

Tesis de Posgrado

Regulación de la multiplicación celular en escherichia coli por el AMP cíclico

De Robertis, Eduardo M.F.

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:

De Robertis, Eduardo M.F. (1974). Regulación de la multiplicación celular 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_1453_DeRobertis.pdf

Cita tipo Chicago:

De Robertis, Eduardo M.F. "Regulación de la multiplicación celular 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_1453_DeRobertis.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 DE LA MULTIPLICACION
CELULAR EN ESCHERICHIA COLI POR EL AMP CICLICO "

Autor: Eduardo M. F. De Robertis

Director: Dr. Héctor N. Torres

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones
Bioquímicas - Fundación
Campomar

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR
ORIENTACION QUIMICA BIOLOGICA

1 9 7 4

Rec. No. 1453
9.2.

A Ana y Ale

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Héctor N. Torres por su constante guía y el amplio apoyo que me ha brindado durante el desarrollo de esta investigación.

A los Dres. Luis F. Leloir y Carlos E. Cardini por haber hecho posible mi trabajo en el Instituto.

A mi amigo Norberto Judewicz, sin cuya colaboración muchos de los experimentos de esta tesis no hubieran sido posibles.

A los Dres. I. Pastan, J. Beckwith y J. Scaife por haber cedido generosamente las cepas de E.coli utilizadas en este trabajo.

A los Dres. M. M. Flawiá, M. T. Iñón y Pedro Ezcurrea, con quienes hemos discutido muchos de estos experimentos.

A mis compañeros de laboratorio P. Pucci, P. Leoni, E. Surian y A. Vallota.

A Margarita Mazzardi por su eficiente colaboración en la preparación del material estéril.

A todos los miembros del Instituto de Investigaciones Bioquímicas por contribuir a formar el estimulante medio ambiente que he tenido el privilegio de compartir.

INDICE

	<u>Página</u>
Abreviaturas	1
 <u>INTRODUCCION</u>	
- Consideraciones generales	2
- AMP cíclico en procariontes	6
- Reversión de la represión catabólica por el AMP cíclico	9
- Mecanismo molecular de acción del del AMP cíclico	12
- Otros efectos del AMP cíclico en bacterias	17
- El AMP cíclico como regulador del crecimiento celular en eucariotes	21
 <u>MATERIALES Y METODOS</u>	
- Materiales	26
- Métodos de cultivo	26
- Cepas de E.coli utilizadas	28
- Medio indicador de MacConkey	28
- Determinación de la actividad de β -galactosidasa	29
- Incorporación de uracilo y fenilalanina a la fracción TCA insoluble	30
- Determinación de la permeabilidad al uracilo	30

RESULTADOS

- Inhibición del crecimiento	33
- La síntesis de RNA estable y proteínas no es modificada	36
- Estudio de la viabilidad	40
- Estabilidad del AMP cíclico en los cultivos	42
- Reversibilidad de la inhibición del crecimiento	44
- Especificidad de la acción del AMP cíclico	46
- Concentración de AMP cíclico necesaria para inhibir el crecimiento	48
- Influencia del medio de cultivo	53
- El factor sexual no influencia el fenómeno	54
- Influencia de la fuente de carbono	55
- Experimentos de Diauxia	60
- Experimentos con mutantes deficientes en la proteína receptora del AMP cíclico	63
- Experimentos con mutantes que carecen del gen adenilato ciclasa	67
- Mutantes con la función de CAP independiente del AMP cíclico	76
- Caracterización de las mutantes independientes de AMP cíclico	80
- Experimentos de crecimiento con la mutante IIB 100	86
- Acción del AMP cíclico sobre la permeabilidad celular	90

INDICE (Cont.)

Página

DISCUSION

- La inhibición del crecimiento 95
- Posible efecto tóxico del AMP cíclico 96
- Activación e inhibición del crecimiento por el AMP cíclico 98
- El efecto del AMP cíclico en distintas fuentes de carbono 99
- Requerimiento de proteína receptora 101
- Mutaciones que imitan el efecto del AMP cíclico 102
- Algunas hipótesis de trabajo 103
- Otras interpretaciones 105
- Consideraciones finales 106

CONCLUSIONES 109

BIBLIOGRAFIA 112

ABREVIATURAS

ATP	Adenosina 5' trifosfato
ADP	Adenosina 5' difosfato
AMP	Adenosina 5' monofosfato
AMP cíclico	3', 5'-Adenosina monofosfato cíclico
cAMP	3', 5'-Adenosina monofosfato cíclico
CAP	proteína receptora del AMP cíclico o "Catabolite Activator Protein"
cap, crp	gen que codifica para la proteína receptora
cpm	cuentas por minuto
cya	gen que codifica la adenilato ciclasa
cya ^{del}	delección del gen cya
DNA	ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidad Optica
Hfr	"High frequency recombination"
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido
lac operon	operon lactosa
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
ONPG	o-nitrofenil- β -D-galactósido
RNA	ácido ribonucleico
TCA	ácido tricloroacético
tRNA	ácido ribonucleico de transferencia

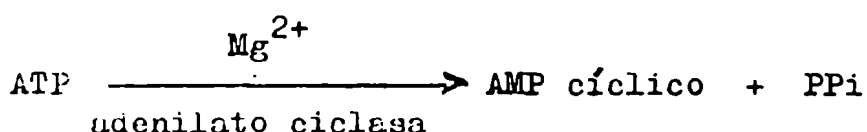
INTRODUCCION

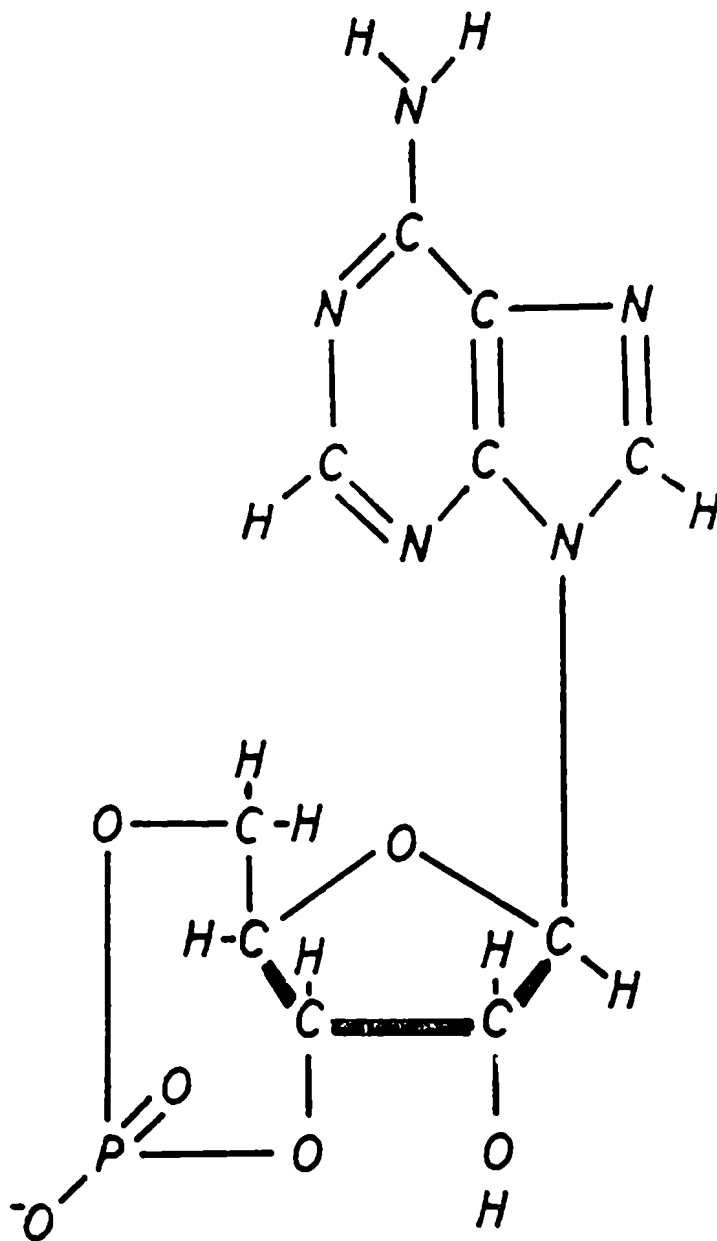
Consideraciones generales

El descubrimiento de la adenosina 3', 5' monofosfato cíclico, hecho por Earl W. Sutherland en 1956, introdujo en el conocimiento bioquímico uno de los compuestos más importantes en la regulación metabólica. En la actualidad se sabe que este compuesto modula una gran cantidad de procesos metabólicos, cuyo número se acrecienta permanentemente.

Originalmente el AMP cíclico se descubrió como un factor termoestable capaz de estimular la conversión de la fosforilasa de glucógeno b en su forma más activa, la fosforilasa a. La síntesis de este factor termoestable fue detectada en una preparación particulada de hígado y era estimulada por el agregado de adrenalina o glucagón (Rall, Sutherland y Berthet, 1957). Esta fue la primera demostración de un efecto hormonal en sistemas libres de células y abrió el camino para la elucidación del mecanismo molecular de la acción de las hormonas.

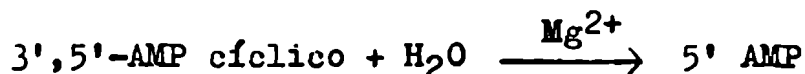
El AMP cíclico es sintetizado por la adenilato ciclasa, una enzima localizada en la membrana celular. El sustrato es el ATP, siendo la reacción:





3',5' ADENOSINA MONOFOSFATO CICLICO

La degradación del AMP cíclico es catalizado por fosfodiesterasas específicas que, a diferencia de la adenilato ciclasa, se encuentran tanto en forma particulada como soluble en el citoplasma (Sutherland y Rall, 1958). La reacción es:

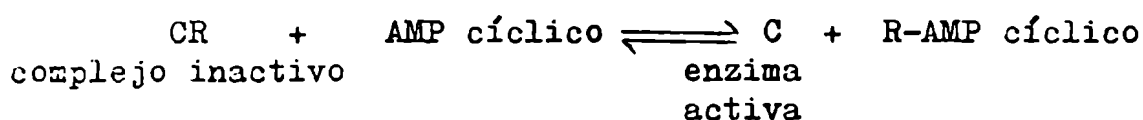


Dado que el AMP cíclico es un factor con funciones reguladoras tan versátiles, no es sorprendente que las células controlen cuidadosamente el nivel intracelular del mismo. Este control puede lograrse regulando la actividad de la fosfodiesterasa (Pastan, 1973).o, lo que es más frecuente, la actividad de la adenilato ciclasa (por revisión ver Rodbell, 1973). Esta enzima tiene una cinética de tipo alostérico y su actividad es modulada por numerosos efectores. La adenilato ciclasa es activada por muchas hormonas, entre ellas: adrenalina, noradrenalina, glucagon, hormona adrenocorticotrófica (ACTH), Tirotrofina (TSH), hormona melanocito estimulante (MSH), hormona paratiroidea, luteinizante (LH), vasopresina, tiroxina y prostaglandinas (Robison y col., 1971). La insulina es un inhibidor de esta enzima (Illiano y Cuatrecasas, 1972; Flawiá y Torres, 1973).

Basado en estos hechos, Sutherland elaboró un modelo que explica el mecanismo de acción hormonal. En el mismo, la hormona es considerada el primer mensajero, dado que transporta información desde el órgano endócrino hasta la célula. El primer mensajero interacciona con receptores

específicos localizados en la parte externa de la membrana celular, los cuales a su vez interaccionan con la adenilato ciclasa, modificando su actividad. En esta forma la hormona determina el nivel intracelular de AMP cíclico. Este nucleótido es considerado el segundo mensajero que lleva la información a la maquinaria interna de la célula. Su efecto dependerá de la naturaleza del órgano "blanco" ("target organ") de la hormona.

El mecanismo molecular de acción del "segundo mensajero" en eucariotes es bien conocido en algunos casos. Se ha demostrado que el AMP cíclico actúa activando a proteínas quinasas. Estas enzimas catalizan la fosforilación de proteínas, por ejemplo histonas, protaminas o de enzimas. La proteína quinasa tiene dos subunidades: una catalítica (C) y otra regulatoria (R), las cuales pueden disociarse en presencia de AMP cíclico pasando de un estado inactivo (complejo CR) a uno activo (C).



La fosforilación de diversas enzimas da lugar a drásticos cambios en su actividad catalítica. Por ejemplo, la fosforilación de la fosforilasa b quinasa da lugar a un dramático incremento en su actividad. A su vez, esta quinasa específica es capaz de convertir a la fosforilasa de glucógeno en su forma más activa. Por el contrario, la fosforilación de la glucógeno sintetasa, catalizada por la proteína quinasa, determina su inactivación.

Como resultado final de este proceso un incremento en la concentración intracelular de AMP cíclico determina un aumento de la degradación del glucógeno y una disminución de su síntesis. Si bien en eucariotes el efecto de AMP cíclico sobre la fosforilación de proteínas es de gran importancia regulatoria, en bacterias este mecanismo no parece ser relevante por el momento.

AMP cíclico en procariotes

En 1965 Makman y Sutherland demostraron la presencia de AMP cíclico en *E.coli*. Desde entonces se ha encontrado en muchas otras bacterias tales como *Salmonella typhimurim*, *Aerobacter aerogenes*, *Proteus inconstans*, *Hemophilus influenzae* (gram negativas) y *Brevibacterium liquefaciens* (gram positiva).

Makman y Sutherland observaron que los niveles intracelulares del nucleótido eran bajos cuando las células eran crecidas en presencia de glucosa como fuente de carbono. Por el contrario, cuando las bacterias eran resuspendidas en buffer fosfato, los niveles del nucleótido aumentaban 100-300 veces respecto de los correspondientes a los cultivos con glucosa. La concentración de AMP cíclico también estaba aumentada, aún cuando no tanto (unas 15 veces), en bacterias crecidas en acetato como fuente de carbono.

Como vemos, ya en el primer trabajo se vio que la glucosa era capaz de regular la concentración intracelular de AMP cíclico en *E.coli*.

Como se ha indicado, el nivel de AMP cíclico depende de la fuente de carbono en que ha sido cultivada la bacteria. Cuando el glicerol, el succinato o el acetato son usados como fuente de carbono, los niveles de AMP cíclico son 10 veces mayores que los de bacterias crecidas en glucosa (Pastan y Perlman, 1970; Peterkofsky y Gazdar, 1971). Como veremos más adelante, este fenómeno explica la represión catabólica permanente.

Recientemente Buettner y col. (1973) han estudiado exhaustivamente los niveles del nucleótido en diversas condiciones,

observando que cuanto más pobre es una fuente de carbono, es decir cuanto más lento es el crecimiento bacteriano, mayor es la concentración del AMP cíclico. En glucosa y en fase logarítmica esta es de $1.2 \times 10^{-5}M$, aumentando notablemente durante la fase estacionaria.

El nucleótido cíclico no sólo se encuentra dentro de las células sino que también se acumula en el medio de cultivo. Cuando se toman bacterias preincubadas en buffer fosfato, condición en la cual como ya dijimos la concentración del nucleótido es alta, y se les agrega glucosa, los niveles caen drásticamente y en 3 minutos llegan a un 7% del valor inicial. Concomitantemente aumenta la concentración extracelular, es decir que la bacteria es capaz de expulsar su AMP cíclico al medio (Makman y Sutherland, 1965; Buettner y col., 1973).

El mecanismo por el cual la glucosa regula el tenor de AMP cíclico está insuficientemente aclarado. Habrían tres posibilidades:

- a) Regulación a nivel de la síntesis. En preparaciones de membranas, la actividad de la adenilato ciclasa no es modificada por la adición de glucosa. No obstante, cuando la velocidad de síntesis del AMP cíclico es medida en células intactas y a tiempos muy cortos (Peterkofsky y Gazdar, 1973), dicha síntesis es inhibida por la glucosa. Esta diferencia en la velocidad de síntesis podría explicar el fenómeno de la represión catabólica permanente.

- b) Regulación a nivel de la degradación. Puede eliminarse como factor causal puesto que en mutantes deficientes en fosfodiesterasa igualmente se observa el efecto de las diversas fuentes de carbono (Buettner, 1973).
- c) La expulsión del AMP cíclico intracelular al medio de cultivo cuando se agrega glucosa podría explicar el fenómeno conocido como represión catabólica transitoria.

Reversión de la Represión Catabólica por el AMP cíclico

La demostración (Makman y Sutherland, 1965) de que la glucosa modificaba drásticamente los niveles de AMP cíclico llevó a Perlman y Pastan (1968) y a Ullman y Monod (1968) a pensar que este fenómeno podría explicar otro efecto de la glucosa conocido desde hacía mucho tiempo: la represión catabólica de la síntesis de enzimas inducibles.

Como puede observarse en la fig.21, cuando a un cultivo de E.coli crecido en glicerol se le agrega glucosa, la síntesis de β -galactosidasa se detiene durante un período de aproximadamente medio tiempo de generación. Este fenómeno se conoce como represión catabólica transitoria y es debido a la brusca caída de los niveles de AMP cíclico producida por la glucosa (L. Rothman y W. Epstein, comunicación personal). Posteriormente hay un escape, la velocidad de síntesis de la β -galactosidasa se incrementa pero no alcanza a un valor mayor de la mitad de la del cultivo crecido en glicerol (fig.21). Esto se conoce como represión catabólica permanente. Muchos operones inducibles están sujetos a este control (Magasanik, 1961; Mandelstram, 1962). La glucosa no es la única fuente de carbono capaz de inhibir la síntesis de enzimas inducibles; el piruvato, la glucosa-6-fosfato y el gluconato producen el mismo efecto, y en los dos últimos ejemplos la represión es aún más intensa (Magasanik, 1970).

El agregado de AMP cíclico mM en el medio de cultivo revierte totalmente la represión catabólica transitoria

(Perlman y Pastan, 1968) y a concentraciones del nucleótido del orden de 5mM desaparece también la represión permanente (Perlman y col., 1969).

El estudio de mutantes deficientes en la fosfodiesterasa aportó evidencias adicionales que señalaban la relación entre los niveles intracelulares de AMP cíclico y la síntesis de enzimas inducibles. Estas mutantes resultaron resistentes a la represión catabólica permanente (Monard y col., 1969, 1970).

El AMP cíclico es necesario para la síntesis de muchas enzimas inducibles. Esto fue demostrado por la obtención de mutantes deficientes en adenilato ciclasa. Estas mutantes se seleccionaron por su característica de no fermentar simultáneamente todos los azúcares cuya utilización requiere la expresión de operones inducibles por ejemplo maltosa, arabinosa y lactosa (Perlman y Pastan, 1969b; Schwartz y Beckwith, 1970). Esta mutación pleiotrópica se encuentra localizada en el minuto 75 del cromosoma de E.coli y determina que las bacterias sean incapaces de crecer en glicerol, lactosa, maltosa, arabinosa. Por el contrario dicha mutación no impide el crecimiento en glucosa como fuente de carbono, aún cuando este es más lento que el de la cepa salvaje. Además, el agregado de AMP cíclico a los cultivos de estas mutantes da lugar a la reversión fenotípica de todas las alteraciones.

Recientemente se ha aislado una mutante de coli que tiene una delección del gen que codifica la adenilato ciclasa (Brickman y col., 1973) y que ha sido utilizada en varios experimentos de esta tesis. Esta bacteria carece totalmente

de AMP cíclico. La viabilidad de esta cepa demuestra que el nucleótido no es esencial para la sobrevivencia de la bacteria, siendo su rol fundamentalmente regulatorio.

La represión catabólica le confiere a la bacteria un gran poder de adaptación. En su habitat natural, el intestino humano, E.coli se ve expuesta a muchos azúcares. Si por ejemplo hay lactosa y glucosa disponibles, los niveles de AMP cíclico serán bajos (por el efecto de la glucosa) y por lo tanto también será baja la síntesis de las enzimas necesarias para la utilización de la lactosa. De este modo, la bacteria consume primero la fuente de carbono más eficiente (glucosa). Cuando ésta se agota, la concentración intracelular del nucleótido aumenta y se sintetizan las enzimas del operon lactosa.

Tabla I

Sustancias que requieren AMP cíclico
para su utilización

- lactosa	- ribosa
- arabinosa	- xilosa
- maltosa	- glucósidos
- glicerol	- glucurónidos
- galactosa	- succinato
- ramosa	- acetato
- rannitol	- serina
- fucosa	- prolina
- melibiosa	- triptofano

Mecanismo molecular de acción del AMP cíclico

El efecto del AMP cíclico sobre la síntesis de las enzimas inducibles se produce a nivel de la transcripción del material genético (Perlman y col., 1968b; Jacquet y col., 1969; Varmus y col., 1970).

Más aún, su acción se produce sobre el promotor del lac operon, es decir sobre la iniciación de la síntesis del mRNA. Ciertas mutaciones del promotor del operon lactosa, hacen que éste se vuelva insensible a la represión catabólica y a los efectos del AMP cíclico (Silverstone y col., 1969, 1970, 1972; Pastan y Perlman, 1968). El promotor de un operon es el sitio del DNA al que se unen la RNA polimerasa para iniciar la transcripción (Ippen y col., 1968). Este locus genético es de gran importancia puesto que determina la velocidad máxima de transcripción de un operon (Miller, 1970).

La acción del AMP cíclico sobre la transcripción genética se produce a través de una proteína receptora del AMP cíclico (CRP), también llamada CAP ("catabolite activator protein").

Este receptor es una proteína básica de un peso molecular de 45.000 daltons, compuesta por dos subunidades idénticas. Es capaz de adsorber AMP cíclico con una gran afinidad (constante de disociación aparente $1-2 \times 10^{-6}$ M. Emerer y col., 1970). Esta unión es altamente específica y es inhibida competitivamente por el GMP cíclico. El factor CAP ha sido purificado a homogeneidad (Anderson y col., 1971, 1973). Cuando se une el AMP cíclico, la proteína sufre un cambio conformacional (Krakow y col., 1973) tal que le permite unirse al DNA (Riggs y col.,

1971; Nissley y col., 1972). Esta unión se produce específicamente a nivel de los promotores de operones inducibles (de Crombrughe y col., 1971; Beckwith y col., 1972).

Se han obtenido mutantes de *E. coli* que carecen de la proteína receptora del AMP cíclico (CAP). Fenotípicamente serían indistinguibles de las mutantes de adenilato ciclasa, sino fuera porque la adición de AMP cíclico no restituye la síntesis de enzimas inducibles (Emmer y col., 1970; Schwartz y col., 1970) y porque el locus genético afectado se encuentra localizado en el minuto 64 del cromosoma de *E. coli* (Epstein y col., 1971).

Beckwith y col. estudiaron un gran número de mutantes pleiotrópicas para la utilización de azúcares regulados por la represión catabólica. Estos autores aislaron 65 mutantes espontáneas incapaces de fermentar en placas de Arabinosa-Maltosa. Las mutaciones fueron ubicadas genéticamente utilizando bacteriófagos transductores (ϕ 80), portadores ya sea del gen adenilato ciclasa (cya^+) o del gen para la proteína CAP (crp^+). De las mismas, cuarenta resultaron mutantes de adenilato ciclasa (cya^-) y las 25 restantes fueron mutantes crp^- . El fracaso en detectar otros genes que participen en este mecanismo demuestra que en la represión catabólica sólo hay dos genes implicados cya (ciclasa) y crp (CAP).

El AMP cíclico estimula la síntesis in vitro de β -galactosidasa por extractos de *E. coli* libres de células (Zubay y col., 1970; Emmer y col., 1970). Esto se puede estudiar en un sistema de transcripción-traducción acoplada (DNA \longrightarrow \longrightarrow RNA \longrightarrow proteína), conocido comúnmente como sistema

de Zubay (Zubay y Chambers, 1969). El mismo contiene los 20 aminoácidos, los 4 ribonucleótidos trifosfatos, tRNA y un extracto crudo de E.coli (sobrenadante de 30.000g.) que contiene RNA polimerasa, ribosomas y factores de la síntesis de proteínas. Como templado se utiliza DNA de bacteriófagos temperados portadores del operon que interesa estudiar. Mientras que el operon lactosa representa sólo un 0,17% del DNA de coli, el del fago ϕ 80 d lac contiene un 15% de DNA de dicho operon.

En un sistema de este tipo, el agregado de AMP cíclico estimula más de 30 veces la síntesis de β -galactosidasa si se utilizan extractos de bacterias salvajes. No obstante, si el sobrenadante de 30.000g proviene de una mutante CAP⁻ no hay estimulación.

El efecto observado en el sistema de Zubay, podía ser debido a una estimulación de la transcripción o de la traducción. Para delimitar el nivel de acción, se estudió la transcripción in vitro de RNA mensajero específico del operon lactosa (de Crombrugge y col., 1971b) y del operon galactosa (Miller y col., 1971). En el primer caso, éste se puede hacer utilizando DNA de ϕ 80 d lac, RNA polimerasa y los 4 ribonucleósidos trifosfatos, y midiendo el RNA mensajero específico como el producto hibridizable con DNA de fago λ d lac (Arditti y col., 1970). Con estos experimentos se demostró que la síntesis de lac mRNA requiere el complejo CAP-AMP cíclico.

