determination with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Maupin-Furlow J, Rosentel J, Lee J, Deppenmeier U, Gunsalus R, Shanmugan K.** 1995. Genetic analysis of the *modABCD* (molybdate transport) operon of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 177: 4851-4856.
- Meza N, Ortega M, Rossi N.** 1995. Regulación fisiológica de la expresión genética del operón *moa* en *Escherichia coli* K12: Ensayos de actividad enzimática y de inmunotransferencia. Suplemento de Acta Científica Venezolana 46.
- Miller J.** 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.
- Miller J, Amy N.** 1983. Molybdenum cofactor in chlorate resistant and nitrate reductase-deficient insertion mutants of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 155: 793-801.
- Miller J, Scott D, Amy N.** 1987. Molybdenum-sensitive transcriptional regulation of the *chlD* locus of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 169: 1853-1860.
- Ortega de López M.** 1985. Regulación fisiológica de los genes *chl* de *Escherichia coli* K12, llevando mutaciones espontáneas y de fusión *chl::lac*. Trabajo de Ascenso Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.
- Ortega de L M.** 1994a. Control en nivel de transcripción de una fusión de operón *moa::lac* de *Escherichia coli* K12: Efectos de diferentes condiciones de cultivo y del operón *moa*. Acta Científica Venezolana 45 (Supl).
- Ortega de L M.** 1994b. Un método nuevo para aislar e identificar directamente mutantes Nit- de *Escherichia coli* K12. Jornadas Venezolanas de Microbiología. Mérida. Venezuela.
- Ortega de L M.** 1996. Efecto de la glucosa sobre la expresión aeróbica de una fusión de operón genómica *moa::lac* en *Escherichia coli* K12. MedULA 5: 1-4.
- Ortega de L M, Díaz J.** 1995. Caracterización de una mutación *nar* y su efecto sobre la expresión transcripcional de una fusión *moa::lac* en *Escherichia coli* K12. MedULA 4: 31-39.
- Pascal M-C, Burini J, Ratouchniak J, Chippaux M.** 1982. Regulation of the nitrate reductase operon effect of mutations in *chlA*, *B*, *D* and *E* genes. Mol. Gen. Genet. 188: 103-106.
- 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.
- Pitterle D, Rajagopalan K.** 1989. Two proteins encoded at the *chlA* locus constitute the converting factor of *Escherichia coli* *chlA1*. J. Bacteriol. 171: 3373-3378.
- Puig J, Azoulay E.** 1967. Etude génétique et biochimique des mutans resistant au ClO_3 (gènes *chlA*, *chlB*, *chlC*). C. R. Acad. Sci. (Paris) 264: 1916-1918.
- Puig J, Azoulay E, Gendre J, Richard E.** 1969a. Etude génétique des mutans de la région *chlA* chez l'*Escherichia coli* K-12. C. R. Acad. Sci. (Paris) 268: 183-184.
- Puig J, Azoulay E, Pichinoty F, Gendre J.** 1969b. Genetic mapping of the *chlC* gene of the nitrate reductase A system in *Escherichia coli* K12. Biochem. Biophys. Res. Comm. 35: 659-662.
- Rabin R, Stewart V.** 1992. Either of two functionally redundant sensor proteins, NarX and NarQ, is sufficient for nitrate regulation in *Escherichia coli* K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 8419-8423.
- Rivers S, McNairn E, Blasco F, Giordano G, Boxer D.** 1993. Molecular genetics analysis of the *moa* operon of *Escherichia coli* K-12 required for molybdenum cofactor biosynthesis. Mol. Microbiol. 8: 1071-1081.
- Rosentel J, Healy F, Maupin-Furlow J, Lee J, Shanmugan K.** 1995. Molybdate and regulation of *Mod* (molybdate transport), *fdhF* and *hyc* (formate hydrogenlyase) operons in *Escherichia coli* K12. J. Bacteriol. 177: 4857-4864.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T.** 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. Santini C, Iobbi-Nivol C, Romane C, Boxer D, Giordano G. 1992. Molybdoenzyme biosynthesis in *Escherichia coli*: *in vitro* activation of purified nitrate reductase from a *chlB* mutant. J. Bacteriol. 174: 7934-7940.
- Santini C, Karibian D, Vasishtha A, Boxer D, Giordano G.** 1989. *Escherichia coli* molybdoenzymes can be activated by protein FA from several gram-negative bacteria. J. Gen. Microbiol. 135: 3467-3475.
- Schroder I, Darie S.** 1993. Activation of the *Escherichia coli* nitrate reductase (*narGHJI*) operon by NarL and FNR requires integration host factor. J. Biol. Chem. 268: 771-774.
- Shanmugan K, Boxer D, Cole J, Chippaux M, DeMoss J, Giordano, G, Guest J, Gunsalus R, Lin ECC, Rajagopalan K, Stewart V.** 1992. Proposed nomenclature for the genes involved in molybdenum metabolism in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Mol. Microbiol. 6: 3452-3454.
- Sodergren E, DeMoss J.** 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.

Stewart V, MacGregor C. 1982. Nitrate reductase in *Escherichia coli* K12: involvement of *chlC*, *chlE* and *chlG* loci. J. Bacteriol. 151: 788-799.

Stewart V, Parales Jr J, Merkel S. 1989. Structure of genes *narL narX* of the *nar* (nitrate reductase) locus in *Escherichia coli* K12. J. Bacteriol. 171: 2229-2234.

Walker M, DeMoss J. 1993. Phosphorylation and dephosphorylation catalyzed in vitro by purified components of the nitrate sensing system, NarX and NarL. J. Biol. Chem. 268: 8391-8393.

Walker M, DeMoss J. 1994. NarL phosphate must bind to multiple upstream sites to activate transcription from the *narG* promoter of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 14: 633-641.

Wootton J, Nicholson R, Cock J, Walters D, Burke J, Doyle W, Bray R. 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.