En la fig.1 se esquematiza el mecanismo de acción del AMP cíclico sobre la transcripción del operon lactosa. El

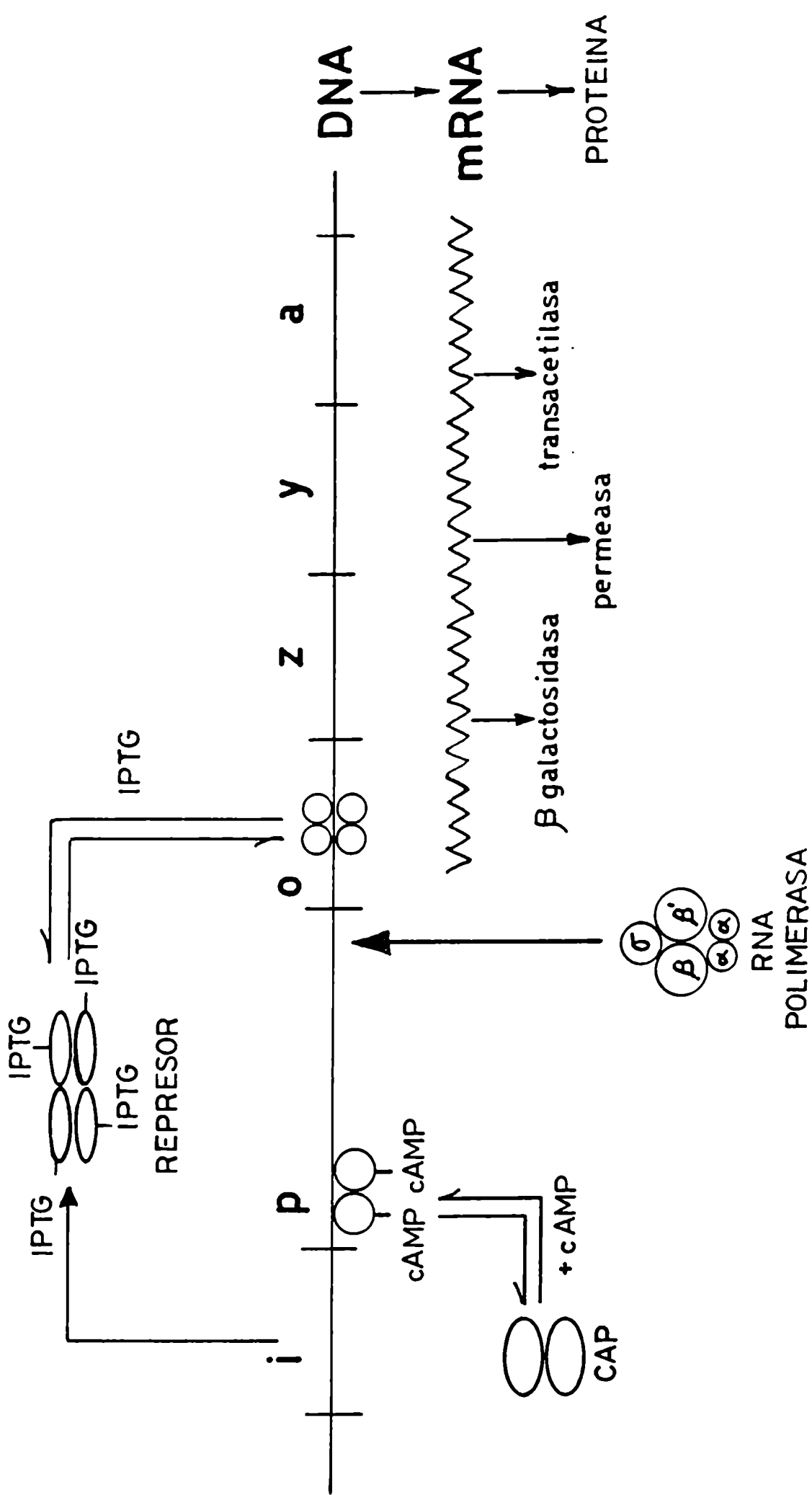
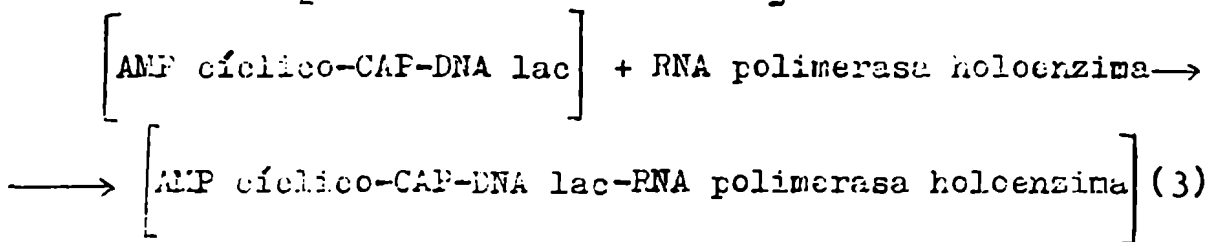
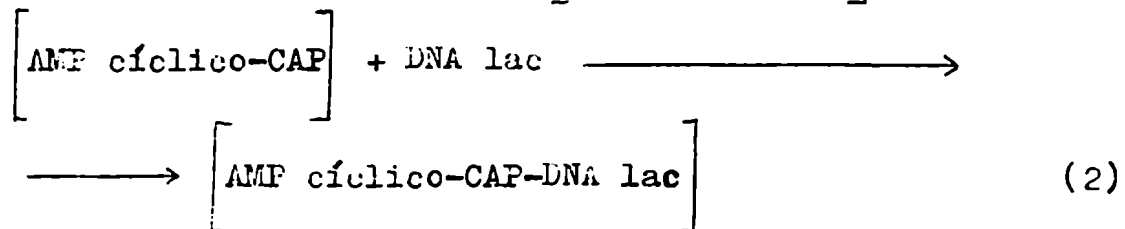
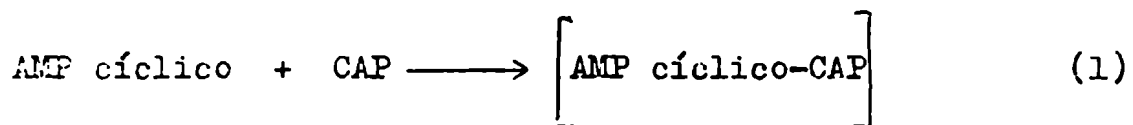


Fig. 1 Regulación del operon lactosa. El operon es regulado por dos mecanismos diferentes: uno negativo dado por la liberación repressor-opresor (o) y otro positivo determinado por la interacción del complejo CAP-cámbi para reconocer el promotor.

nucleótido (cuya concentración intracelular depende de la fuente de carbono) se une a la proteína receptora que se encuentra soluble en el citoplasma. El complejo CAP-AMP cíclico se une a su vez a un sitio específico del promotor (p). Para reconocer el promotor, la RNA polimerasa requiere la presencia de este complejo unido al DNA.

La serie de reacciones necesarias para iniciar la transcripción del lac operon sería:



Este es un mecanismo de control positivo que regula la transcripción de los operones inducibles. No debemos olvidar que éstos están sujetos además a un mecanismo de control negativo. (Jacob y Monod, 1961), dado por la interacción operador-represor. Cada operon tiene su propio gen regulador que codifica para una proteína específica: el represor. El operador es la secuencia de DNA a la cual se une específicamente el represor, y está estrechamente ligado a los genes estructurales.

Cuando el represor ocupa el operador, la RNA polimerasa no puede iniciar la transcripción. En el caso del operon lactosa, en ausencia del inductor (lactosa o isopropil-tiogalactósido) no habrá síntesis de las enzimas correspondientes a los genes estructurales (β -galactosidasa, β -galactósido permeasa y transacetilasa), aunque el complejo CAP-AMP cíclico esté unido al promotor (fig.1). En cambio, cuando se agrega el inductor, éste se une a sitios específicos del represor, produciéndole un cambio conformacional que hace que pierda su afinidad por el operador. En este momento la RNA polimerasa podrá iniciar la transcripción (si es que tiene complejo CAP-AMP cíclico unido al promotor). Como vemos, cuando en una célula aumenta el AMP cíclico no se sintetizan necesariamente todas las enzimas que requieren el nucleótido para su expresión, puesto que cada operon tiene un mecanismo de control propio y específico además del mecanismo de control positivo generalizado dado por el complejo CAP-AMP cíclico. En la fig.2 se esquematiza el doble control de estos operones.

Otros efectos del AMP cíclico en bacterias

En procariotes, además de la represión catabólica, el AMP cíclico controla muchos otros fenómenos metabólicos.

El nucleótido agregado al medio de cultivo en altas concentraciones (5-10mM) es capaz de eliminar el período de retardo en el crecimiento diauxico (Ullman y Monod, 1968).

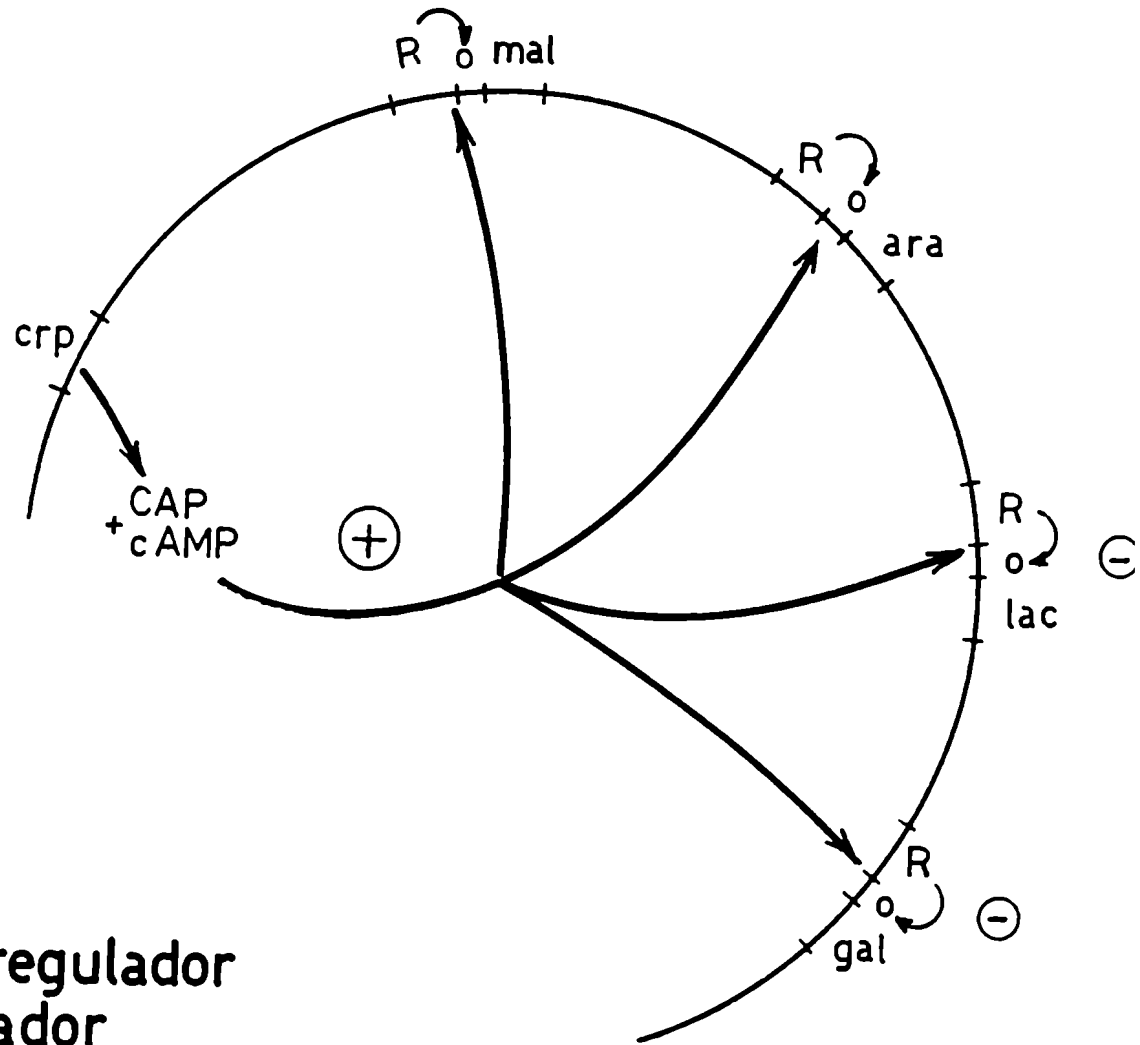


Fig. 2 Control dual de los operones inducibles. Cada operon tiene una regulación propia dada por la interacción represor-operador (o). Todos ellos están sujetos además a un control positivo inespecífico, mediado por la interacción CAP-cAMP-promotor.

El fenómeno de la diauxia se observa cuando *E.coli* es crecida con dos fuentes de carbono de desigual valor energético. Si por ejemplo se utilizan glucosa y lactosa (ver fig.13), el crecimiento se hace en dos fases; primero se consume totalmente la glucosa (fase de crecimiento rápido) y luego crece más lentamente con la velocidad correspondiente a la lactosa; entre ambas fases hay una detención transitoria del crecimiento, o "lag" de la diauxia (Monod, 1947).

El AMP cíclico es capaz de estimular a nivel transcripcional la síntesis de múltiples enzimas (ver tabla 1). El único caso conocido en que el nucleótido inhibe la síntesis de enzimas es el de la glutamato sintetasa y la glutaminasa A de *E.coli* (Prusiner y col., 1972).

Por otro lado, el complejo CAP-AMP cíclico es necesario para que los bacteriófagos temperados entren en el ciclo lisogénico. El complejo es requerido para la síntesis del represor del bacteriófago. Por lo tanto, si los niveles del AMP cíclico de la bacteria son bajos, no se sintetiza el represor y el virus temperado entra en su ciclo lítico, multiplicándose y finalmente destruyendo al huésped (Hong y col., 1971; Grodzicker y col., 1972).

En otras bacterias distintas de *E.coli* también se han descrito efectos del AMP cíclico. Tal es el caso del *Haemophilus influenzae* cuya competencia para la transformación genética por DNA exógeno aumenta 10.000 veces por el agregado del nucleótido (Wise y col., 1973). Además, en *Salmonella typhimurium* la síntesis de la proteína flagelar requiere el

cómp'plejo CAP-AMP cíclico (Yokota y Gots, 1970). Esta sería la razón por la cual las bacterias no forman flagelos cuando crecen en glucosa. Un efecto similar sobre la formación de los flagelos también se ha observado en E.coli.

Como hemos visto, el AMP cíclico regula múltiples y muy diversos procesos del metabolismo bacteriano. Se estima que controla la expresión de unos 100-200 genes, sobre un total de 3000 del genoma de E.coli. No obstante, ninguna de estas funciones es esencial para la sobrevivencia cuando la bacteria cuenta con glucosa como fuente de carbono. El AMP cíclico en las bacterias, al igual que en los eucariotes, controla procesos especializados que, aunque dispensables, le permiten a la célula una mejor adaptación al medio ambiente.

El AMP cíclico como regulador del crecimiento
celular en eucariotes

La morfología y la multiplicación celular de los fibroblastos en cultivo están bajo el control de los niveles intracelulares de AMP cíclico. Diversas evidencias han llevado a esta conclusión.

Una de las observaciones fundamentales fue la realizada en 1968 por Bürk, quien demostró que la adición de teofilina y cafeína (inhibidores de la fosfodiesterasa) es capaz de inhibir el crecimiento de fibroblastos normales y transformados. Coincidentemente, observó que las células transformadas por virus de polioma poseen una actividad de adenilato ciclasa considerablemente más baja que la correspondiente a las células no transformadas.

Sobre la base de esta observación otros grupos de trabajo demostraron independientemente que el agregado de dibutiril AMP cíclico al medio de cultivo modifica la morfología de las células tumorales, las que toman un aspecto fibroblástico normal (Hsie y Puck, 1971; Johnson y col., 1971). Paralelamente al cambio morfológico el dibutiril AMP cíclico incrementa la adhesividad de las células (Johnson y col., 1972) e inhibe la motilidad (Johnson y col., 1972b). Simultáneamente, las células transformadas recuperan la inhibición del crecimiento dependiente de la densidad (inhibición por contacto) (Sheppard, 1971).

El agregado de dibutiril AMP cíclico inhibe la velocidad de crecimiento de los fibroblastos normales y transforma

dos (Otten y col., 1972). Un efecto similar se ha obtenido con la adición de prostaglandina E₁ que actúa estimulando la actividad de la adenilato ciclase (Johnson y col., 1971b; Sheppard, 1972).

Sobre esta línea de razonamiento es de suponer que si un incremento del nivel intracelular de AMP cíclico determina una inhibición del crecimiento y la "estabilización" de la morfología normal de las células, el descenso de dicho nivel debería estimular la multiplicación celular e inducir el fenómeno de transformación. Tal razonamiento es avalado por las evidencias experimentales. Es así que aquellos tratamientos que disminuyen los niveles intracelulares de AMP cíclicos como la adición de suero fresco, el tratamiento con enzimas proteolíticas (Otten y col., 1972) o la adición de insulina incrementan la velocidad de multiplicación celular y, en el caso de la insulina, favorecen el estado transformado (Jiménez de Asúa y col., 1973).

Evidencia adicional de la función del AMP cíclico como regulador de la multiplicación celular en eucariotes ha sido obtenida midiendo la concentración intracelular del nucleótido. En todas las situaciones exploradas la velocidad de crecimiento de los cultivos es inversamente proporcional al nivel del nucleótido (Otten y col., 1971). Más aún, cuando un cultivo de fibroblastos normales llega a confluencia, y se detiene el crecimiento, los niveles de AMP cíclico aumentan notoriamente.

En la transformación celular por infección con virus oncogénicos el descenso en los niveles de AMP cíclico es el

fenómeno más precoz, y precede a los cambios morfológicos y al aumento de la multiplicación celular (Otten y col., 1972b; Pastan, 1973). Este descenso se explica por una rápida inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa, probablemente debida a cambios en la membrana celular (Anderson y col., 1973).

Una demostración inequívoca de la relación causa-efecto entre los niveles de AMP cíclico y los cambios celulares ha sido obtenida recientemente por Willingham y col. (1973). Ellos aislaron mutantes de células 3T3, termosensibles para el metabolismo del AMP cíclico. Al pasar a la temperatura no permisiva, los niveles intracelulares del nucleótido disminuyen, y la célula se comporta morfológicamente como una célula transformada.

Si bien está ampliamente aceptado que el AMP cíclico regula el crecimiento en células superiores, el mecanismo molecular de este control es desconocido. Una posibilidad sería que el sitio de control estuviera a nivel de la membrana celular. En efecto, el AMP cíclico produce una inhibición del transporte de muchos metabolitos de bajo peso molecular, lo que podría limitar el crecimiento celular (Holley, 1972; Kram y col., 1973).

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que la regulación del crecimiento por el AMP cíclico es un fenómeno muy difundido en la escala zoológica, no sólo restringido a las células eucarióticas, sino que también afecta a los organismos bacterianos. De hecho, ésta es una observación muy afortunada, pues permite contar con sistemas biológicos muy simples que facilitan enormemente el estudio del mecanismo de acción del nucleótido sobre el crecimiento celular.

MATERIALES Y METODOS

- Materiales
- Métodos de cultivo
- Cepas de E.coli utilizadas
- Medio indicador de MacConkey
- Determinación de la actividad de β -galactosidasa
- Incorporación de uracilo y fenilalamina a la fracción TCA insoluble
- Determinación de la permeabilidad al uracilo

Tabla II

Cepas de E. coli K₁₂ utilizadas

Cepa	Genotipo	Obtenidas de
E. coli Hfr 3000	Hfr H B ₁ ⁻	I. D. Algranatti
AB253	F ⁻ threo ⁻ leu ⁻ lacZ str ^r B ₁ ⁻	Adelberg
AB284	F ⁺ threo ⁻ leu ⁻ lacZ str ^r B ₁ ⁻	Adelberg
AB311	Hfr threo ⁻ leu ⁻ lacZ str ^r B ₁ ⁻	Adelberg
PF6 = Hfr 1100	Hfr B ₁ ⁻	Ira Pastan
PF47	Hfr crp ⁻ B ₁ ⁻	Ira Pastan
CA8000	HfrH B ₁ ⁻	John Scaife
CA8306	HfrH cya ^{del} B ₁ ⁻	Jon Beckwith
IIB 100	HfrH cya ^{del} crp ^s B ₁ ⁻	Instituto Investiga- ciones Bioquímicas
IIB 101	HfrH cya ^{del} crp ^s B ₁ ⁻	Instituto Investiga- ciones Bioquímicas
IIB 102	Hfr cya ^{del} crp ^s B ₁ ⁻	Instituto Investiga- ciones Bioquímicas

MATERIALES

Los distintos materiales se obtuvieron de los siguientes laboratorios: AMP cíclico, AMP, ADP, ATP, adenosina, N⁶, 2'-O-dibutiril AMP cíclico, uracilo, maltosa, lactosa, Isopropil- β -D-tiogalactósido y o-nitrofenil- β -D-galactósido, de Sigma.

El uracilo ³H (1000mCi/mM, 1mCi/ml), la leucina ¹⁴C (0.1mCi/ml, 0.4u, 0.4uM/ml) y el Omnifluor, de New England Nuclear. La glucosa y el glicerol de Mallinkrodt, el succinato de Aldrich y el Malato de Schuchardt. Los casaminoácidos libres de vitaminas, extracto de levadura, peptona, proteosa peptona, sales biliares, arabinosa y Bacto agar, de Difco. Los filtros de nitrocelulosa (Selectron, 0,45 μ de poro) de Schleicher y Schuell.

METODOS DE CULTIVO

En la mayor parte de los casos, los cultivos se realizaron en medio mínimo A (Makman y Sutherland, 1965) que contiene por litro:

K ₂ HPO ₄	14	gr.
K H ₂ PO ₄	6	"
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	"
MgSO ₄	0.2	"

Este medio se suplementó con 2µg/ml de tiamina, puesto que todas las cepas de E.coli usadas comúnmente en genética bacteriana derivan de la E.coli K₁₂ de la colección de Lederberg y Tatum, que tiene como único requerimiento la vitamina B₁.

Las distintas fuentes de carbono se esterilizaron por separado como soluciones concentradas (1M). La glucosa, succinato, malato o piruvato se utilizaron a una concentración final de 25 o 50mM. El glicerol se utilizó a una concentración de 0,5% (68mM). En algunas ocasiones el medio mínimo fue suplementado con casaminoácidos libres de vitaminas 0.1%.

Para los experimentos de crecimiento siempre se utilizó como inóculo cultivos frescos (una noche a 30°, sin agitación) crecidos en medio mínimo con la fuente de carbono correspondiente. Al día siguiente, los inóculos se diluyeron hasta aproximadamente 1.5×10^7 células/ml con medio fresco, luego de lo cual se dividió la suspensión bacteriana en varios cultivos idénticos, efectuándose los agregados indicados en cada caso antes de comenzar la incubación. Esta se realizó a 36°C en un baño termostatzado Gallenkamp con una agitación de 100 ciclos por minuto.

El crecimiento celular se midió en general como el incremento en densidad óptica a 560mµ en un espectofotómetro Gilford modelo 2000. Cuando además se determinó el número de bacterias viables, éstas se diluyeron 10^5 veces en medio mínimo, extendiéndose 0.1ml en placas de agar nutriente LB, preparadas según Miller (1972).

Todos los medios, pipetas y material de vidrio fueron esterilizados en el autoclave 20 minutos a 1.3 atmósferas.

Cepas de E.coli utilizadas

La tabla II indica el genotipo y el origen de todas las mutantes de E.coli K₁₂ utilizadas en este trabajo.

Las cepas fueron conservadas en forma de picaduras en un medio que contiene por litro: Difco nutrient broth 10b, NaCl 5g y Bacto agar 6g. Para los cultivos en medio líquido, en todos los casos se utilizaron colonias aisladas obtenidas de placas de agar nutriente o agar MacConkey.

Medio indicador de MacConkey

Este medio fue utilizado para controlar la pureza de las cepas cap⁻ y cya⁻, así como para seleccionar la mutante IIB 100. Este medio es selectivo para bacterias coliformes, por tener sales biliares, e indicador de fermentación por contener rojo neutro. Las colonias que fermentan tienen color rojo, las que no lo hacen son blancas (fig.14). Por litro de solución contiene:

peptona	17	g.
proteosa peptona	3	"
Sales biliares (Difco)	1.5	"
NaCl	5	"
Agar	14	"
Rojo Neutro	0.03	"
Cristal violeta	0.001	"

La solución final debe quedar a pH 7.2. Luego de esterilizado se le agregan los distintos azúcares (lactosa, maltosa o arabinosa) a una concentración final de 2% y se vuelca en placas de Petri estériles.

Determinación de la actividad de β -galactosidasa

La actividad de β -galactosidasa se determinó por el método de Wallenfels (1962). Esta enzima se midió como un indicador del grado de represión catabólica de los cultivos, el cual a su vez depende de la cantidad de AMP cíclico intracelular.

En general se utilizaron cultivos creciendo en fase logarítmica entre 0.1 y 0.2 de densidad óptica a 560m μ , a los que se les agregó el inductor Isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) a una concentración final de 0.5-mM. A intervalos variables se tomaron alícuotas de 0,5ml de los cultivos, que fueron tratados con tolueno 15' a 4°C para permeabilizar las células.

Como sustrato se utilizó el o-nitrofenil β -D-galactósido (ONPG) y como buffer el fosfato pH 6.8, 30mM final. En general se incubó la enzima 15 minutos a 30°C, luego de lo cual se midió la Absorbancia a 405m μ en un espectofotómetro Coleman modelo 6/2C. Los resultados se expresan en unidades enzimáticas, la que se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μ g de ONPG en 15 minutos a 30°C.

Incorporación de uracilo y fenilalanina a la fracción TCA insoluble

Para medir la incorporación a tiempos largos (fig.4) se agregó cultivos de E.coli uracilo ^3H ($1\mu\text{C/ml}$, $0,1\text{mM}$ final) o fenilalanina ^3H ($40\mu\text{C/ml}$, $0,05\text{mM}$ final). Luego de cultivados varias horas a 37°C , se tomaron alícuotas de 0.1 ml y se depositaron sobre fragmentos de papel Whatman 3MM pretratado con TCA (embebidos en TCA 20% durante dos horas y luego secados a 60°C). Una vez absorbida la muestra, los papeles se lavaron según el método de Byfield y col. (1966). Luego de secados bajo una lámpara infrarroja, se midió la radioactividad en una solución de tolueno-Omnifluor (4%) con un contador de centelleo líquido Packard Tri-carb 574 con una eficiencia del 20% .

Determinación de la permeabilidad al uracilo

Se tomaron alícuotas de $100\mu\text{l}$ de cultivos de E.coli crecidos en ausencia o presencia de AMP cíclico 5mM , las que fueron incubadas con uracilo ^3H ($7\mu\text{M}$, 27.000cpm/n mol , volumen final $0,115\text{ml}$) a 37°C durante tiempos variables. La reacción se detuvo con 4 ml de medio mínimo frío, filtrándose rápidamente a través de filtros de nitrocelulosa $0,45\mu$, lavando dos veces con igual volumen de medio A. Toda la operación no lleva más de 7 segundos . Con este procedimiento se obtiene una medida de la incorporación total del nucleótido a las células.

Paralelamente, otra serie idéntica de tubos se precipitó con TCA 5% y se filtró a través de nitrocelulosa. La

radiactividad se midió en la forma descrita en el párrafo anterior.

La incorporación de uracilo en la fracción soluble ("pool soluble") se obtiene como la diferencia entre la radioactividad total incorporada (células filtradas con medio de cultivo) y la radioactividad insoluble en ácido tricloroacético.

RESULTADOS

- Inhibición del crecimiento
- La síntesis de RNA estable y proteínas no es modificada
- Estudio de la viabilidad
- Estabilidad del AMP cíclico en los cultivos
- Reversibilidad de la acción del AMP cíclico
- Concentración de AMP cíclico necesaria para inhibir el crecimiento
- Influencia del medio de cultivo
- El factor sexual no influencia el fenómeno
- Influencia de la fuente de carbono
- Experimentos de diauxia
- Experimentos con mutantes deficientes en la proteína receptora del AMP cíclico
- Experimentos con mutantes que carecen del gen adenilato ciclasa
- Mutantes con la función de CAP independiente de AMP cíclico
- Experimentos de crecimiento con la mutante IIB 100
- Acción del AMP cíclico sobre la permeabilidad celular

RESULTADOS

Inhibición del crecimiento

En el curso de una investigación sobre la biosíntesis de RNA estable en bacterias, se decidió examinar la posibilidad de que el AMP cíclico regulara la síntesis de RNA ribosomal. Para ello se hicieron experimentos de incorporación de uracilo ^3H , y como control se siguió la curva de crecimiento de los cultivos. Inesperadamente, el AMP cíclico resultó ser un poderoso inhibidor del crecimiento bacteriano y, como veremos más adelante, no modifica la síntesis de RNA estable.

Se utilizó la cepa de E.coli Hfr 3000. Se trata de una bacteria protótrofa, cuyo único requerimiento, al igual que todas las cepas derivadas de la Escherichia coli K₁₂ de la colección original de Lederberg y Tatum, es la vitamina B₁. Se creció un inóculo en medio mínimo de sales con el agregado de 0,5% de glicerol. Al día siguiente, se diluyó hasta una densidad de 1.5×10^7 células/ml en medio mínimo y se dividió en 4 cultivos. En 2 de ellos se empleó glucosa 50mM como fuente de carbono, y en los restantes se utilizó glicerol. Al comenzar el experimento, a dos cultivos se les agregó AMP cíclico a una concentración final de 5mM.

Los cuatro cultivos se incubaron a 37° con agitación, y cada veinte minutos se retiraron muestras que fueron leídas con el espectrofotómetro a 560m μ , a efectos de seguir el crecimiento.

La fig.3 muestra los resultados de este experimento. En los cultivos crecidos con glucosa el crecimiento era notablemente inhibido por el agregado de AMP cíclico. Los tiempos de generación eran de 65 minutos y de 88 minutos respectivamente.

En otros experimentos hemos visto que lo más frecuente es que en medio mínimo de sales y glucosa, la cepa Hfr 3000 crezca con un tiempo de duplicación de 60 minutos y con 90 minutos si se le adiciona AMP cíclico 5mM. Es decir que la inhibición de la velocidad de crecimiento es muy importante, del orden del 50% aproximadamente.

Otro hecho que puede observarse en la fig.3 es que la inhibición del crecimiento no es inmediata. En efecto, hasta los 80 minutos no se observan diferencias entre los dos cultivos crecidos con glucosa como fuente de carbono.

Este período de latencia en la aparición del efecto sobre el crecimiento es variable, y oscila entre 1 y 2 generaciones. Tal vez sea por la existencia de este retardo que el fenómeno no fue observado anteriormente. La mayor parte de los autores estaban interesados en la represión catabólica y por lo tanto los cultivos eran seguidos durante un período de tiempo corto luego de agregar AMP cíclico.

En los cultivos crecidos con glicerol como fuente de carbono, el agregado de AMP cíclico no modifica la velocidad de crecimiento. Este hecho será analizado pormenorizadamente más adelante, pero de todos modos es un índice de que el agregado del nucleótido probablemente no ejerce un efecto tóxico inespecífico sobre los cultivos.

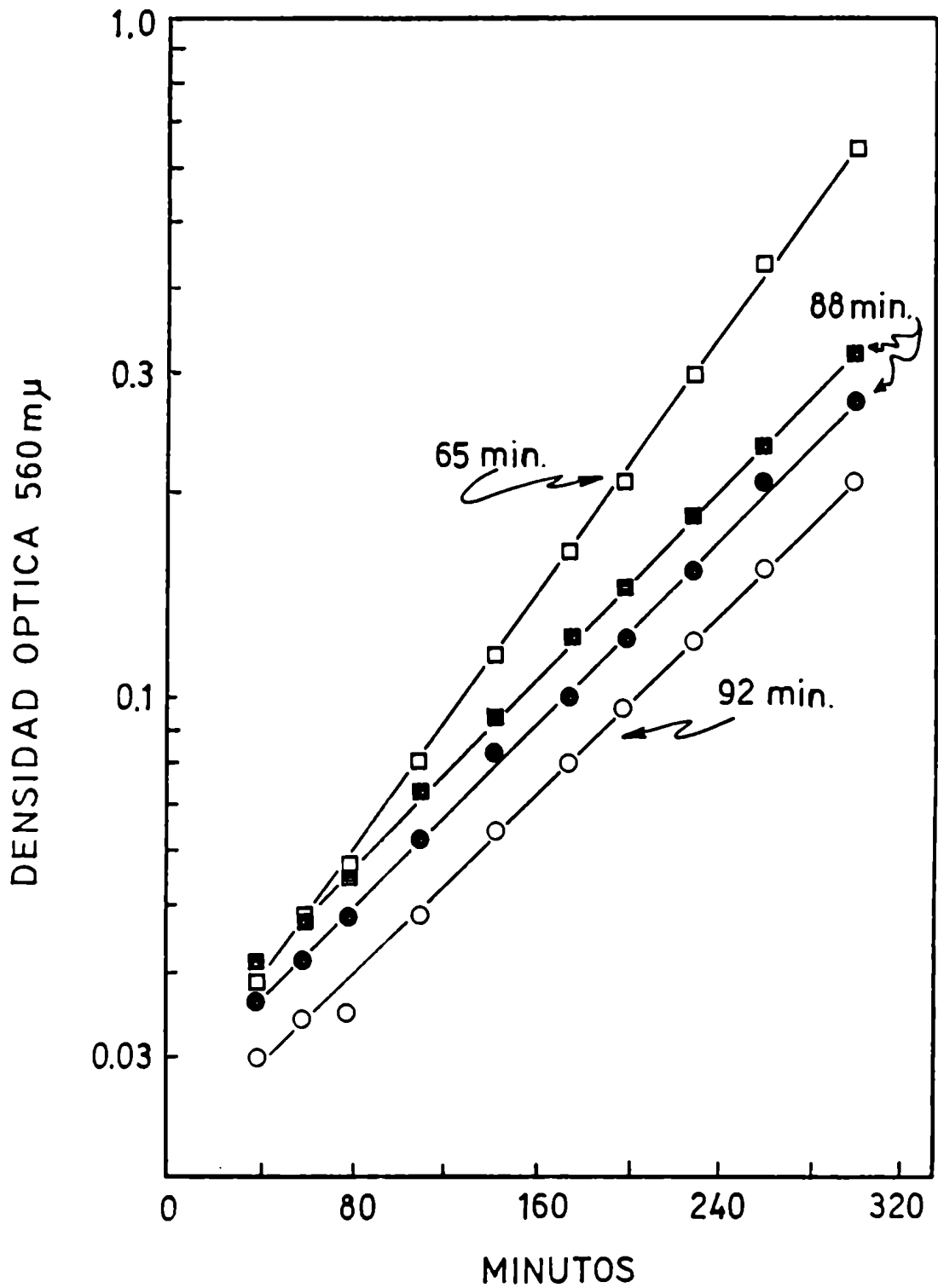


Fig. 3 Efecto del AMP cíclico sobre el crecimiento de *E. coli* Hfr 3000. Los cultivos se realizaron en glucosa conteniendo (■) o no (□) AMP cíclico 5mM, o en glicerol conteniendo (●) o no (○) 5mM AMP cíclico.

La síntesis de RNA estable y de proteínas
no es modificada

Como hemos dicho en el párrafo anterior, también se estudió la síntesis de RNA estable en E.coli Hfr 3000. Para ello, se hicieron dos cultivos de E.coli Hfr 3000 con glucosa como fuente de carbono, y a uno de ellos se le adicionó AMP cíclico 5 μ M. Al inicio del experimento se agregó a los cultivos 1 μ curie/ml de uracilo ^3H 0,1mM final. Luego se tomaron alícuotas a tiempos variables, para seguir la D.O. a 560m μ y la incorporación de uracilo al material insoluble en ácido tricloroacético (ver Materiales y Métodos). El experimento se continuó durante 4 horas en total.

Como puede verse en la fig.4A cuando se grafica la incorporación obtenida en función de la densidad óptica, los puntos obtenidos para ambos cultivos caen sobre una misma recta. Esto puede interpretarse como que la cantidad de RNA estable por bacteria es idéntica e independiente de la presencia o ausencia de AMP cíclico.

Deseamos destacar que en este experimento los tiempos de marcación son muy largos, midiéndose fundamentalmente la incorporación a RNA estable. El resultado es muy diferente si se mide la velocidad inicial de incorporación de uracilo con pulsos cortos, la cual depende en gran parte de la permeabilidad de la bacteria al precursor tritiado (fig.27).

En la fig.4B se muestra un experimento semejante en el que se midió la incorporación de fenilalanina ^3H a material insoluble en TCA. Cuando se grafica la incorporación en

función de la absorbancia a 560 μ , no se observan diferencias importantes entre ambos cultivos. Esto es un índice de que la cantidad de proteínas totales por bacteria es semejante en los cultivos conteniendo o no AMP cíclico 5mM. Por lo tanto, el agregado del nucleótido no parecería modificar el tamaño de las bacterias.

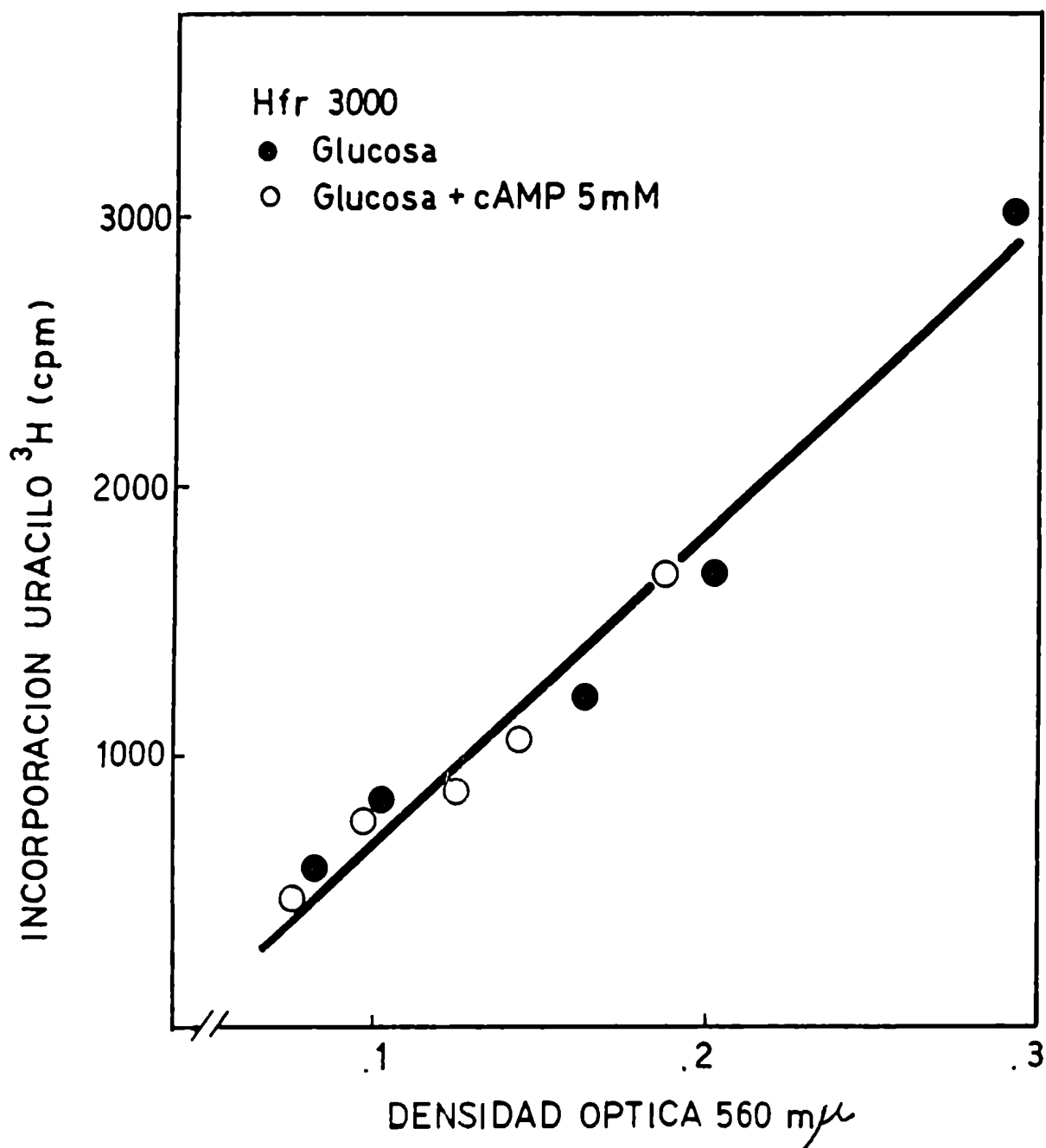


Fig.4A Síntesis de RNA estable en E.coli Hfr 3000 cultivada en presencia (o) o ausencia (●) de AMP cíclico 5mM. Dos horas antes de retirar la primer alícuota se agregó uracilo ^3H (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 0,1mM final) a los cultivos, determinándose la incorporación a material insoluble en TCA 5%.

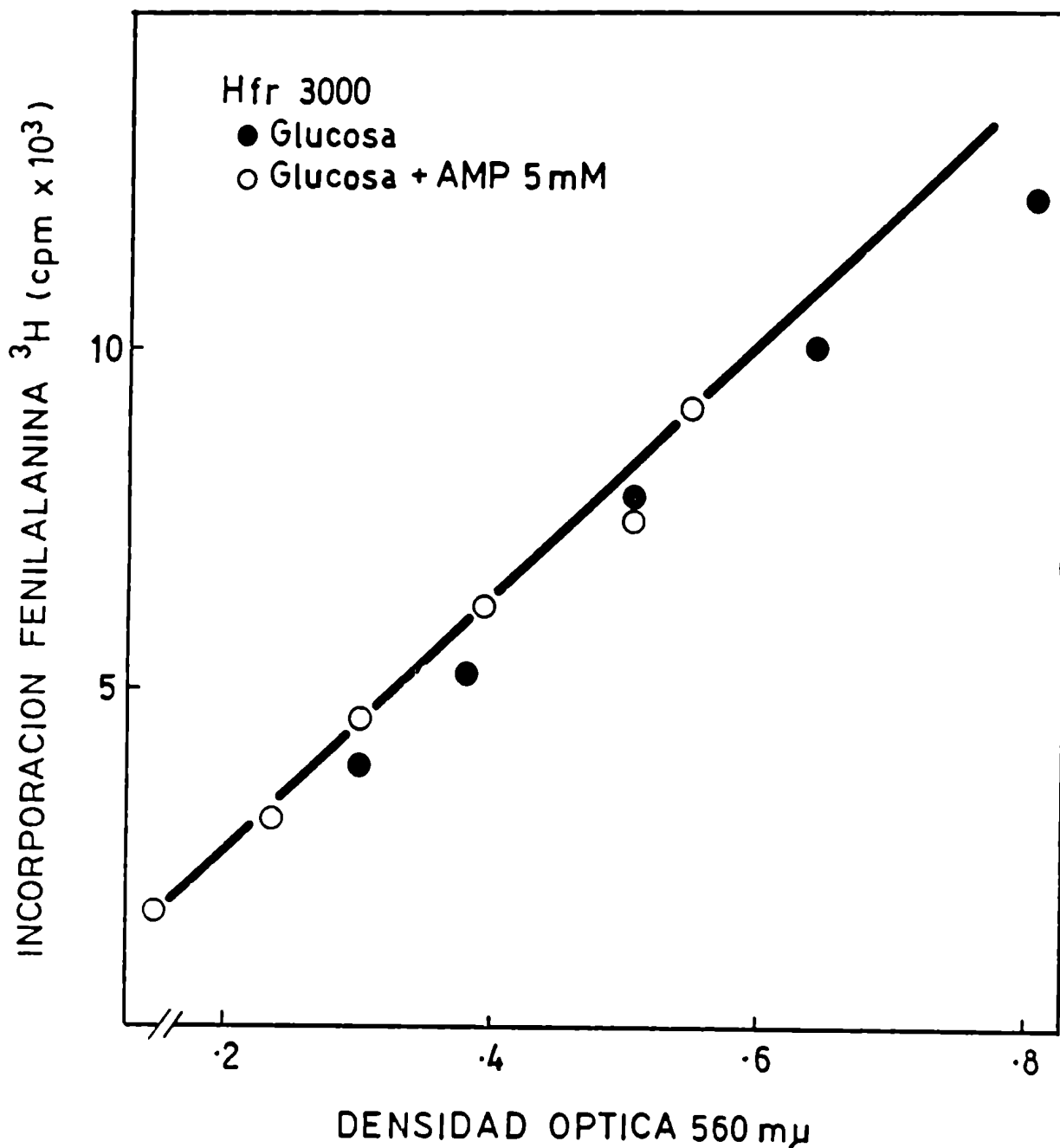


Fig. 4B Incorporación de fenilalanina ^3H a material TCA insoluble en cultivos de E.coli Hfr 3000, realizados en presencia (o) o en ausencia (●) de AMP cíclico 5mM. Al iniciar el experimento se agregó a ambos cultivos fenilalanina ^3H (4 $\mu\text{Ci/ml}$, 0,05mM final).

Estudio de la viabilidad

Los cambios observados en la densidad óptica de los cultivos no indican inequívocamente que la multiplicación bacteriana sea afectada por el AMP cíclico, puesto que también podrían deberse a cambios en el tamaño de las partículas.

Esta posibilidad fue descartada contando el número de bacterias en una cámara de Petroff-Hauser. En todos los casos se obtuvieron resultados comparables a las lecturas de densidad óptica a 560nm.

El hecho de que la inhibición del crecimiento se observara con concentraciones relativamente altas del nucleótido (5mM), hizo necesario descartar la posibilidad de que el AMP cíclico tuviera un efecto tóxico sobre E.coli, produciendo la muerte de una parte del cultivo.

Para ello, a tiempos variables se tomaron alícuotas de dos cultivos de Hfr 3000 en glucosa, uno de ellos crecido en presencia del nucleótido. A una parte de la alícuota se le midió la D.O. 560m μ ; y otra se diluyó 10⁵ veces en medio mínimo de sales, extendiéndose 0.1 ml en placas de agar nutriente LB. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado. El recuento de colonias se efectuó luego de incubar las placas a 37° durante 24 horas.

La fig.5 muestra el número de colonias graficado en función de la densidad óptica del cultivo. Todos los puntos ajustan una misma recta, siendo las lecturas de D.O. proporcionales al número de bacterias viables. El agregado de AMP cíclico no tiene ningun efecto sobre la viabilidad de E.coli.

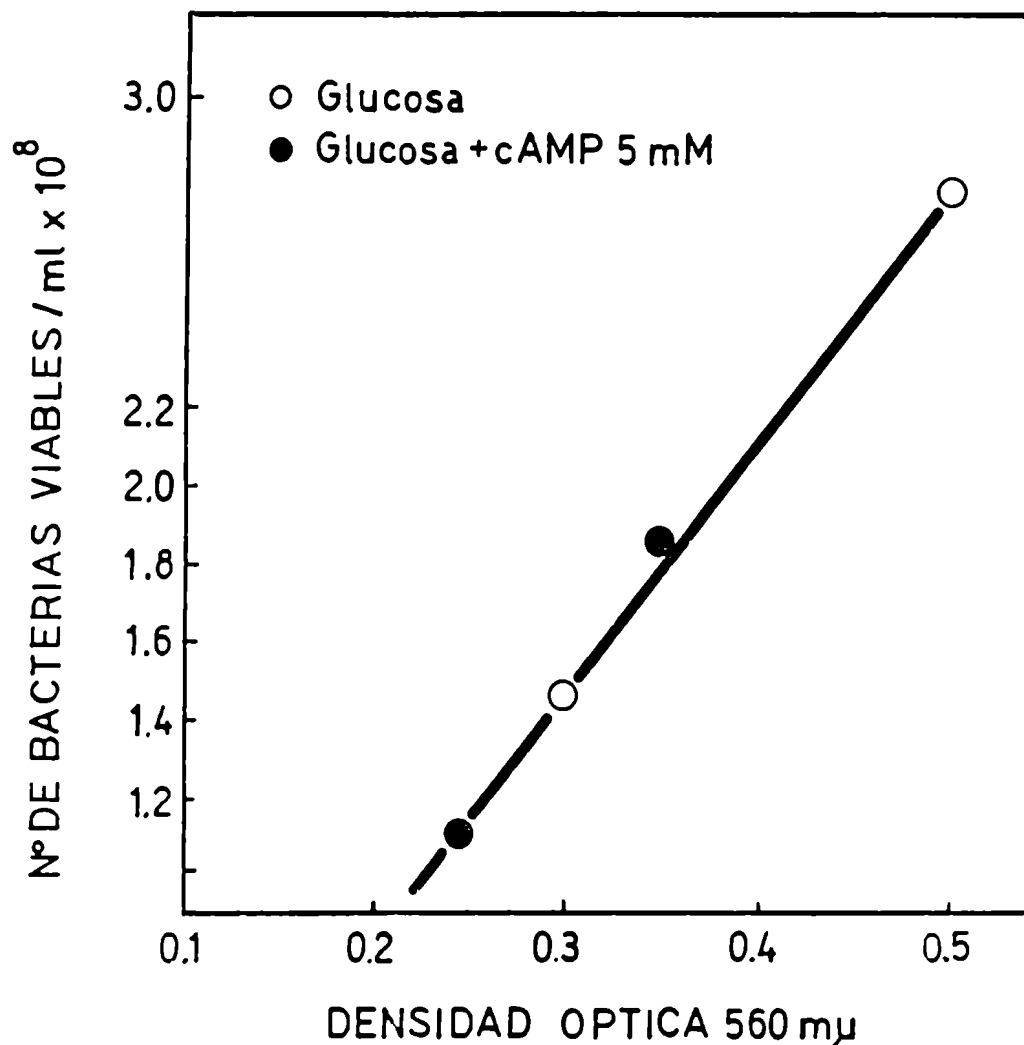


Fig.5 Número de bacterias viables en función de la densidad óptica a 560mμ. Cultivos de E.coli Hfr 3000 realizados en presencia (●) o en ausencia (○) de AMP cíclico 5mM. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Estabilidad del AMP cíclico en los cultivos

E. coli tiene una fosfodiesterasa específica para el AMP cíclico. Como en nuestros experimentos el AMP cíclico está en contacto con el cultivo durante varias horas, existía la posibilidad de que fuera degradado a 5' AMP. No obstante, el control realizado (Tabla 3) indica que el nucleótido es muy estable y su concentración no se modifica significativamente luego de 3 hs. de cultivo. En este experimento se aprovechó la propiedad del $\text{Ba}(\text{OH})_2$ y el ZnSO_4 de precipitar el fósforo inorgánico y todos los ésteres fosfóricos que no sean AMP cíclico. Se tomaron alícuotas de un cultivo de *E. coli* conteniendo 5µM AMP cíclico, se precipitaron con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ y ZnSO_4 y se determinó la absorbancia de los sobrenadantes a 260mµ. Dicho valor es una medida del AMP cíclico remanente.

Tabla 3

Estabilidad del AMP cíclico en los cultivos

Tiempo de cultivo	cAMP 5mM	D.O. 560 cultivo	D.O. 260m μ	D.O. 260m μ sobrenadante B _a 2+ - Zn ²⁺
0	-	.125	0.006	0,009
0	+	.130	0.536	0,459
1h	-	.225	0.004	0,015
1h	+	.170	0.556	0,469
2h	-	.435	0.000	0,017
2h	+	.310	0.586	0,522
3h	-	.810	0.008	0,006
3h	+	.480	0.608	0,478

Se cultivó *E. coli* Hfr 3000 en medio mínimo de sales y glucosa, con o sin AMP cíclico 5mM. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de los cultivos y se centrifugaron las células. Este sobrenadante se diluyó 100 veces y se determinó la absorbancia a 260m μ , con o sin previa precipitación con 0.3ml Ba(OH)₂ 0.3N y 0.3ml ZnSO₄ al 5%.

Reversibilidad de la inhibición del crecimiento

La inhibición del crecimiento producida por el agregado de AMP cíclico es completamente reversible. En la fig.6 se muestra un experimento en el cual se realizaron tres cultivos de E.coli Hfr 3000 en medio mínimo de sales y glucosa. A uno de ellos se le agregó el nucleótido cíclico (10mM) al comienzo del experimento, y a otro 80 minutos después. En ambos casos se observa una notable inhibición del crecimiento. Los tiempos de generación pasan de 60 minutos **sin** adiciones a 100 minutos con AMP cíclico. Luego de 180 minutos los cultivos fueron centrifugados a 3000xg durante 15 minutos, resuspendidos y vueltos a centrifugar. Finalmente el pellet fue resuspendido en medio mínimo de sales con glucosa 50mM, y se continuaron cultivando a 37°C. Como puede observarse, luego de eliminado el nucleótido, el crecimiento se reanuda inmediatamente con un tiempo de generación de 60 minutos.

La reversibilidad de la inhibición es otro argumento más en favor de que no se trata de un fenómeno de naturaleza tóxica.

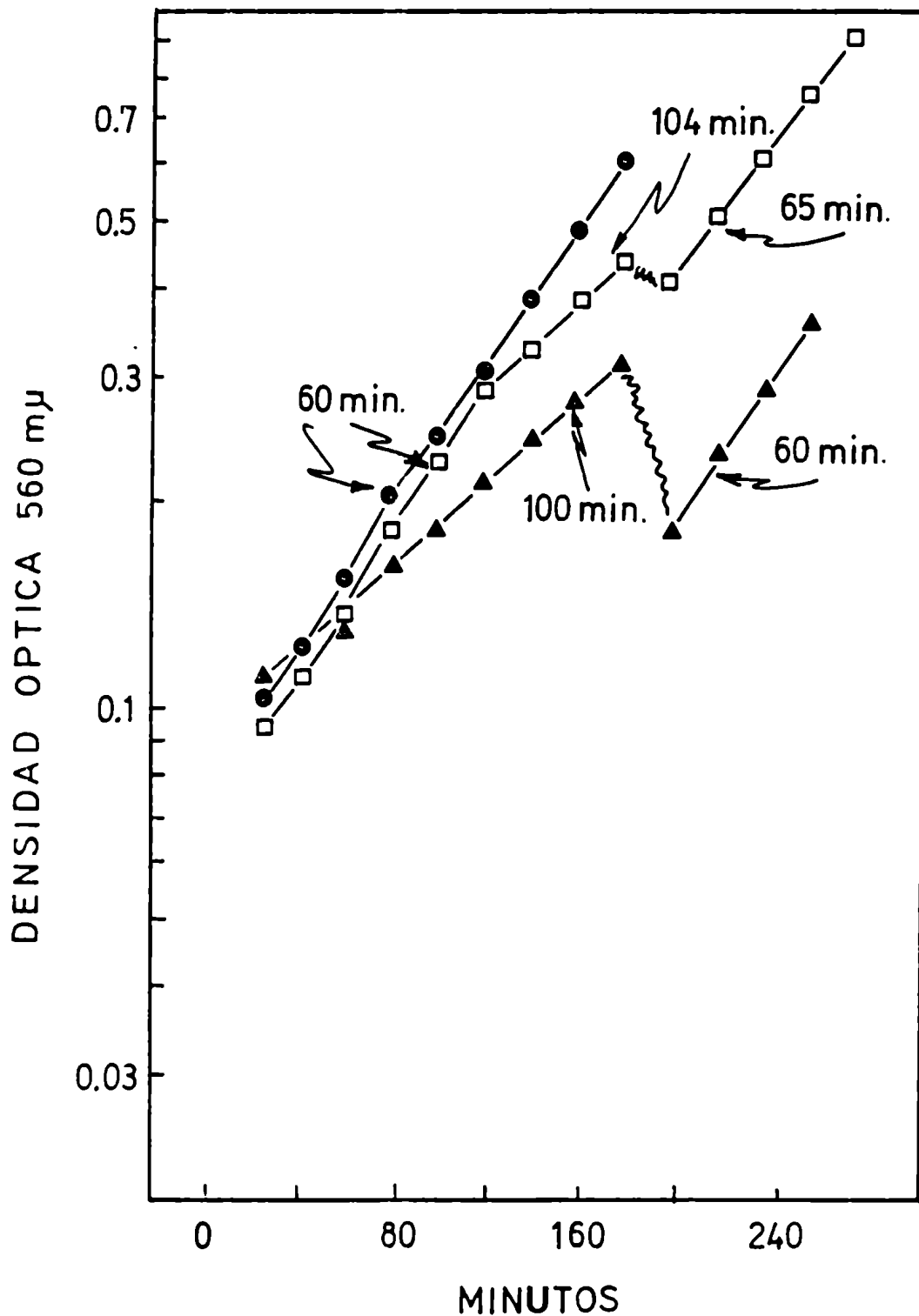


Fig.5 Reversibilidad de la inhibición del crecimiento. Cultivos de *E. coli* Hfr 3000 crecida en medio mínimo glucosa sin (●, □) o con (▲) AMP cíclico 10mM desde el comienzo. A los 80 minutos se le agregó AMP cíclico 10mM a uno de ellos (□). Luego de 180 minutos las bacterias se centrifugaron y lavaron, resuspendiéndose en medio sin AMP cíclico y se continuó la incubación a 37°C.

Especificidad de la acción del AMP cíclico

Se investigó el efecto de análogos del AMP cíclico sobre el crecimiento celular. Como muestra la fig.7, el agregado de 5' AMP, ADP, ATP o adenosina a una concentración de 5mM no modifica la velocidad de crecimiento de E.coli Hfr 3000 en medio de sales y glucosa. Por el contrario, la adición de AMP cíclico 5mM, alargó el tiempo de generación de 60 minutos a 92 minutos.

También hemos estudiado el efecto del N⁶, 2'-o-dibutiril-AMP cíclico. Este derivado tiene hasta 50 veces más actividad que el AMP cíclico cuando es agregado a células intactas de eucariotes (Robison, Butcher y Sutherland, 1971). Esta propiedad se podría deber a que el compuesto atraviesa la membrana plasmática con mayor facilidad o a que es más resistente a la degradación por la fosfodiesterasa.

El dibutiril AMP cíclico agregado exógenamente en concentraciones de hasta 5mM no modifica la velocidad de crecimiento de E.coli Hfr 3000. Esto no es demasiado sorprendente, puesto que resultados de otros autores también indican que este derivado carece de acción en sistemas bacterianos. Por ejemplo, no es capaz de revertir la represión catabólica en E.coli (Perlman y Pastan, 1968; de Crombrughe y col., 1959). Esto podría deberse a que la proteína receptora del AMP cíclico es insensible a este derivado, careciendo la bacteria de las enzimas capaces de deacilarlo, que normalmente están presentes en los eucariotes.

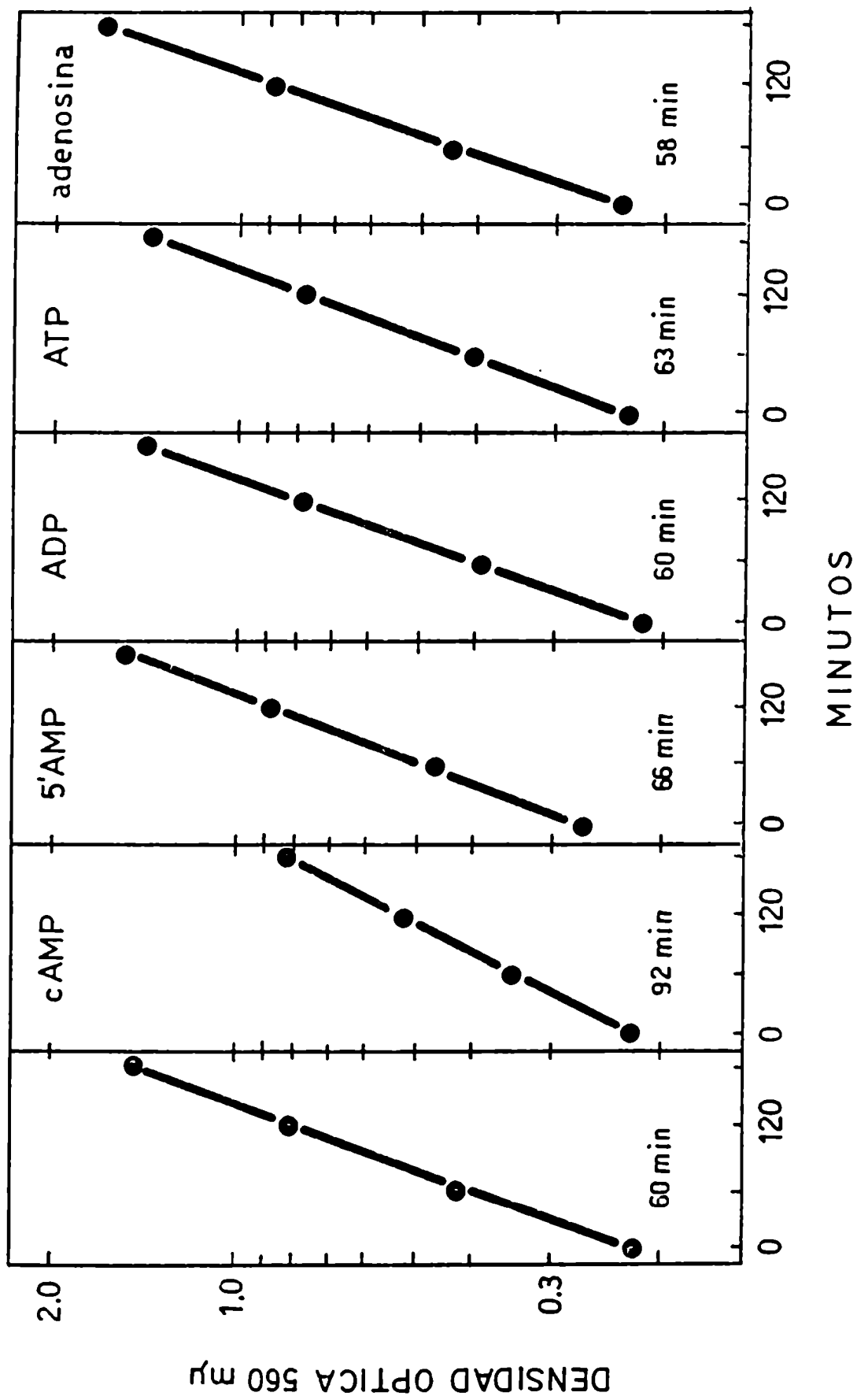


Fig.7 Especificidad. Se cultivó *E. coli* Hfr 3000 en medio mínimo de sales y glucosa, con las adiciones indicadas. La concentración de los agregados fue de 5mM en todos los casos.

Concentración de AMP cíclico necesaria para inhibir el crecimiento

Se estudió el rango de concentración de AMP cíclico requerido para inhibir el crecimiento bacteriano. Para ello, se tomaron cultivos de E.coli Hfr 3000, y una vez diluídos a 2×10^7 células/ml en medio mínimo de sales y glucosa, se distribuyeron en varios cultivos idénticos, con el agregado de cantidades variables de AMP cíclico.

La fig.8 muestra las curvas de crecimiento correspondientes a uno de estos experimentos. Como puede observarse, con AMP cíclico 2, 5 y 10mM hay una disminución de la velocidad de crecimiento logarítmico. En cambio, en el cultivo crecido con 1mM, prácticamente no hay modificaciones.

En la fig.9 se muestran los resultados graficando el tiempo de generación del cultivo (en minutos) en función de la concentración de AMP cíclico agregado al medio. El tiempo de duplicación pasa de 65 min. en el control a 108 minutos con 10mM del nucleótido, es decir que hay una inhibición máxima del 60%. La mitad de la inhibición máxima se obtiene con aproximadamente 3.5mM.

Las concentraciones del nucleótido que son necesarias agregar para observar el efecto sobre el crecimiento a primera vista impresionan como exageradamente altas. No obstante, se debe tener presente que las membranas biológicas son relativamente impermeables a los nucleótidos y otros compuestos aniónicos fosforilados. La permeabilidad para el AMP cíclico no es una excepción, por lo cual para lograr

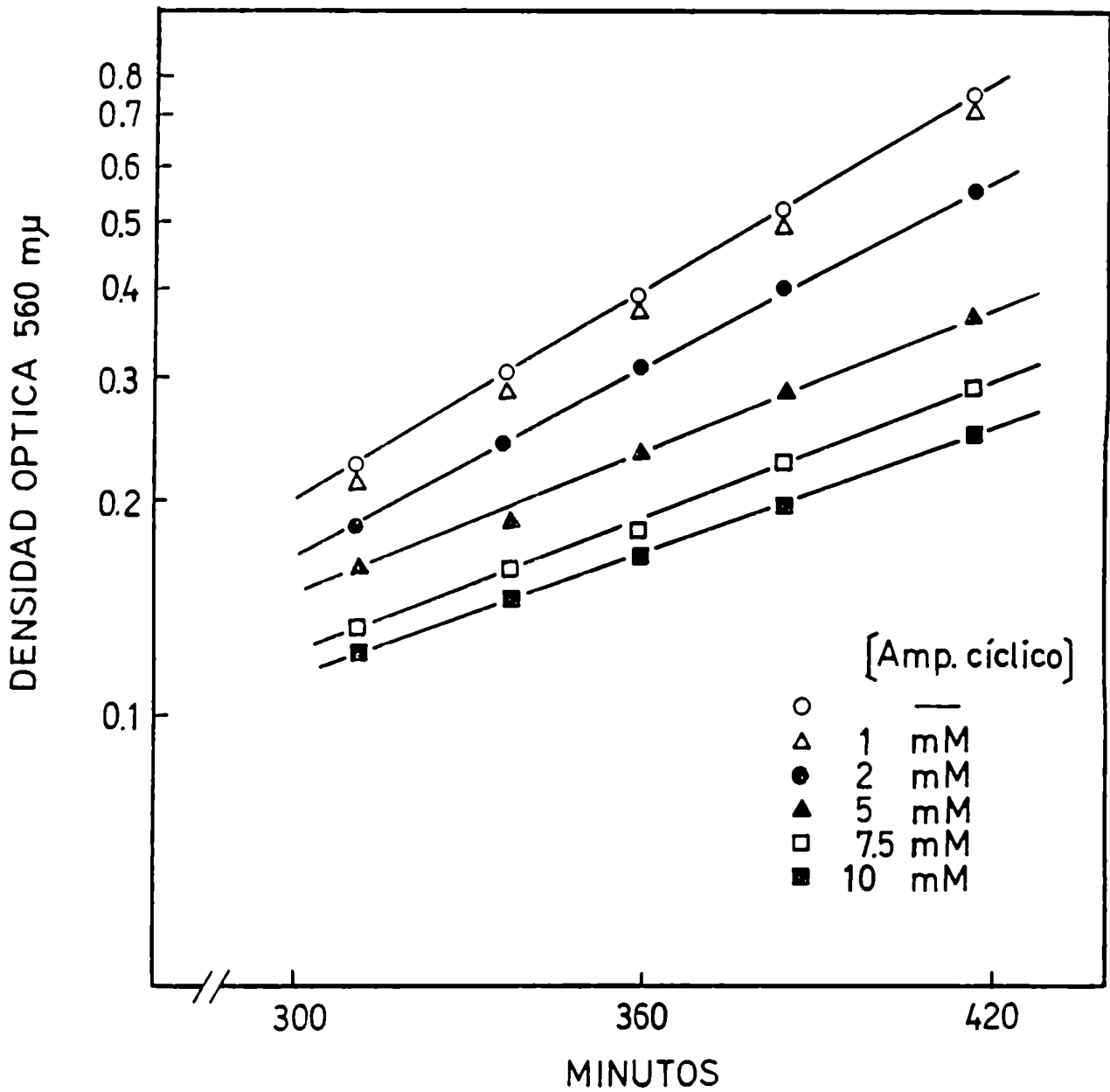


Fig.8 Curvas de crecimiento de *E.coli* Hfr 3000 cultivada en medio mínimo de sales con glucosa 50mM como fuente de carbono. A tiempo cero se le agregó a los cultivos AMP cíclico en las concentraciones indicadas.

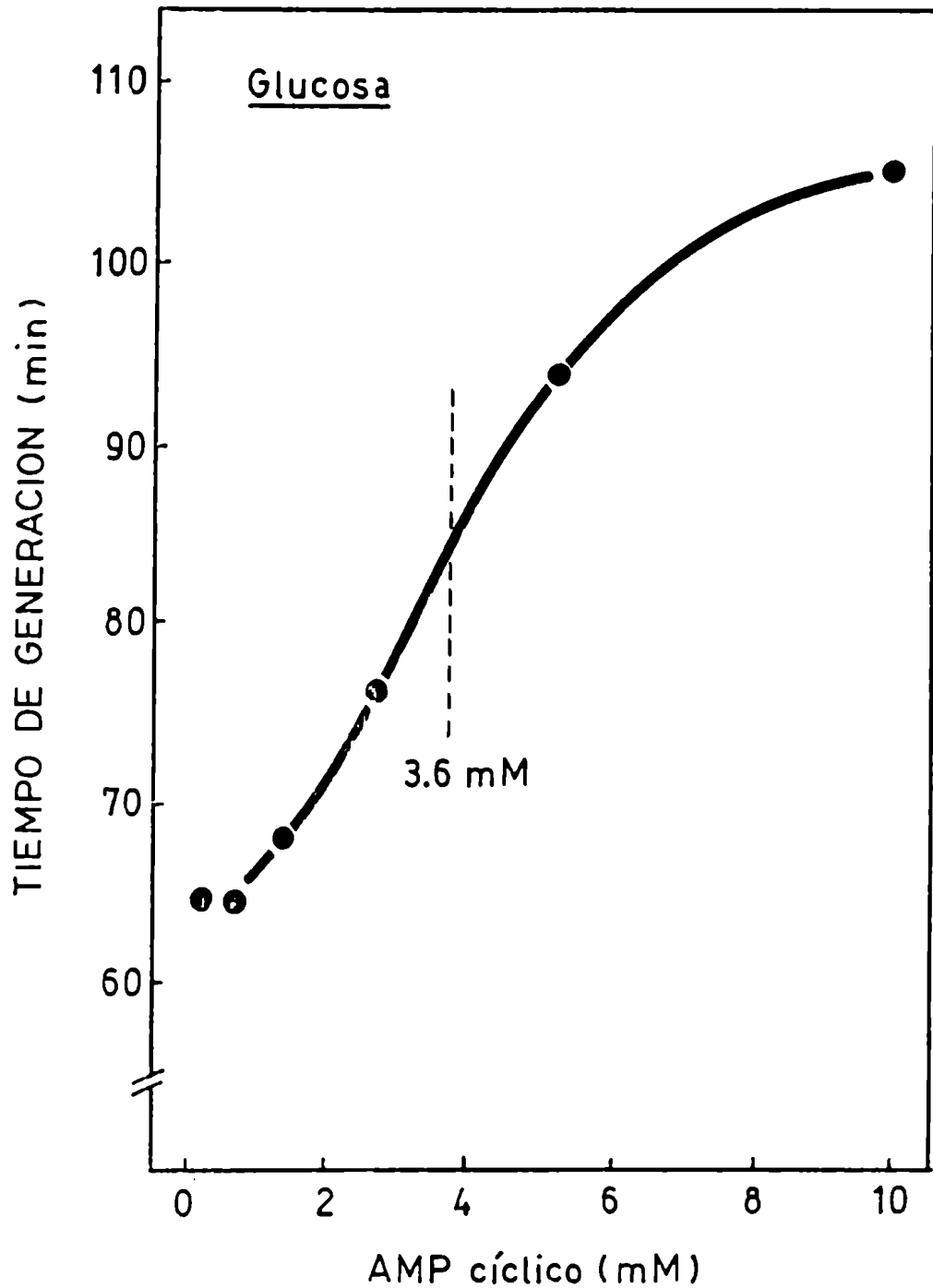


Fig.9 Tiempo de generación de E.coli Hfr 3000 en función de la concentración de AMP cíclico agregada a los cultivos. Como fuente de carbono se utilizó glucosa 50mM.

su entrada hay que utilizar concentraciones extracelulares altas. En eucariotes este problema se puede obviar usando el dibutiril AMP cíclico. En bacterias también se puede aumentar la permeabilidad al nucleótido tratando la célula con EDFA (Perlman y col., 1968), pero este procedimiento no puede emplearse para experimentos de duración prolongada pues produce severas lesiones celulares.

Por otra parte, los niveles de AMP cíclico exógeno requeridos para inhibir el crecimiento están dentro del rango de concentraciones utilizadas por diversos autores para demostrar otros efectos del AMP cíclico en bacterias (Ullman y Monod, 1968; Perlman y col., 1969; Prusiner y col., 1972; Wise y col., 1973).

La inhibición del crecimiento se puede observar también utilizando piruvato como fuente de carbono. Este compuesto, al igual que la glucosa, es capaz de producir represión catabólica de la síntesis de enzimas inducibles. En la fig.10 se muestra una curva de concentración de AMP cíclico en cultivos de E.coli Hfr 3000 crecidas con piruvato como fuente de carbono. Como puede observarse, se obtuvo una inhibición máxima del crecimiento del 55%. La concentración requerida para obtener la mitad de la inhibición máxima ($I_{0,5}$) es menor que en el caso de la glucosa: 1.1mM. Es posible que esto pueda deberse a diferencias en la permeabilidad al AMP cíclico.

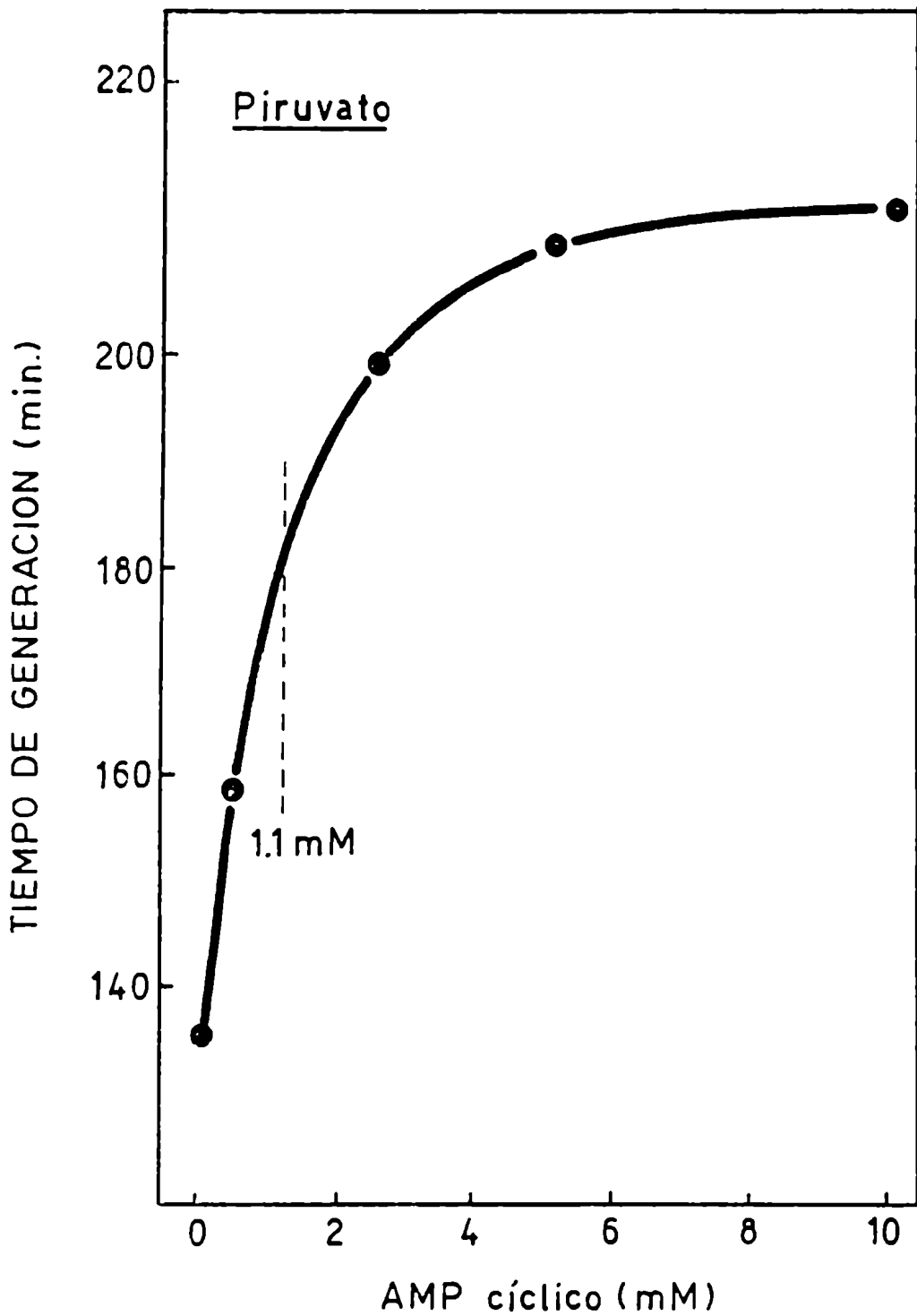


Fig.10 Tiempo de generación de E.coli Hfr 3000 en función de la cantidad de AMP cíclico agregada a los cultivos. Como fuente de carbono se utilizó piruvato 50x31.

Influencia del medio de cultivo

Habiéndose observado la inhibición del crecimiento en cultivos en medio mínimo, se investigó la posibilidad de observar el efecto en un medio de cultivo enriquecido por el agregado de casaminoácidos libres de vitaminas (Difco) o de extracto de levadura. La tabla 4 muestra el resultado de este experimento. Como vemos, con casaminoácidos la inhibición es aún mayor que la observada con glucosa solamente. En cambio con un medio muy rico y mal definido (extracto de levadura), el efecto sobre el crecimiento es menos notorio.

Tabla 4

Inhibición del crecimiento
en diversos medios de cultivo

Medio de cultivo	Tiempo de generación (minutos)	
	Sin adiciones	+ AMP cíclico 5mM
Medio mínimo + glucosa 50mM	62	88
Medio mínimo + glucosa 50mM + casaminoácidos 0.1%	38	61
Medio mínimo + glucosa 50mM + extracto de levadura 0,6%	33	42

El factor sexual no influencia el fenómeno

La cepa de *E. coli* utilizada en los experimentos que anteceden, por ser Hfr ("alta frecuencia de recombinación"), lleva el factor sexual F integrado en el cromosoma. Este factor tiene un sistema de replicación propio, como lo demuestra el hecho de que puede existir como un episoma o unidad genética autónoma en las cepas denominadas F⁺. En el experimento de la Tabla 5 se estudió la influencia del factor sexual sobre la acción del AMP cíclico en la multiplicación bacteriana. Se emplearon tres cepas isogénicas obtenidas por Adelberg. Todas tienen igual genotipo: auxótrofas para treonina y leucina, β-galactosidasa menos y estreptomycinina resistentes (threo⁻, leu⁻, lacZ, str^R); difieren únicamente en el factor sexual F, que está integrado al cromosoma en la cepa Hfr, libre como episoma en la F⁺ y ausente en la cepa F⁻. Los cultivos se realizaron en medio mínimo de sales y glucosa, suplementado con 0,1% de casaminoácidos. Como puede observarse en la Tabla 5, la inhibición del crecimiento por el AMP cíclico es independiente del sexo de la bacteria.

Tabla 5

Cepa Utilizada	Tiempo de generación (minutos)	
	Sin adiciones	AMP cíclico 5mM
AB253 F ⁻	38	58
AB284 F ⁺	42	61
AB311 Hfr	36	60

Influencia de la fuente de carbono

La inhibición de la velocidad de crecimiento de *E. coli* por el agregado de AMP cíclico, depende en forma muy estricta de la fuente de carbono utilizada para cultivarla. Como hemos visto anteriormente, el nucleótido inhibe los cultivos crecidos con glucosa o piruvato (ver fig.3 y 10).

En la fig.11 se muestran las curvas de crecimiento de cultivos de *E. coli* en los que se empleó glicerol, succinato o malato como fuente de carbono y energía. El agregado de AMP cíclico 5mM no produce ninguna modificación de la velocidad de crecimiento en estas condiciones. Iguales resultados se obtienen si se utiliza la maltosa como fuente de carbono (fig.13).

El contenido en AMP cíclico endógeno de *E. coli* depende fundamentalmente de la fuente de carbono. En presencia de glucosa o piruvato, éste es bajo (del orden de $1 \times 10^{-5}M$). En cambio, en glicerol o succinato son 10 veces mayores (Buettnner y col., 1963; Ieterkofsky y col., 1971).

En la fig.12 se muestran las curvas de tiempo de la inducción de β galactosidasa en glucosa, glicerol, succinato y malato. Cuando los cultivos de la fig.11 llegaron a una densidad óptica de 0,150 a 560m μ , se indujo la enzima agregando 1mM IPTG y se determinó la actividad de β galactosidasa. La actividad enzimática del cultivo crecido en glucosa es de menos de la mitad de los de glicerol, succinato y malato. Este fenómeno es conocido como represión catabólica permanente, y es debido a los bajos niveles endógenos de AMP cíclico, como lo demuestra el hecho de que desaparece

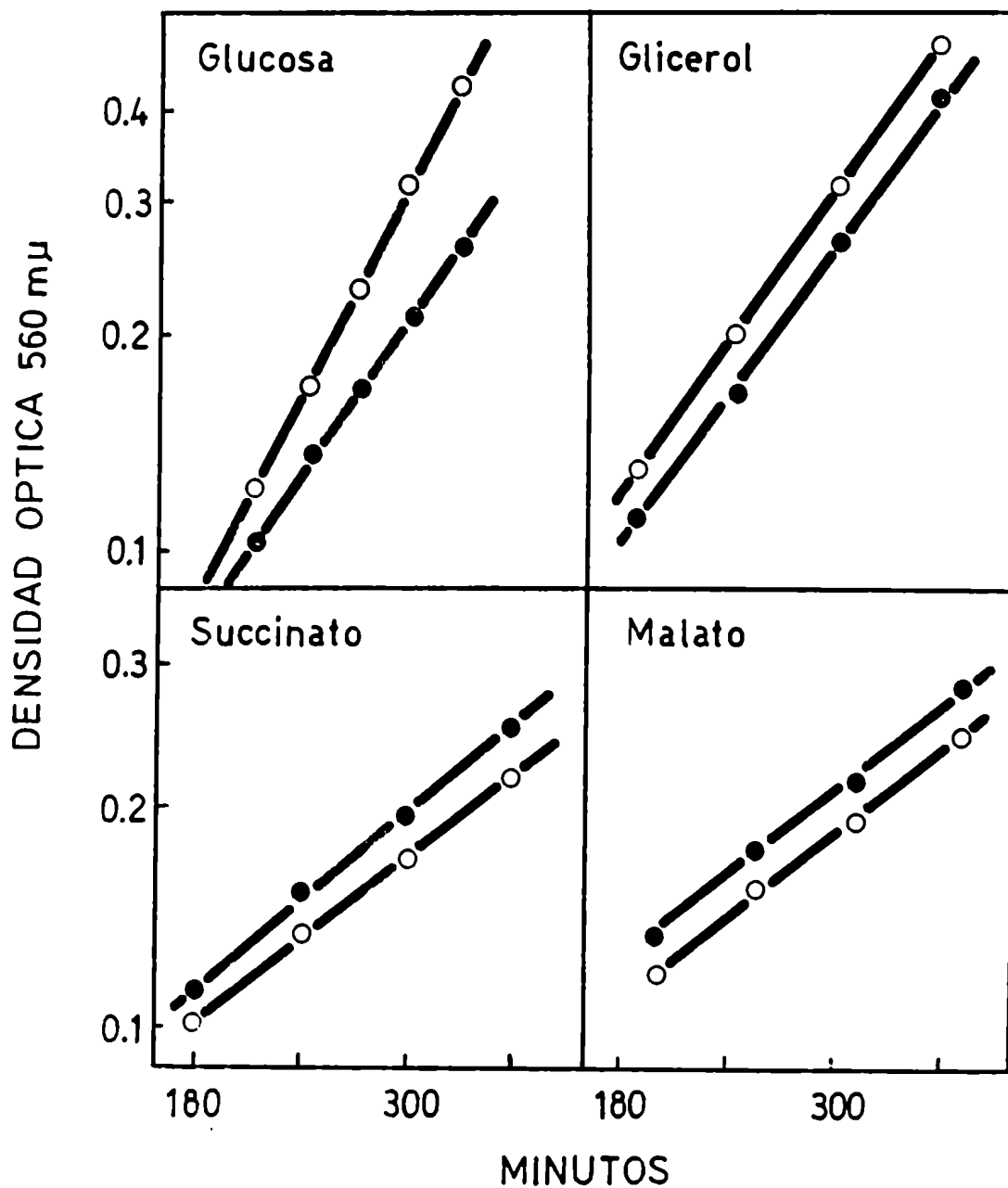


Fig.11 Acción del AMP cíclico sobre el crecimiento de E.coli Hfr 3000 cultivada con diversas fuentes de carbono. La glucosa, succinato y malato fueron utilizados a una concentración de 50mM y el glicerol 68mM. Se realizaron cultivos en presencia (●) o en ausencia (○) de AMP cíclico 5mM. En todos los casos se incubó a 37°C con una agitación de 100 ciclos/min.

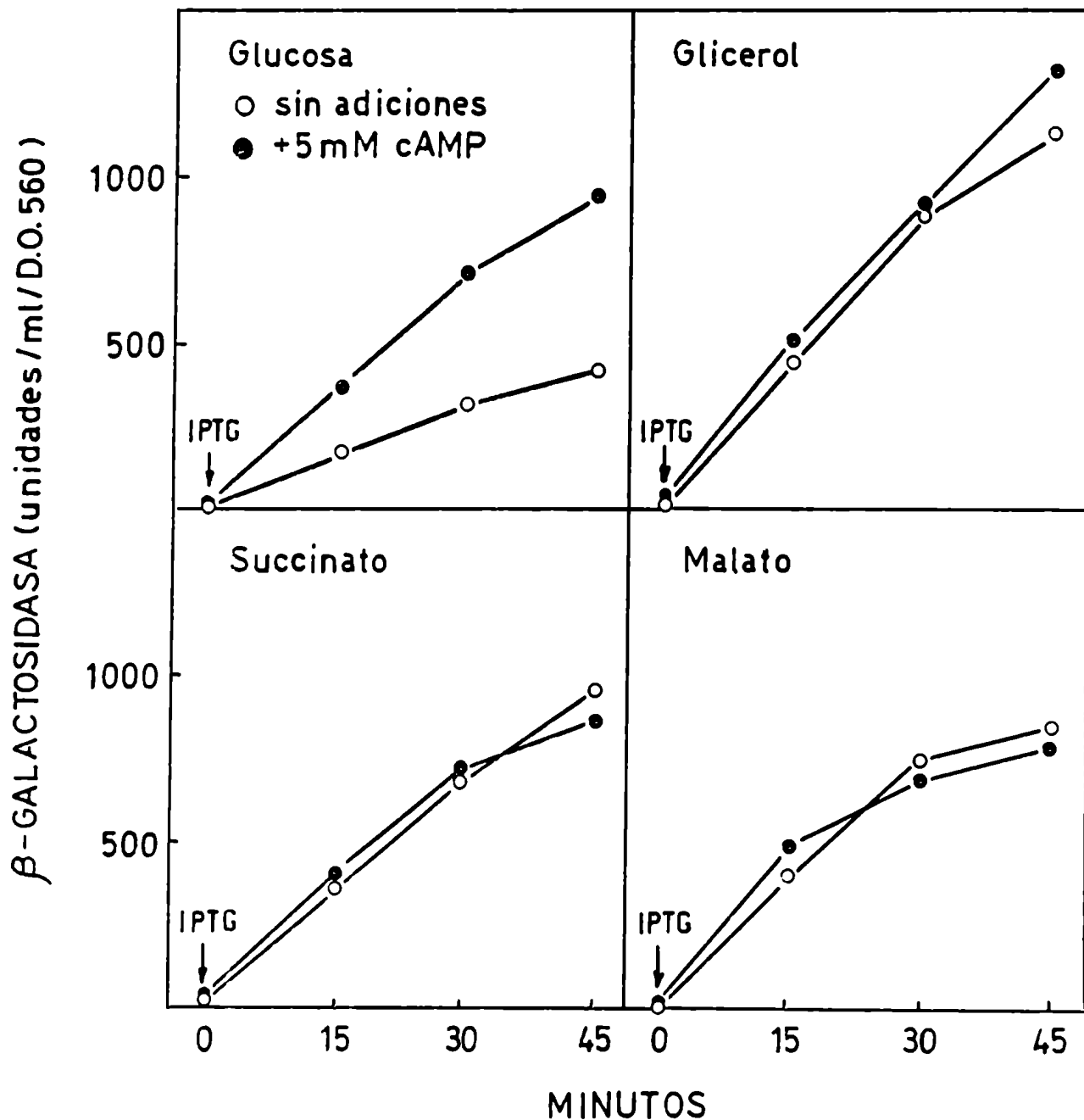


Fig.12 Influencia del AMP cíclico sobre la inducción de la síntesis de β galactosidasa en *E.coli* Hfr 3000 cultivada en diversas fuentes de carbono. Se indujeron cultivos en fase logarítmica por el agregado de 1mM IPTG (señalado por la flecha), luego de lo cual se retiraron alícuotas para determinar la densidad óptica 560m μ y la actividad de β -galactosidasa (ver Materiales y Métodos). ○—○ cultivos sin adiciones; ●—● cultivos realizados en presencia de 5mM cAMP.

con el agregado de 5mM AMP cíclico. La adición del nucleótido no modifica la inducción de β galactosidasa en los cultivos de glicerol, malato y succinato, pues en ellos la concentración endógena del nucleótido ya es lo suficientemente alta como para no ser limitante en la síntesis de enzimas inducibles. Como vemos, la medición de la actividad de la β galactosidasa es un índice indirecto de la cantidad de AMP cíclico que contiene la bacteria.

En la tabla 6 se resumen estos resultados. El tiempo de generación se alarga al agregar el nucleótido solamente cuando la fuente de carbono es la glucosa o el piruvato. Aquellos cultivos que no presentan represión catabólica no son modificados.

Como analizaremos más adelante este fenómeno podría explificarse de dos formas:

- a) que el efecto del AMP cíclico consiste en inhibir alguna enzima requerida para la utilización de la glucosa o el piruvato; enzima que no es requerida para metabolizar las restantes fuentes de carbono.
- b) que las concentraciones de AMP cíclico endógeno en glicerol, succinato y malato ya sean lo suficientemente altas como para saturar el mecanismo que inhibe el crecimiento y, en consecuencia, el agregado exógeno del nucleótido no afecta la multiplicación celular.

Tabla 6

Acción del AMP cíclico sobre el tiempo de generación
y la velocidad de síntesis de β galactosidasa en
E.coli cultivada en diferentes fuentes de carbono

Fuente de carbono y energía	Tiempo de generación (min.)		galactosidasa Unidades/D.C. ₅₆₀ /min.	
	Sin adiciones	con 5mM AMP cíclico	Sin adiciones	con 5mM AMP cíclico
glucosa	65	92	10.7	23.0
glicerol	102	102	29.0	32.6
succinato	166	170	25.7	26.4
malato	168	162	26.2	30.0
piruvato	135	213	-	-

Experimentos de Diauxia

En 1941 Monod descubrió que cuando E.coli es cultivada en ciertas mezclas de carbohidratos, el crecimiento es "diauxico", es decir que tiene dos ciclos, primero se utiliza en glucosa y recién después la fuente de carbono más pobre. Entre ambos ciclos, hay una detención más o menos prolongada del crecimiento ("lag"). En 1968 Ullman y Monod descubrieron que este retardo del crecimiento desaparecía si se le agregaba AMP cíclico 10mM al medio de cultivo.

En el experimento de la fig.13 se emplearon cultivos de E.coli Hfr 3000 crecidos en medio mínimo. Cuando la maltosa 0,1% era la fuente de carbono, el cultivo crecía lentamente con un tiempo de generación de 126 minutos aproximadamente, y el agregado de AMP cíclico 10mM no produjo ningún efecto. Por el contrario, si se cultivaba en glucosa 0,02% el crecimiento era mucho más rápido, pero al llegar a una D.O. de 0.400, se detenía debido a que se agota la escasa cantidad de glucosa disponible. Cuando el cultivo se creció simultáneamente en ambas fuentes de carbono, se utilizó primero la glucosa y al consumirse totalmente (al llegar a 0.400 de D.O.) se observó la detención transitoria del crecimiento. Luego de un "lag" de aproximadamente una generación, el crecimiento se reanudó con la velocidad de la maltosa. Por otro lado, en el cultivo con 10mM AMP cíclico, no se observó el "lag" en el crecimiento en glucosa y durante el primer ciclo de crecimiento en glucosa, se observó claramente la inhibición por el nucleótido. La disminución de la pendiente en esta parte de la curva induce a creer que el crecimiento en presencia de AMP cíclico se produce siempre a la misma velocidad.

No obstante, si se observa con atención puede verse que dicha curva posee dos pendientes, la segunda idéntica a la de la maltosa. El punto de inflexión entre ambas se produce también al llegar a una D.O. de 0.400, que corresponde al crecimiento sustentado por 0,02% de glucosa. Esto es sorprendente, pues en presencia de AMP cíclico se hubiera esperado que la glucosa y la maltosa se consumieran simultáneamente, puesto que no hay represión catabólica. Hechos como éste hacen pensar que tal vez el AMP cíclico no sea el único responsable de la decisión de consumir preferencialmente una u otra fuente de carbono y quizás haya otros factores adicionales involucrados en este importante mecanismo de adaptación.

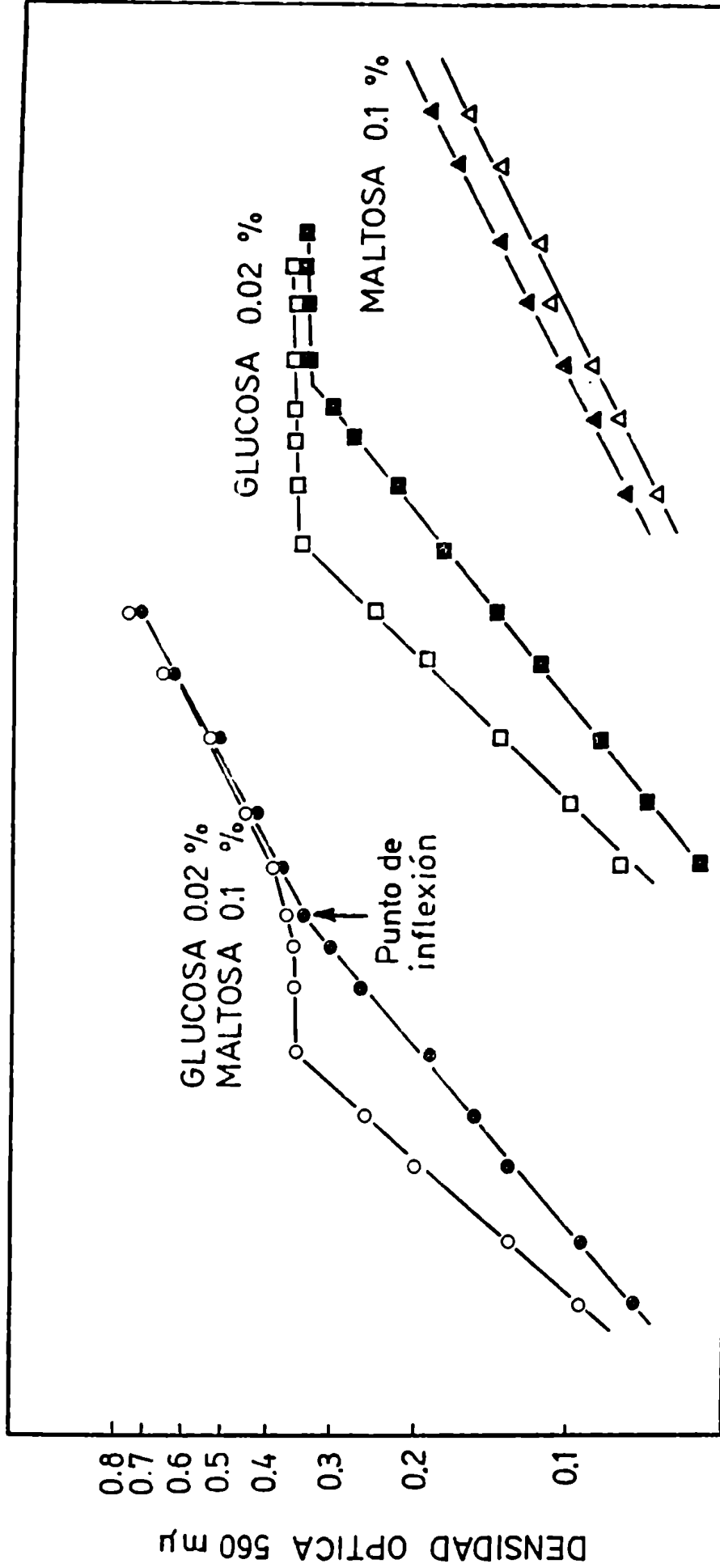


Fig. 13

Influencia del agregado de AMP cíclico sobre el crecimiento de *E. coli* Hfr 3000 en condiciones de diuxia. Se realizaron cultivos en glucosa 0,02% más maltosa 0,1% con (●) o sin (○) agregado de AMP cíclico 10mM; glucosa 0,02% en presencia (■) o en ausencia (□) del nucleótido 10mM; y maltosa 0,1% con (▲) o sin (△) AMP cíclico 10mM. Los cultivos se incubaron a 36°C con una agitación de 100 ciclos por minuto.

Experimentos con mutantes deficientes en proteína receptora del AMP cíclico

En las bacterias muchos efectos del AMP cíclico requieren primariamente la interacción de éste con la proteína receptora del AMP cíclico (también llamada CAP o CRP). Como resultado de dicha interacción, esta proteína sufre un cambio conformacional tal que aumenta su afinidad por los sitios promotores de DNA y por consiguiente se modifica la transcripción genética (ver fig.1).

Para aclarar si el factor CAP intervenía en la inhibición del crecimiento por el AMP cíclico, realizamos experimentos con mutantes deficientes en esta proteína.

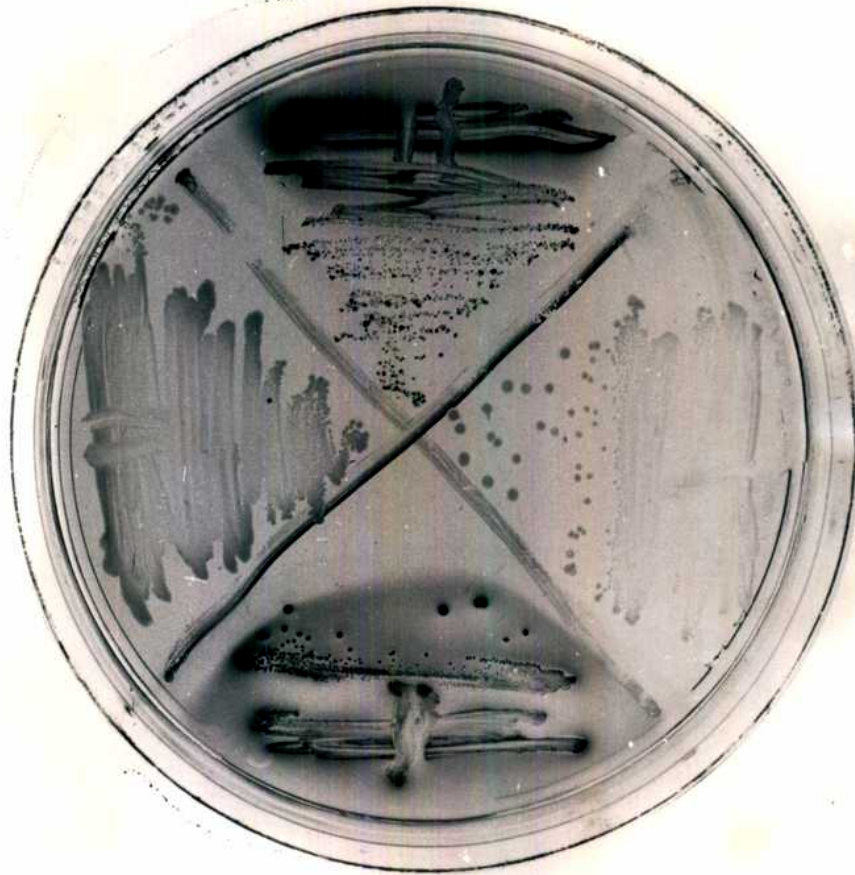
Utilizamos la cepa FP47 (Emmer y col., 1969), que fue generosamente cedida por I. Pastan. Se trata de una mutante pleiotrópica, incapaz de fermentar todos los azúcares cuyos operones están sujetos a la represión catabólica (por ejemplo lactosa, arabinosa, maltosa, etc.). A diferencia de las mutantes del gen adenilato ciclasa, este fenotipo no es revertido por el agregado de AMP cíclico. En la fig.14 se muestra una placa indicadora de agar McConkey - lactosa donde se ha sembrado la cepa parental PP6 (ó Hfr 1100, ver tabla 2), CAP⁺, y la mutante PP47, CAP⁻. Esta última es incapaz de fermentar la lactosa (colonias blancas).

En la fig.15 se muestra el crecimiento de la cepa parental CAP⁺ y de la mutante CAP⁻ en presencia o en ausencia de AMP cíclico 5mM. El medio mínimo con glucosa se suplementó con casamincácidos debido a que el complejo CAP-AMP cíclico es necesario para la expresión de algunos operones

de la biosíntesis de aminoácidos. Como puede observarse, en la cepa parental (fig.15A) el AMP cíclico produce una importante inhibición del crecimiento. Por el contrario, la mutante CAP⁻ no solamente crece más lentamente que su homóloga parental, sino que no es afectada por el nucleótido (fig.15B). Se puede concluir que la presencia de la proteína receptora es un requerimiento absoluto para la inhibición del crecimiento bacteriano por el AMP cíclico.

pp6

CA8306



pp47

CA8000

Fig.14 Fotografía de una placa de agar MacConkey - lactosa en la que se han sembrado las mutantes PP47 (cap^- cya^+) y CA8306 (cya^- del cap^-) y sus cepas parentales PP6 (cap^+) y CA8000 (cya^+). Las mutantes deficientes en proteína receptora del AMP cíclico o en adenilato ciclasa son incapaces de fermentar la lactosa (colonias blancas).

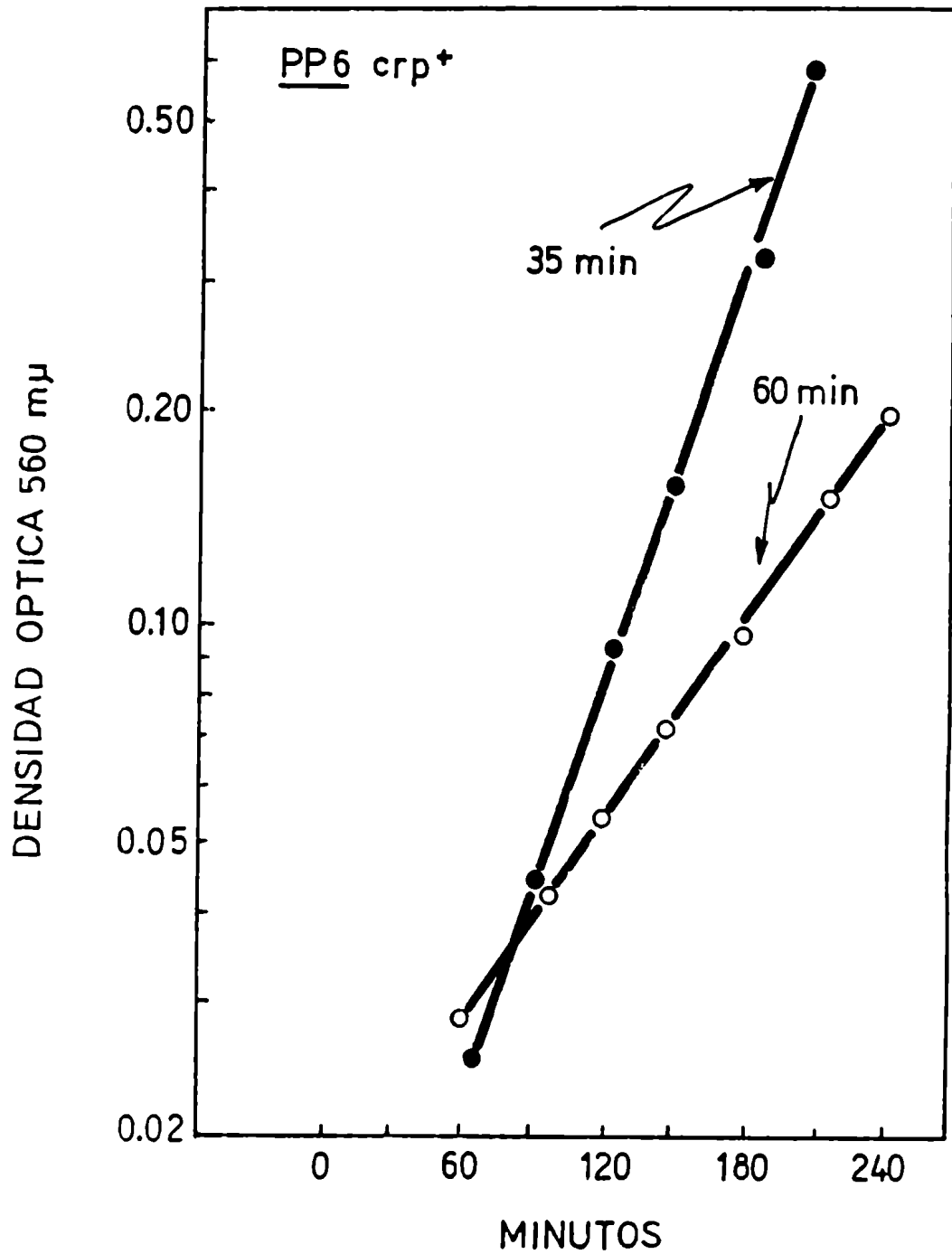


Fig.15A Acción del AMP cíclico sobre el crecimiento de la cepa pp6 (crp⁺). Las células fueron cultivadas en medio mínimo de sales y glucosa suplementado con caseína 0.1%, en presencia (o) o en ausencia (●) de AMP cíclico 5mM.

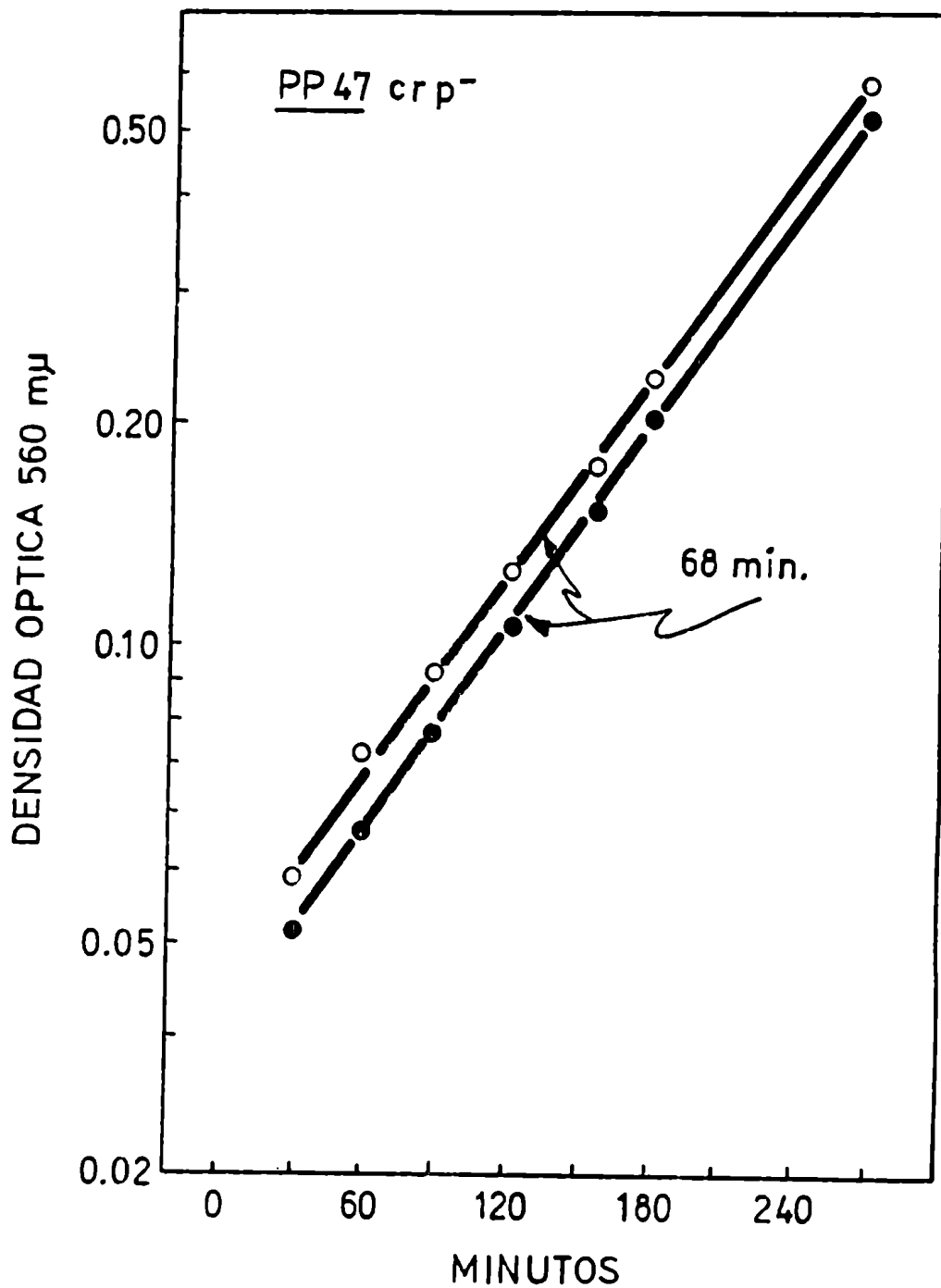


Fig. 15B Acción del AMP cíclico sobre el crecimiento de una mutante deficiente en proteína receptora del AMP cíclico (*E. coli* PP47, *crp*⁻). Los cultivos se realizaron en medio mínimo de sales y glucosa suplementado con caseína 0,1%, en presencia (○) o en ausencia (●) de AMP cíclico 5mM.

Experimentos con mutantes que carecen del gen adenilato ciclasa

En las mutantes deficientes en adenilato ciclasa el agregado de AMP cíclico al medio de cultivo (concentraciones de 2mM o menores) es capaz de estimular el crecimiento (Perlman y Pastan, 1969). La paradoja de un efecto inhibitorio en una cepa salvaje y de un efecto estimulador en cepas ciclasa menos debía ser explicada.

Para clarificar la ambigüedad de dos efectos opuestos producidos por el mismo metabolito, se realizaron una serie de experimentos con una mutante que tiene una delección del gen adenilato ciclasa (CA8306 cya^{del} , ver fig.14).

La CA8306 fue aislada recientemente por Jonathan Beckwith, quien seleccionó mutantes espontáneas de E.coli incapaces de fermentar maltosa y arabinosa. Se aislaron 40 mutantes cya^- , una de las cuales (CA8306) corresponde a una delección y por lo tanto carece totalmente de adenilato ciclasa (Brickman y col., 1973). La existencia de la delección es confirmada por:

- a) no presenta revertantes al genotipo cya^+ .
- b) en experimentos de transducción genética la CA8306 no complementa diversas mutaciones puntuales cya^- .
- c) no contiene AMP cíclico cuando éste es medido con el método de la proteína kinasa (Gilman, 1970).

El hecho de poder trabajar con una delección del gen adenilato ciclasa es crucial en experimentos de duración prolongada, debido a que las mutantes cya^- crecen lentamente y por lo tanto hay una presión selectiva muy grande

a favor de las revertantes que aparecen espontáneamente cuando la mutación es puntual. Además, en general las mutantes cya^- puntuales son "leaky", es decir que tienen una cierta actividad residual de la enzima.

En la fig.16 se muestra un experimento en el cual se cultivó E.coli CA8306 (cya^{del}) en medio mínimo con glucosa y casaminoácidos en presencia de cantidades variables de AMP cíclico. Puede apreciarse que a bajas concentraciones del nucleótido la multiplicación celular es estimulada; y el tiempo de generación pasa de 72 minutos sin adiciones a 48 minutos con el agregado de 2mM AMP cíclico. Esto confirma lo observado anteriormente por otros autores. A concentraciones mayores del nucleótido, el crecimiento es inhibido notablemente. Este resultado indica que una cierta concentración intracelular basal del nucleótido es necesaria para el crecimiento máximo, pero más allá de este nivel óptimo igualmente se observa la inhibición.

El comportamiento de la cepa parental (CA8000, cya^+) es muy distinto. El crecimiento es óptimo en ausencia de AMP cíclico exógeno y cantidades crecientes del mismo alargan el tiempo de generación, obteniéndose la inhibición máxima con 5mM (fig.17).

En los mismos cultivos se estudió la velocidad de síntesis de β galactosidasa que, como hemos visto, es un índice indirecto de los niveles intracelulares de AMP cíclico. En la mutante cya^- no se observa síntesis de la enzima (luego de la inducción con IPTG) en ausencia de AMP cíclico. Por el contrario, en la cepa parental, la

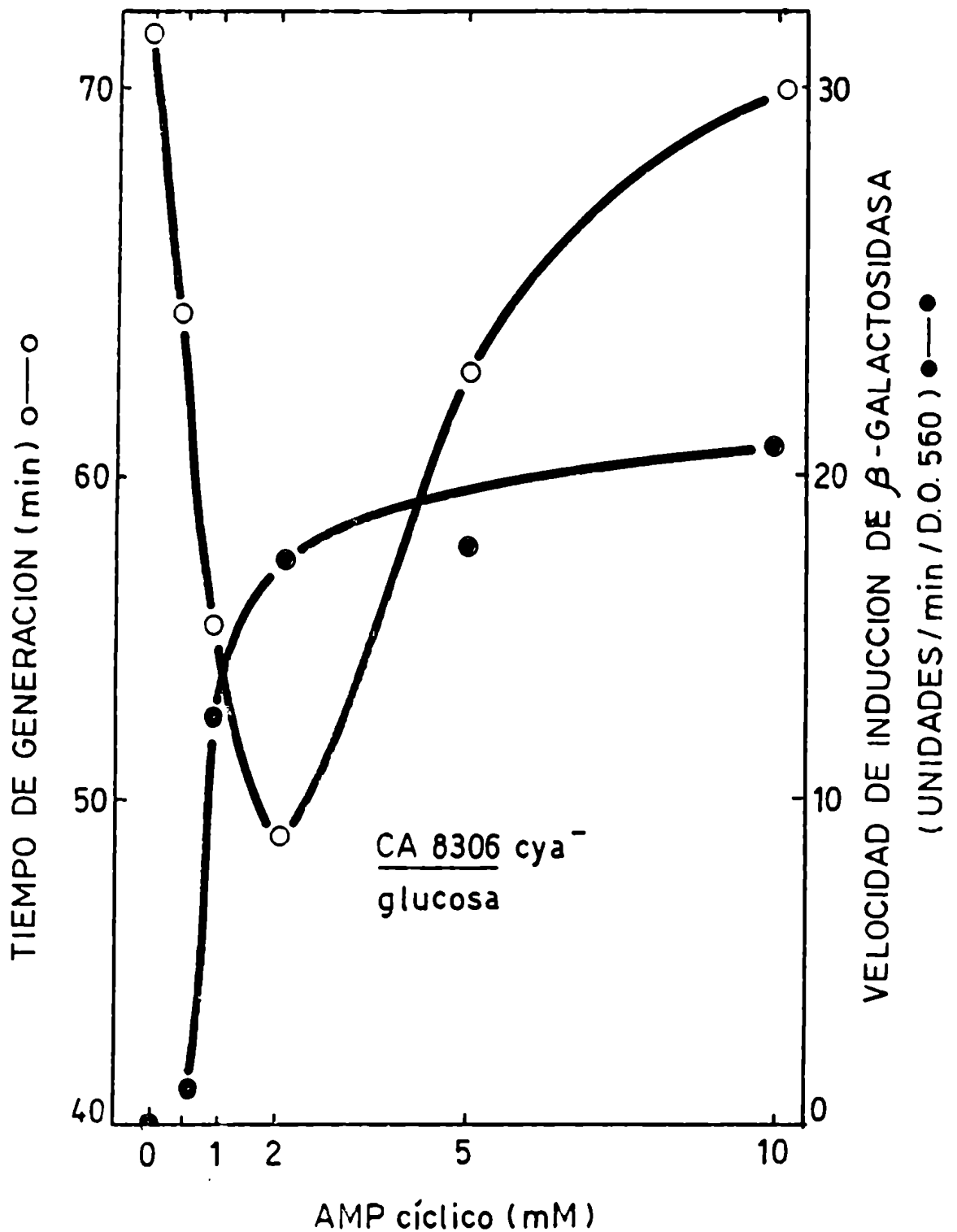


Fig.16 Efecto de la concentración de AMP cíclico sobre el tiempo de generación (○) y la velocidad de síntesis de β-galactosidasa (●) luego de la inducción con IPTG 1mM. Se utilizó una mutante que tiene una delección del gen que codifica para la adenilato ciclasa (CA8306, cya^{del}). Los cultivos se realizaron en medio mínimo de sales y glucosa, suplementado con: caseína ácidos 0,1%. Otras condiciones según indicado en Materiales y Métodos.

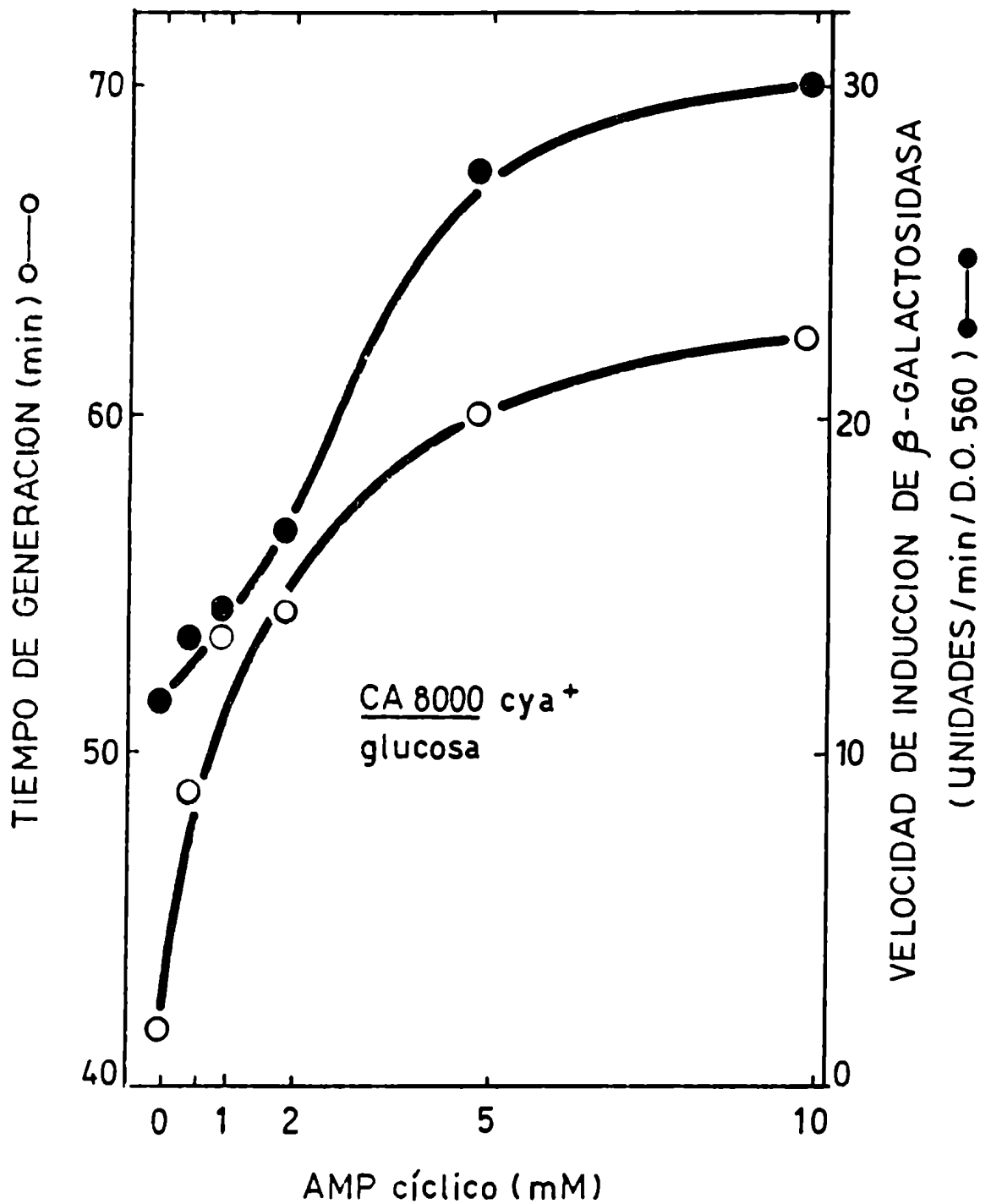


Fig.17 Efecto de la concentración de AMP cíclico sobre el tiempo de generación (o) y la velocidad de síntesis de β galactosidasa (●) en E.coli CA8000 (cya⁺). Como inductor se utilizó IPTG 1mM. Los cultivos se realizaron con glucosa como fuente de carbono, y fueron suplementados con caseína-aminoácidos C, 1%.

velocidad basal de síntesis de β galactosidasa aumenta a más del doble agregando AMP cíclico 5mM. Este es el fenómeno conocido como reversión de la represión catabólica permanente, el cual requiere concentraciones exógenas del nucleótido similares a la inhibición del crecimiento.

La cepa CA8306 también fue utilizada para aclarar el mecanismo por el cual la inhibición del crecimiento es observada solamente en glucosa y piruvato y no cuando la fuente de carbono es glicerol, succinato, malato o maltosa (figs.10, 11 y 13).

La inhibición del crecimiento podría ser debida a una inhibición de la actividad de una o más enzimas requeridas para la utilización de la glucosa y piruvato o, en cambio, a un fenómeno más general, que involucrara por ejemplo, el transporte a través de la membrana o la síntesis de macromoléculas (DNA, RNA, proteínas), etc. El hecho de que el AMP cíclico carece de efecto en E.coli Hfr 3000 cultivada en glicerol o succinato parecería favorecer la primer hipótesis. No obstante, otra explicación posible para este comportamiento sería que los niveles endógenos de AMP cíclico en células cultivadas en glicerol o succinato ya sean lo suficientemente altos como para saturar el mecanismo de regulación del crecimiento, aún en ausencia de AMP cíclico exógeno agregado al medio de cultivo.

El experimento de la fig.18 permite distinguir entre estas posibilidades. La mutante CA8306 (cya^{del}) fue cultivada en glicerol como fuente de carbono y energía,

en presencia de cantidades variables de AMP cíclico. En ausencia del nucleótido, la bacteria no es capaz de crecer, puesto que la enzima glicerol kinasa requiere la presencia del complejo CAP-AMP cíclico para su síntesis. Con concentraciones pequeñas del nucleótido (0.1mM) este tipo de requerimiento es cubierto y el crecimiento es óptimo (fig.18). Con cantidades mayores de AMP cíclico aparece la inhibición del crecimiento.

Por el contrario, en la cepa parental (CA8000, cya⁺) crecida en glicerol el AMP cíclico agregado no produce ningún efecto, ya sea sobre la síntesis de β galactosidasa como a nivel del crecimiento (fig.19).

Estos resultados indican que el hecho de que el AMP cíclico no tenga efecto sobre el crecimiento en ciertas fuentes de carbono (glicerol, succinato, etc.) es la consecuencia de los altos niveles endógenos del nucleótido presentes en estas condiciones en las cepas de tipo salvaje.

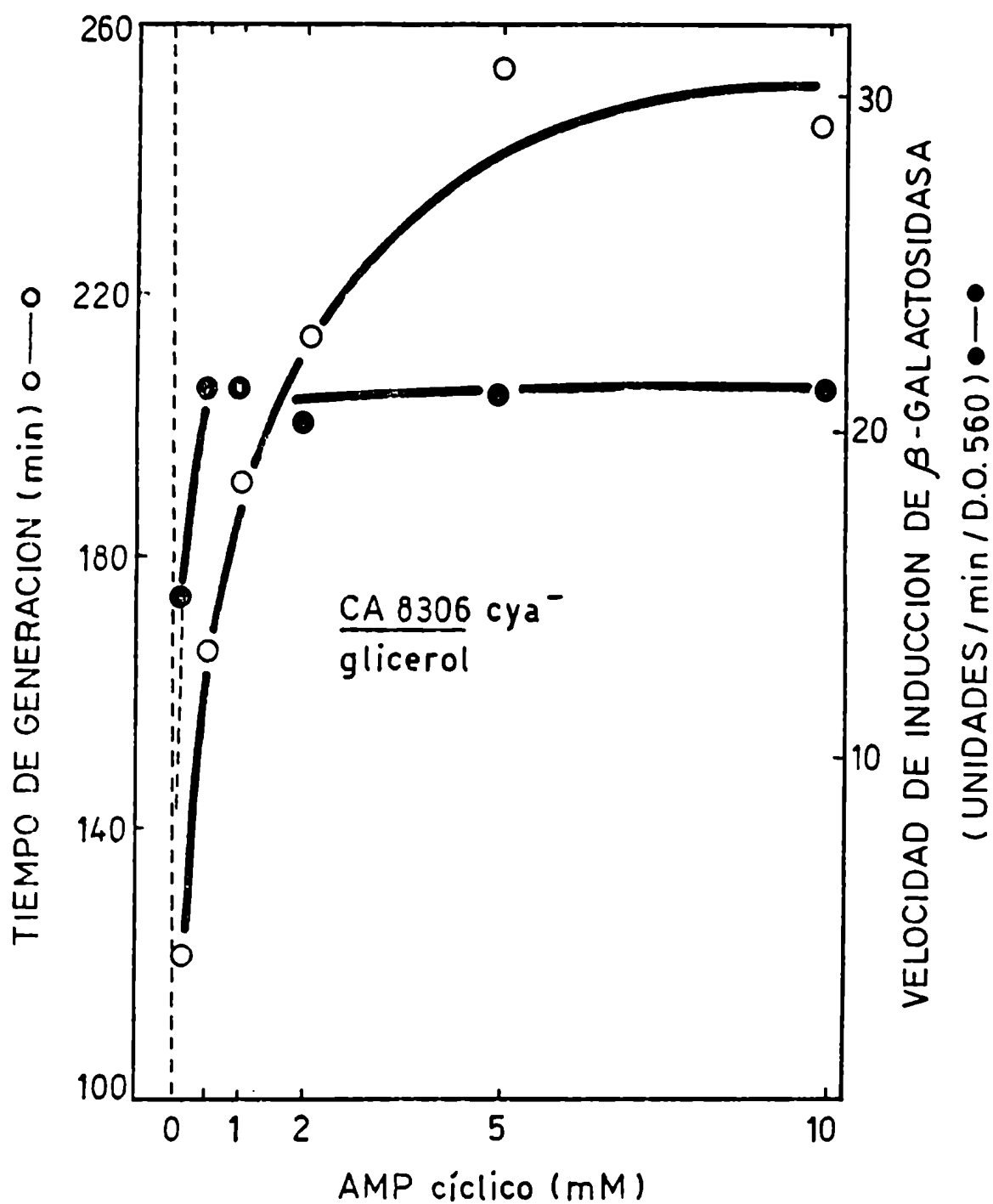


Fig.18 Mutante deficiente en adenilato ciclasa (CA8306, cya^{del}) cultivada con glicerol como fuente de carbono. Efecto de la concentración de AMP cíclico sobre el tiempo de generación (○) y la velocidad de síntesis de β -galactosidasa (●) luego de la inducción con 1mM IPTG. En ausencia de AMP cíclico exógeno esta mutante no es capaz de crecer en glicerol como fuente de carbono.

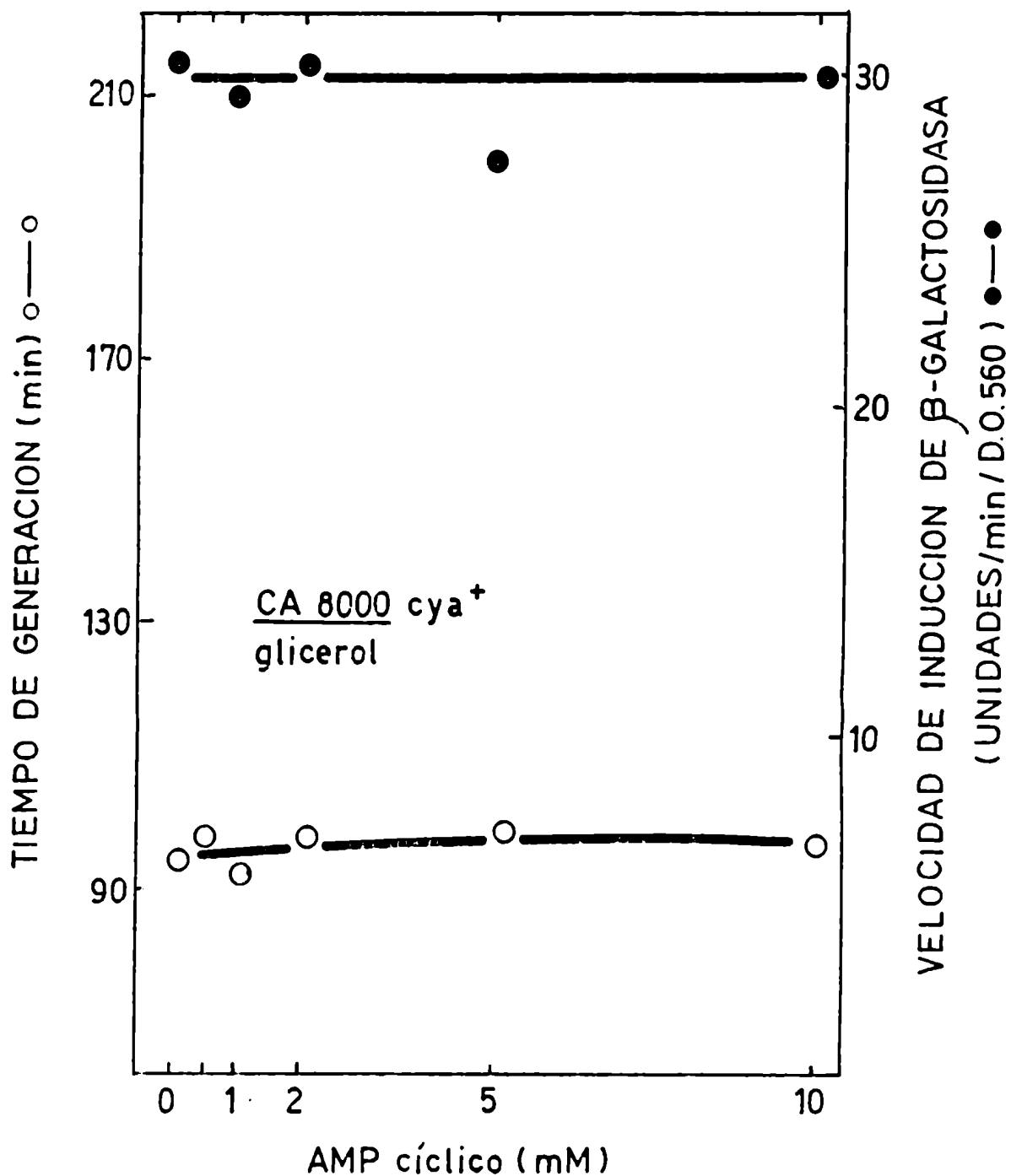


Fig.19 CA8000 (*cya*⁺) cultivada en glicerol como fuente de carbono. Efecto de la concentración de AMP cíclico agregado sobre el tiempo de generación (○) y la velocidad de síntesis de β-galactosidasa (●) luego de la inducción de la enzima con 1mM IPTG.

Mutantes con la función de CAP independiente del AMP cíclico

En todos los experimentos anteriores hemos estudiado la regulación del crecimiento agregando AMP cíclico exógeno a los cultivos. Esto tiene grandes inconvenientes, por ejemplo la baja permeabilidad celular al nucleótido, que obliga a utilizar concentraciones muy altas del mismo. Por otra parte, es difícil demostrar inequívocamente que no se trata de un efecto tóxico. En células de eucariotes se ha soslayado este problema, ya sea utilizando hormonas que modulan la actividad de la adenilato ciclasa (como la prostaglandina E₂) o bien utilizando inhibidores de la fosfodiesterasa para aumentar el nivel de AMP cíclico endógeno. En bacterias, no existe el control hormonal y la fosfodiesterasa no es inhibida por las metilxantinas pero, en cambio, contamos con una herramienta muy poderosa: la genética.

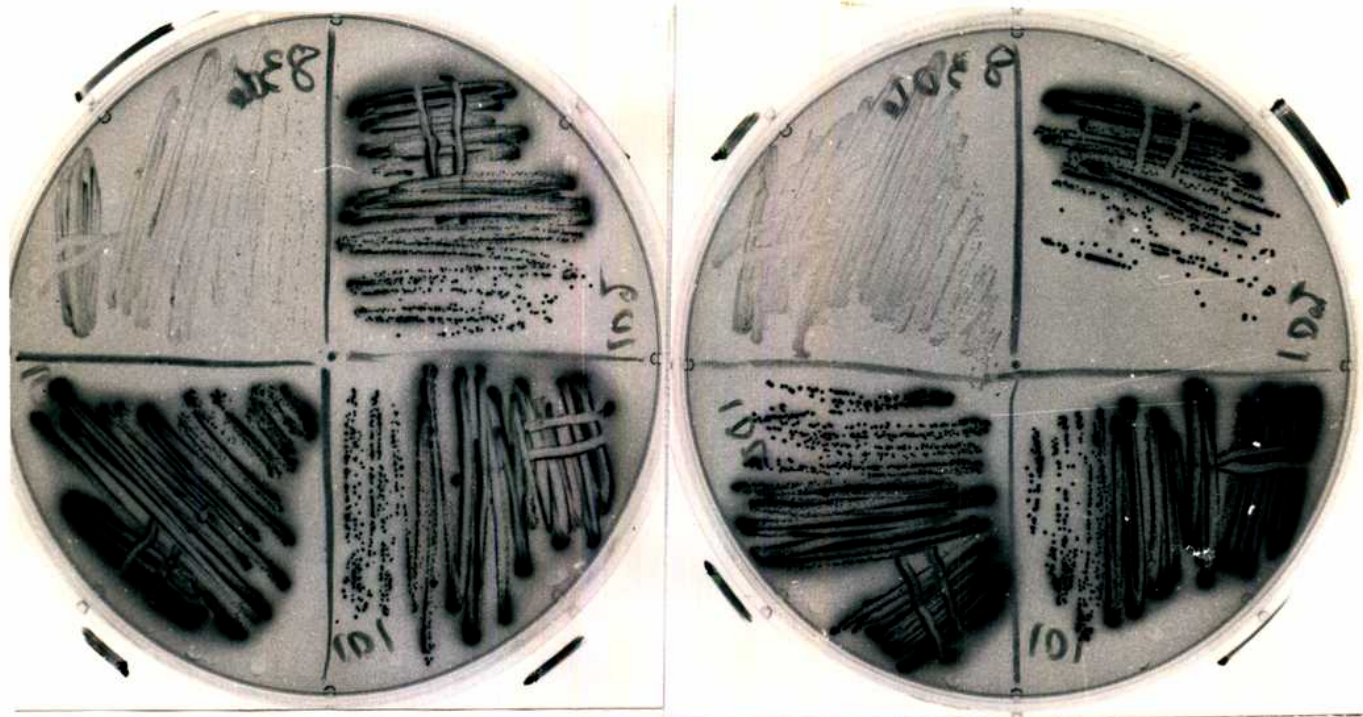
Una forma de evitar el agregado exógeno del nucleótido podría ser mediante la obtención de mutaciones que minimizaran su efecto. El enfoque que elegimos resultó ser muy sencillo. Como se recordará la cepa CA8306 posee una delección del segmento de DNA que codifica para la adenilato ciclasa y, en consecuencia, no puede revertir la mutación al genotipo *cap*⁺. No obstante, con baja frecuencia pueden aparecer revertantes capaces de utilizar nuevamente los azúcares cuya metabolización es controlada por el mecanismo de represión catabólica, que corresponden a mutaciones de la proteína receptora del AMP cíclico (CAP). En estas mutantes CAP no requiere del AMP cíclico para unirse a los promotores del DNA.

Para seleccionar estas mutantes se extendieron 10^8 bacterias de la cepa CA8306 (cya^{del}) en varias placas indicadoras de agar MacConkey conteniendo lactosa. Como ya se vio, esta cepa es incapaz de fermentar lactosa, maltosa o arabinosa. Sin embargo, luego de incubar las placas 48 hrs. a 37°C aparecieron algunas colonias de color rojo, sobre un césped de bacterias que no fermentaban la lactosa (color blanco). Se aislaron tres colonias lac^+ que representan mutaciones independientes, puesto que provienen de tres cultivos distintos de CA8306. Estas cepas se denominaron IIB 100, IIB 101, IIB 102. La mutante que sintetiza más β -galactosidasa resultó ser la IIB 100.

En la fig.20 puede verse que la cepa CA8306 (cya^{del} CAP^+) no fermenta la lactosa, maltosa y arabinosa, mientras que sus "revertantes" sí lo hacen. Como la frecuencia de mutaciones espontáneas múltiples es despreciable, es dable suponer que la mutación que produce este fenotipo es de características pleiotrópicas. Esta última propiedad de hecho descarta una alteración del promotor del lac operon que si bien también hubiera dado colonias capaces de fermentar lactosa en ausencia de AMP cíclico, sería incapaz de utilizar maltosa o arabinosa.

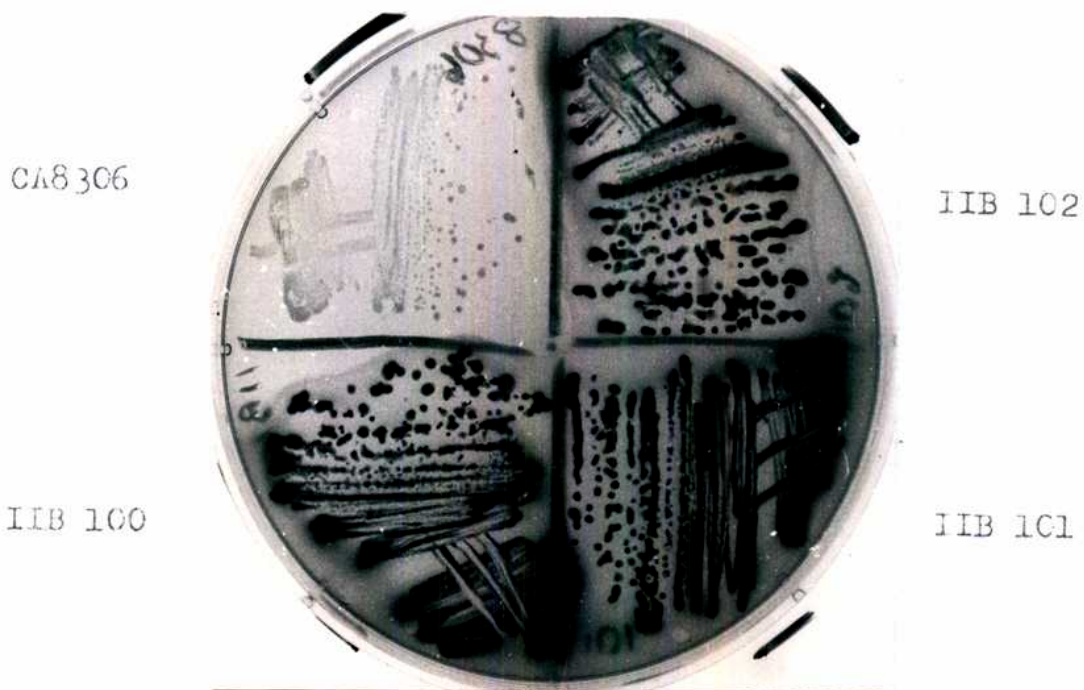
Como las tres cepas mantienen la delección en la adenilato ciclasa, la segunda mutación debe estar a nivel del mecanismo molecular a través del cual el nucleótido ejerce su acción. Tentativamente se puede localizar la mutación en la proteína receptora del AMP cíclico, la cual se vuelve parcialmente independiente del nucleótido (CAP^S o super CAP). Queremos destacar que aún no hemos podido

caracterizar bioquímicamente esta proteína CAP alterada para lo cual será necesario utilizar un sistema de transcripción traducción acoplada in vitro (sistema de Zubay). No obstante, J. Beckwith ha estudiado revertantes seleccionadas de igual forma y en todos los casos la mutación correspondió a la proteína CAP (comunicación personal). De todas formas, aunque nuestras mutantes correspondieran a otro nivel del mecanismo de acción del AMP cíclico (RNA polimerasa) ello no invalidaría las conclusiones que se han obtenido de los experimentos subsiguientes.



a

b



c

Fig.20 Placas indicadoras de medio de MacConkey en las que se ha sembrado las cepas CA8306 (portadora de una delección del gen de la adenilato ciclasa) y las mutantes IIB 100, IIB101 e IIB 102 obtenidas a partir de la CA8306. El medio contiene 2% de arabinosa (a) ó lactosa (b) ó maltosa (c). Las colonias de la serie IIB fermentan los tres azúcares y por lo tanto su mutación tiene un efecto pleiotrópico.

Caracterización de las mutantes independientes de AMP cíclico

Cuando a un cultivo de *E. coli* salvaje crecido en glicerol se le agrega glucosa, la síntesis de enzimas inducibles es reprimida (fig.21). Primero se ve una detención total de la síntesis de β -galactosidasa o represión transitoria y luego ésta se reanuda, pero a una velocidad de menos de la mitad respecto del cultivo control crecido en glicerol (represión catabólica permanente).

Cuando se realizó este experimento con la cepa IIB100 (cya^{del} cap^S), el agregado de glucosa no produjo represión catabólica transitoria ni permanente de la síntesis de β -galactosidasa (fig.22). Este experimento confirma que el AMP cíclico es un requerimiento absoluto para la represión catabólica.

Como puede observarse en la Tabla 7, la mutante IIB100 (cya^{del} crp^S) sólo produce un tercio de la β -galactosidasa que puede sintetizar la cepa cya⁺ cap⁺ de la cual deriva.

En el experimento de la fig.23 se investigó si la proteína receptora del AMP cíclico de la cepa IIB 100 aún era sensible al agregado del nucleótido (a pesar de ser independiente de éste en un 33%). Al agregar AMP cíclico la velocidad de síntesis de la β -galactosidasa aumenta hasta niveles semejantes a los de la cepa salvaje. En el caso de la cepa parental CA8306 (cya^{del} cap⁺), de la cual deriva IIB 100, en ausencia del nucleótido no se detecta síntesis de β -galactosidasa en ausencia de AMP cíclico. Por el contrario, cuando *E. coli* CA8000 (cya⁺ cap⁺) es crecida en iguales condiciones

que las anteriores (glicerol como fuente de carbono), los niveles endógenos de AMP cíclico ya son lo suficientemente altos como para que el agregado exógeno del nucleótido no modifique la velocidad de síntesis de β -galactosidasa (fig.

Resumiendo, en la mutante IIB 100 ($cya^{\text{del}} \text{ cap}^{\text{S}}$) no se observa represión catabólica y la síntesis de β -galactosidasa es parcialmente independiente del AMP cíclico, aunque el agregado del nucleótido puede aumentar esta síntesis basal.

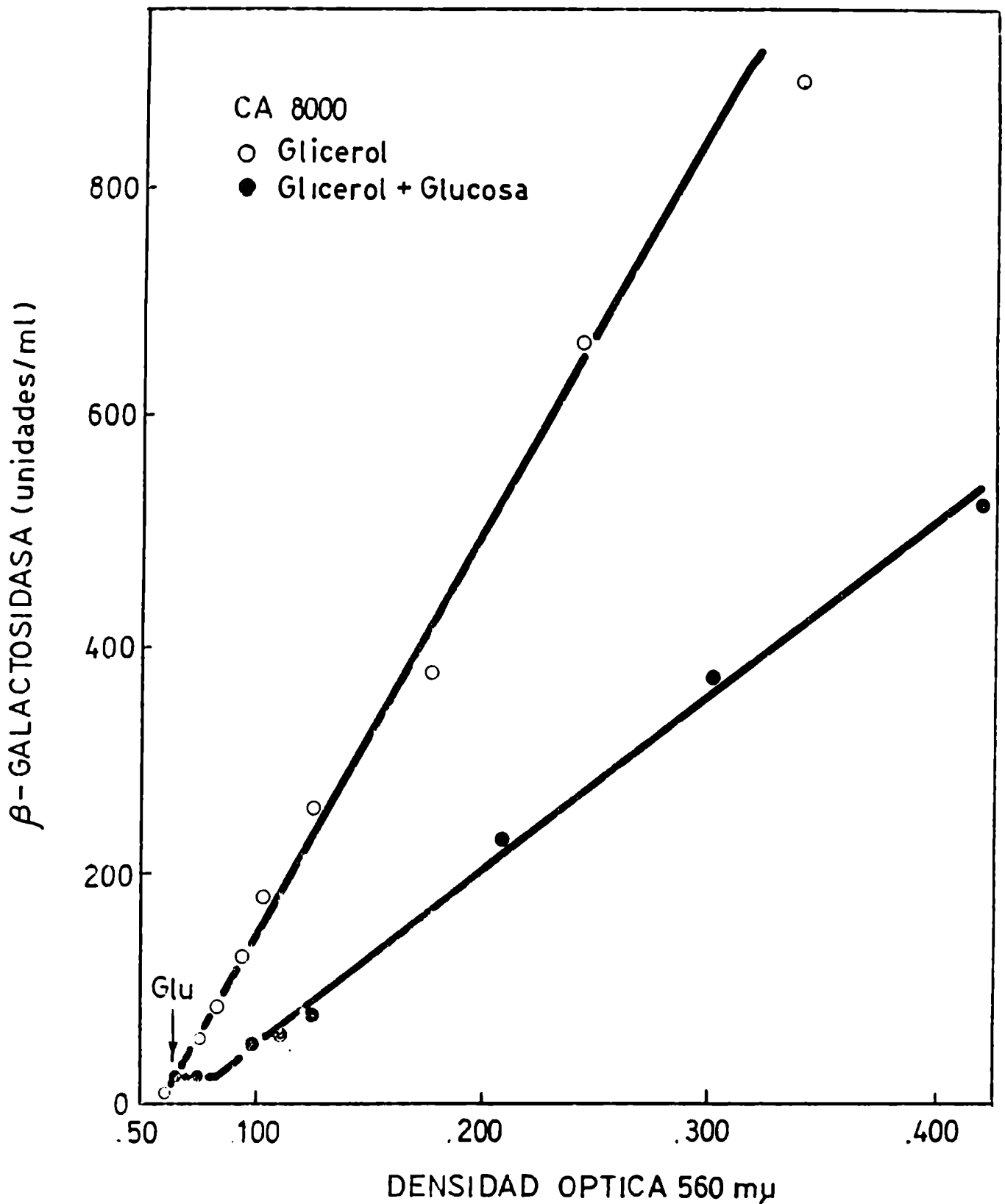


Fig. 21 Represión catabólica transitoria y permanente de la síntesis de β -galactosidasa en una cepa de E. coli de tipo salvaje (CA8000). Un cultivo creciendo en glicerol (○) fue dividido en dos mitades, a una de las cuales se le agregó glucosa 25mM (●) en el momento indicado por la flecha. Ambos cultivos recibieron IPTG 0.5mM al comienzo del experimento. Otras condiciones según detallado en Materiales y Métodos.

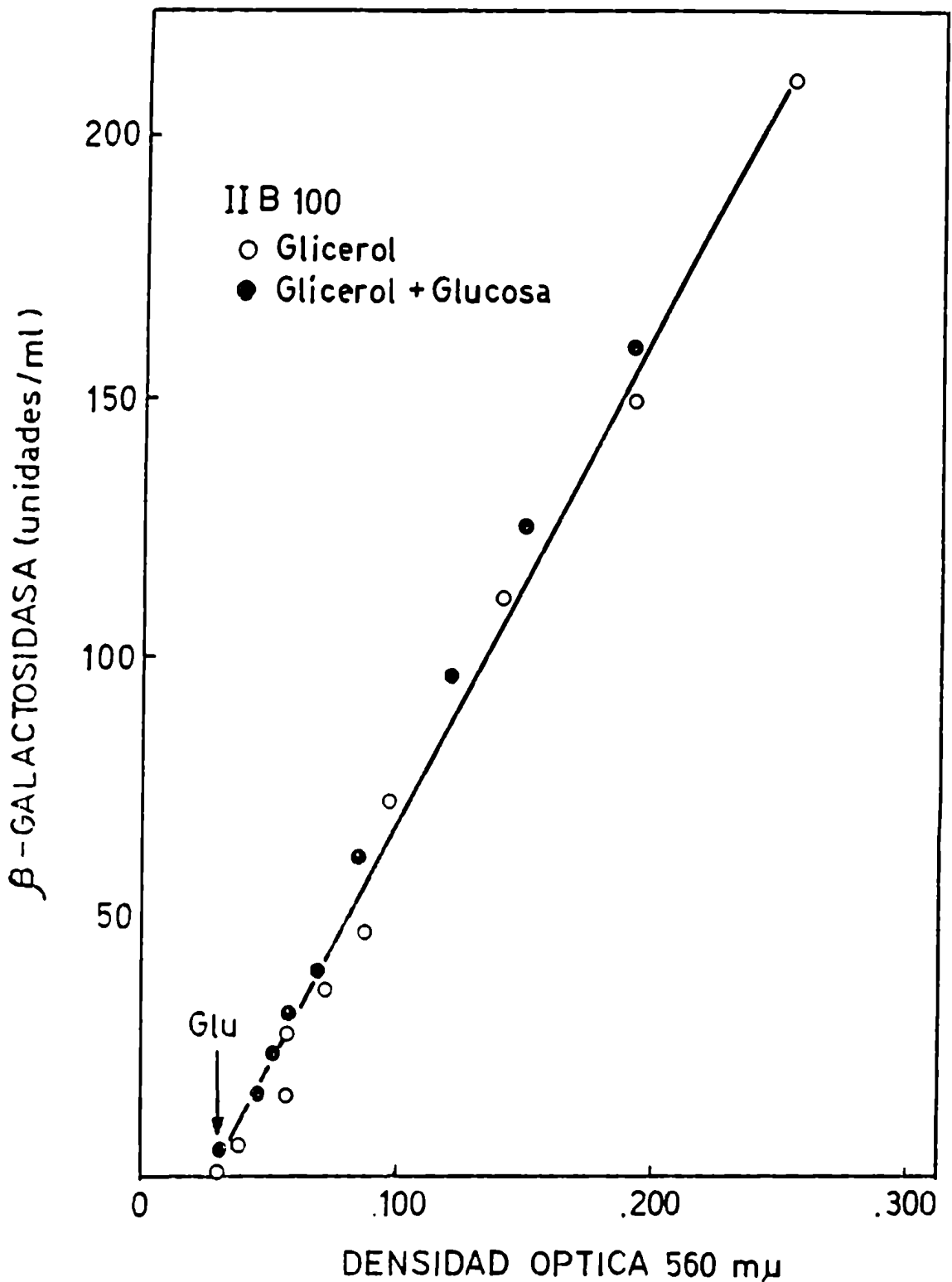


Fig.22 Efecto del agregado de glucosa sobre la síntesis de β -galactosidasa en la mutante IIB 100 (cya^{del} cap^S). ●—● cultivo realizado con glicerol como fuente de carbono y suplementado con casaminoácidos 0,1%. ○—○ igual al anterior excepto por el agregado de glucosa 25mM en el momento indicado por la flecha. Ambos cultivos contienen IPTG 0,5mM.

Tabla 7

Contenido de β -galactosidasa de las cepas
CA8000 ($cya^+ cap^+$) e IIB 100
luego de dos horas de inducción con IPTG

Cepa	Fuente de carbono	D.O. $560 m\mu$	U β -gal/ml	U β -gal/ml/ Unidad de D.O.	% de actividad
CA8000	glicerol 0,5%	.343	840	2440	100
CA8000	glicerol + glucosa 50mM	.433	520	1195	49
IIB 100	glicerol 0,5%	.298	213	825	33,8
IIB 100	glicerol 0,5% + glucosa 50mM	.193	160	830	34

Todos los cultivos se realizaron en medio mínimo con el agregado de 0,1% caseaminoácidos libres de vitaminas. La inducción de la enzima se realizó con 1mM IPTG.

β -GALACTOSIDASA (UNIDADES/ml / D.O. 560)

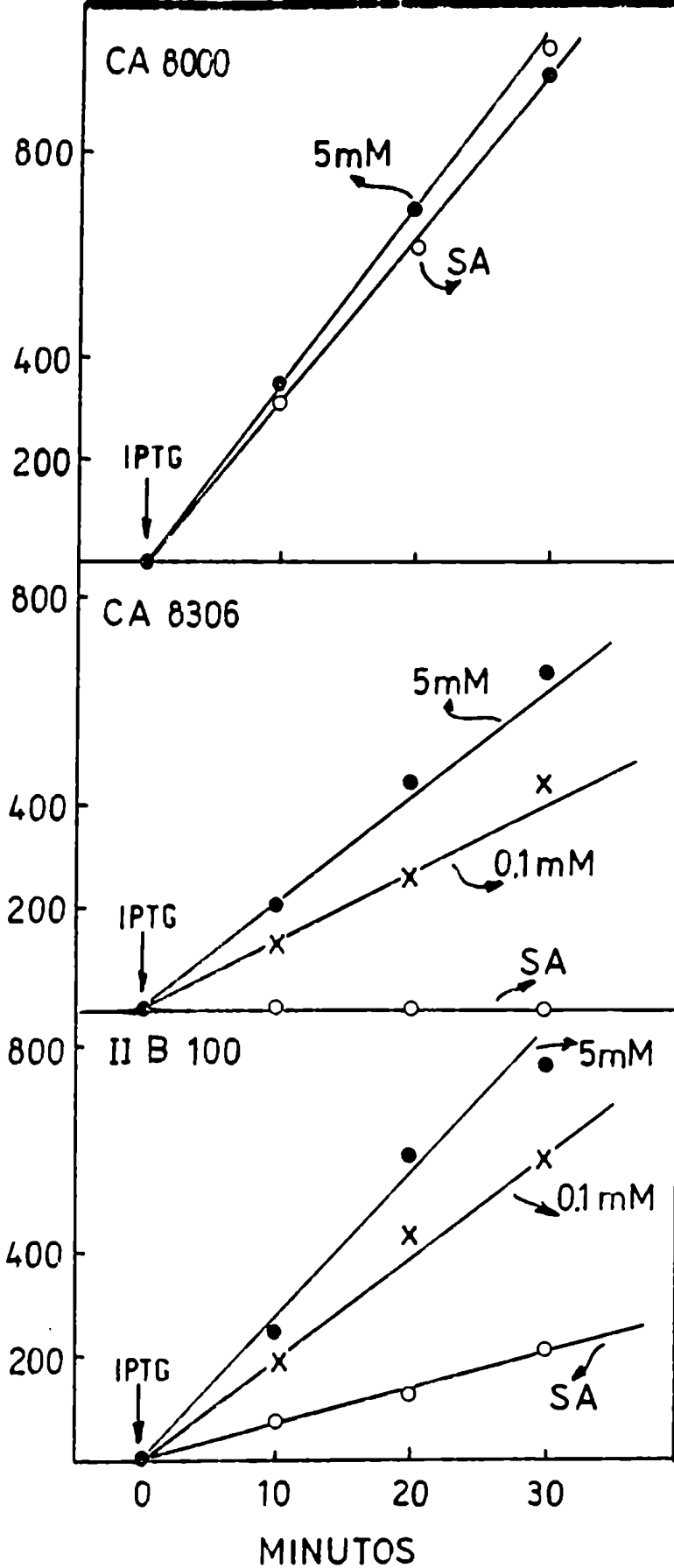


Fig. 23 Efecto del agregado de AMP cíclico exógeno sobre la síntesis de β -galactosidasa en las cepas CA8000 (tipo salvaje), CA8306 (delección del gen de adenilato ciclasa) e IIB 100 (*cya*^{del} *cap*^c). Todos los cultivos se realizaron con glicerol como fuente de carbono. En el momento señalado por la flecha se indujeron los cultivos con IPTG 1mM (○) sin adiciones (x) con 0.1mM cAMP (●) con 5mM cAMP. - 85 -

Experimentos de crecimiento con la mutante IIB 100

El crecimiento de la mutante IIB 100 ($cya^{\text{del}} cap^s$) se estudió en diversas condiciones. En el experimento de la fig.24, la mutante fue cultivada en medio mínimo con casamino ácidos y glicerol como fuente de carbono. En estas condiciones, el agregado de AMP cíclico 5mM prácticamente no modifica el crecimiento (tiempo de generación sin adiciones 46 minutos, con 5mM AMP cíclico 49 minutos).

Este comportamiento es semejante al de la cepa salvaje CA8000 ($cya^+ cap^+$), la que crece con 40 minutos de tiempo de duplicación y no es afectada por el agregado del nucleótido (fig.24).

Como se recordará, en las mutantes cya^- crecidas en glicerol el AMP cíclico es capaz de inhibir el crecimiento (fig.18). La IIB 100 también carece de adenilato ciclasa, pero como la función CAP es independiente del AMP cíclico, se comporta como si ya tuviera altos niveles endógenos del nucleótido (como las cepas cya^+ en glicerol).

La fig.25 muestra un experimento semejante al anterior en el que se utilizó glucosa como fuente de carbono. La cepa salvaje (CA8000, cya^+ , cap^+) es inhibida significativamente por el agregado de AMP cíclico 5mM (el tiempo de generación pasa de 30 minutos a 58 minutos). La IIB 100, en cambio, es insensible al nucleótido (tiempo de generación de 61 minutos sin agregados, 62 minutos con 5mM AMP cíclico). Es decir que esta cepa se comporta como si tuviera altos niveles de AMP cíclico endógeno a pesar de carecer de adenilato ciclasa.

Lo más notable del compartamiento de E.coli IIB100 es que, sin ninguna adición, el crecimiento es más lento en glucosa que en glicerol, como puede verse comparando las figs. 23 y 24.

En un medio de glucosa suplementado con casamino-ácidos, la mutante crece con la misma velocidad de una cepa salvaje a la que se hubiera agregado AMP cíclico en altas concentraciones (tiempo de generación 60 minutos, ver figs.15A y 25). En medio mínimo con glicerol y casamino-ácidos, la IIB 100 crece un poco más rápido, con una velocidad similar a la de una cepa salvaje crecida en iguales condiciones sin adición del nucleótido (tiempo de generación 40 minutos, ver fig.24).

Otro hecho interesante es que a pesar de que en la mutante IIB 100 la síntesis de β -galactosidasa es independiente de AMP cíclico sólo en un 33% (ver tabla 7) el crecimiento en glucosa está inhibido muy severamente, con un tiempo de generación igual al de una cepa salvaje al que se hubieran agregado concentraciones muy altas del nucleótido. Este fenómeno podría deberse a que esta mutante posee una proteína CAP alterada, cuya afinidad por los diversos promotores puede ser variable. Si la afinidad del factor CAP mutado por el promotor del lac operon fuera menor que por el o los promotores de los genes responsables de la inhibición del crecimiento, este comportamiento podría ser explicado.

En suma, por medio de una mutación que hace que la transcripción genética sea independiente del AMP cíclico se puede reproducir la inhibición del crecimiento en ausencia total del nucleótido.

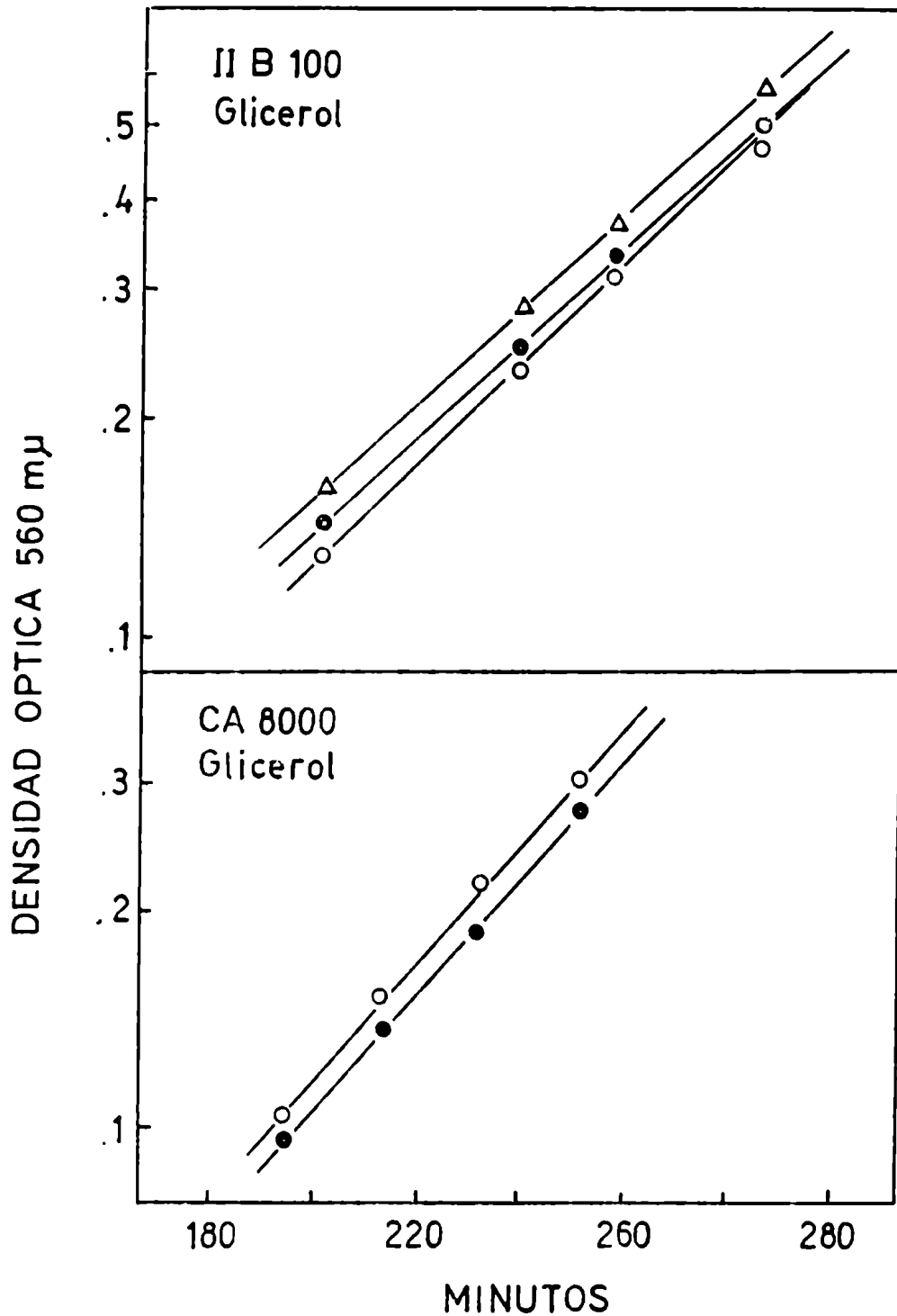


Fig.24 Crecimiento de las cepas IIB 100 y CA8000 en medio mínimo con glicerol como fuente de carbono. ○—○ sin agregados, △—△ con AMP cíclico 0.1mM, ●—● con el agregado de AMP cíclico 5mM. Todos los cultivos fueron suplementados con casaminoácidos 0.1% y cultivados a 37°C con una agitación de 200 ciclos/min.

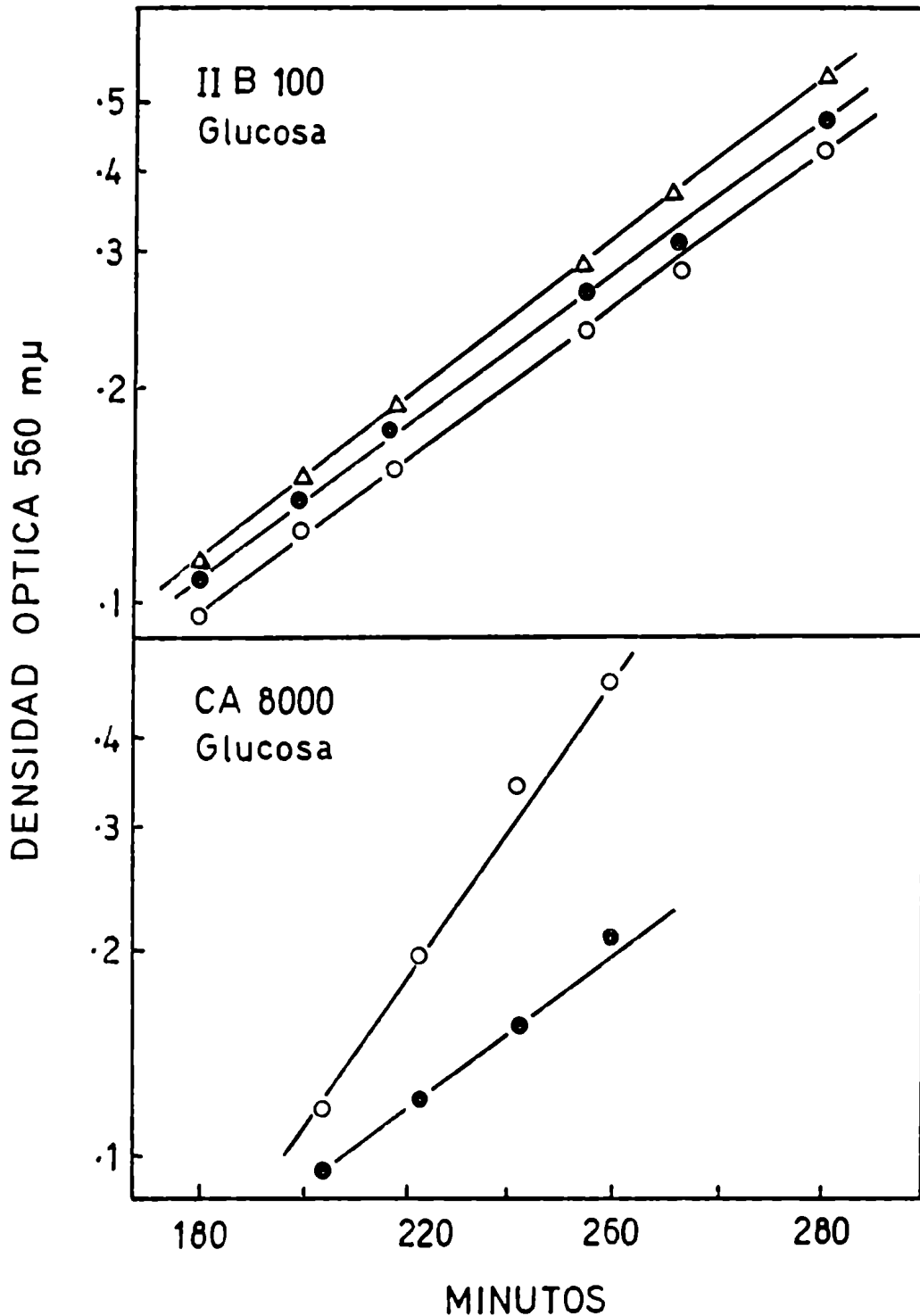


Fig. 25 Crecimiento de las cepas IIB 100 y CA8000 con glucosa como fuente de carbono. (○) — (○) cultivos sin adiciones, Δ — Δ con el agregado de AMP cíclico 2mM, ● — ● con el agregado de AMP cíclico 5mM. Todos los cultivos fueron suplementados con caseinócidos 0.1% y cultivados a 37°C con una agitación de 200 ciclos/min.

Acción del AMP cíclico sobre la permeabilidad celular

En los eucariotes se ha tratado de explicar la acción del AMP cíclico sobre el crecimiento celular a través de la alteración de la permeabilidad de la membrana celular a ciertos metabolitos (Holley, 1972; Kram y col., 1973). En E.coli también hemos encontrado que el AMP cíclico produce alteraciones en el transporte a través de la membrana.

Cuando estudiamos la incorporación de uracilo y de aminoácidos a la fracción insoluble en ácido tricloroacético luego de varias horas de marcación (fig.4A y B) no se observó ninguna diferencia entre los dos cultivos realizados en presencia o en ausencia de AMP cíclico. Cuando se repitió el mismo experimento pero usando las velocidades iniciales de incorporación luego de pulsos cortos, el resultado fue muy diferente. Como puede observarse en la fig.26 la incorporación de uracilo a la fracción insoluble en ácido era notablemente inhibida por el agregado de AMP cíclico 5mM, mientras que la incorporación de leucina ¹⁴C no era modificada.

Una disminución tan importante de la síntesis de RNA de rápido marcado (fundamentalmente RNA mensajero) no es compatible con una síntesis de proteínas normal. Este hecho nos llevó a pensar en la posibilidad de que la inhibición de la incorporación de uracilo en pulsos cortos se debiera a una disminución de la permeabilidad celular al precursor y no a una alteración de la síntesis de RNA mensajero.

Esto fue confirmado estudiando la incorporación del nucleótido a la fracción ácido soluble. En el experimento de la fig.27 las células crecidas con glucosa en presencia o en ausencia de AMP cíclico exógeno, fueron sometidas a pulsos de Uracilo H³. En alícuotas idénticas se midió la incorporación total a las células (filtrando rápidamente a través de filtros de nitrocelulosa y lavando con medio de cultivo) y la incorporación insoluble en TCA 5%. La diferencia entre ambas es la fracción soluble. La incorporación de uracilo al pool soluble está disminuída un 60% en las células crecidas con AMP cíclico, confirmando la inhibición del transporte de uracilo. Este fenómeno, que ha sido ampliamente estudiado por N. P. Judewicz en su tesis de doctorado (1974), no parece tener una relación causa-efecto con la inhibición del crecimiento producida por el nucleótido cíclico.

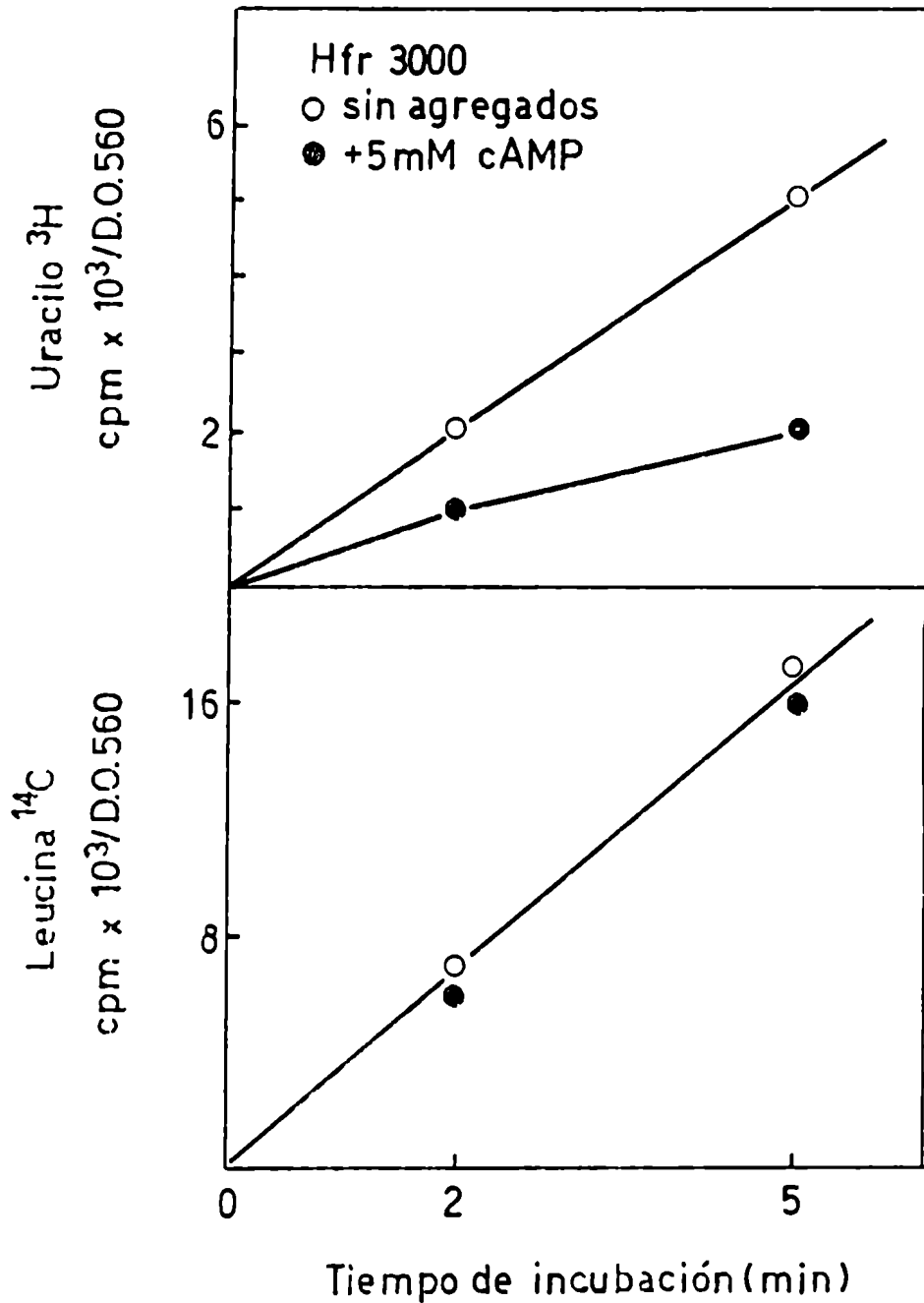


Fig. 26 Incorporación de uracilo ^3H y Leucina ^{14}C a la fracción insoluble en TCA 5%. Se utilizaron cultivos de E.coli Hfr 3000 en medio mínimo-glucosa. ○—○ sin adiciones, ●—● con 5mM AMP cíclico agregado al cultivo 3 horas antes del experimento. Por detalles experimentales ver **Materiales y Métodos**.

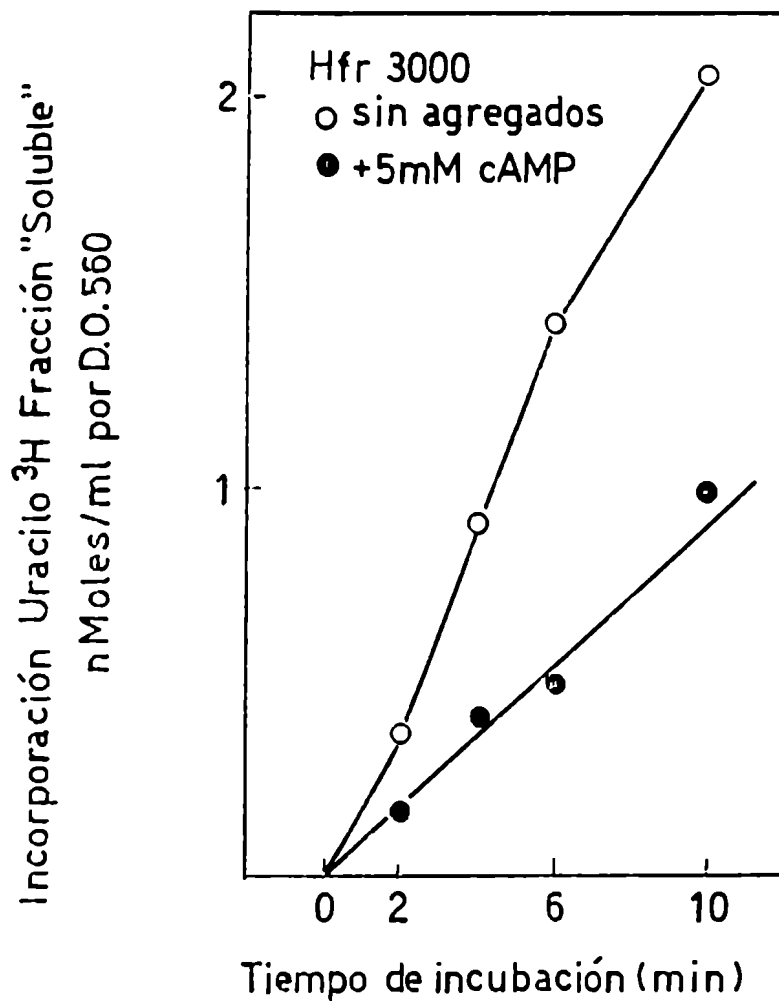


Fig. 27 Incorporación de uracilo ³H a la fracción ácido soluble. Se utilizaron cultivos de E. coli Hfr 3000 crecidos en medio mínimo-glucosa en presencia (●) o en ausencia (○) de AMP cíclico 5mM. Por detalles experimentales ver Materiales y Métodos.

DISCUSION

- La inhibición del crecimiento
- Posible efecto tóxico del AMP cíclico
- Activación e inhibición del crecimiento por el AMP cíclico
- El efecto del AMP cíclico en distintas fuentes de carbono
- Requerimiento de proteína receptora
- Mutaciones que imitan el efecto del AMP cíclico
- Algunas hipótesis de trabajo
- Otras interpretaciones
- Consideraciones finales

La inhibición del crecimiento

En eucariotes la proliferación celular es regulada por los niveles de AMP cíclico (ver revisión de Pastan y col., 1973). El mecanismo molecular de este control es de muy difícil estudio debido a la gran complejidad de las células superiores.

En procariotes se ha encontrado una regulación similar de la multiplicación celular (Judewicz, De Robertis y Torres, 1973; De Robertis, Judewicz y Torres, 1973). Diversas evidencias apoyan esta conclusión.

Cuando se agrega AMP cíclico 5mM a un cultivo de *E. coli* creciendo en medio mínimo de sales y glucosa, el tiempo de generación se alarga un 50%. Este fenómeno se observa tanto midiendo el crecimiento como aumento de la turbidez del cultivo (absorbancia a 560m μ), como con recuento de células viables en placas de agar nutriente.

La aparición de la inhibición no es inmediata a la adición del nucleótido, sino que debe transcurrir primero un período de tiempo de una generación.

El fenómeno es reversible y altamente específico para el AMP cíclico, puesto que el agregado de otros nucleóticos y nucleósidos de adenina no tiene ningun efecto.

Posible efecto tóxico del AMP cíclico

La primer posibilidad que se debe descartar es que esta inhibición sea de naturaleza tóxica. Esto es altamente improbable, como lo indican las siguientes evidencias:

- a) Con bacterias crecidas en ciertas fuentes de carbono (tales como succinato, glicerol, malato o maltosa) no se observa ningun efecto.
- b) La viabilidad de las bacterias no está alterada.
- c) La inhibición es rápidamente reversible.
- d) Es altamente específica para el AMP cíclico.
- e) No se observa la inhibición en mutantes deficientes en la proteína receptora del AMP cíclico (cap^-).

La inhibición máxima que se puede obtener es del 60% si los cultivos son crecidos con glucosa como fuente de carbono. La mitad de este valor ($I_{0,5}$) se obtiene a concentraciones de AMP cíclico que oscilan entre 1 y 3 μ M, dependiendo de la fuente de carbono (glucosa o piruvato).

El rango de concentraciones del nucleótido utilizado en este trabajo seguramente a primera vista parece enormemente alto comparado con las concentraciones intracelulares fisiológicas. Es un hecho ampliamente conocido que los niveles del AMP cíclico que producen grandes efectos en homogenatos, no son suficientes para obtener igual respuesta con células enteras (Robison, Butcher y Sutherland, 1971). Esto es debido a la baja permeabilidad

de la membrana celular a los nucleótidos y otros compuestos fosforilados. Con todo, los nucleótidos cíclicos cruzan las membranas biológicas con mayor facilidad que sus derivados no cíclicos (Price y col., 1967; Nath y col., 1973).

Para superar el obstáculo impuesto por la membrana celular al AMP cíclico, en eucariotes se utiliza el N⁶, 2'-O-dibutiril AMP cíclico, pero este derivado no tiene actividad biológica en bacterias. La relativa impermeabilidad al nucleótido hace necesario el uso de niveles extracelulares altos. Por otra parte, éstos están dentro del rango de concentraciones de AMP cíclico exógeno requeridas para revertir la represión catabólica permanente (Perlman y col., 1969, ver además fig.17 de esta tesis), eliminar el período de latencia de la diauxia (Ullman y Monod, 1968) o disminuir la actividad de la glutaminasa A y la glutamato sintasa (Prusiner y col., 1973) en E.coli.

Activación e inhibición del crecimiento por el AMP cíclico

El hecho de encontrar una inhibición del crecimiento por el AMP cíclico en bacterias resultaba paradójico, puesto que con anterioridad había sido descrito que la adición de bajas concentraciones del nucleótido era capaz de estimular el crecimiento en mutantes deficientes en adenilato ciclasa (Perlman y Pastan, 1969b). Para clarificar la ambigüedad de dos efectos opuestos sobre el crecimiento celular mediados por el mismo nucleótido, se realizaron una serie de experimentos con una mutante de E.coli que tiene una delección del gen de la adenilato ciclasa (CA8306, *cya*^{del}). Cuando esta bacteria es crecida en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono (fig.16), la adición de AMP cíclico al medio de cultivo en concentraciones de hasta 2mM resulta en una estimulación del crecimiento. No obstante, con concentraciones mayores se vuelve a observar una severa inhibición de la multiplicación celular. Estos resultados explican la coexistencia de dos efectos antagónicos: el nucleótido es requerido en múltiples funciones celulares y a bajas concentraciones mejora el crecimiento. En las células de tipo salvaje cultivadas en glucosa, que contienen adenilato ciclasa y AMP cíclico endógeno, el crecimiento ya es óptimo y la adición del nucleótido sólo produce el efecto inhibitorio de la multiplicación celular.

El efecto del AMP cíclico en distintas fuentes de carbono

Uno de los hechos más llamativos es que el efecto es altamente dependiente de la fuente de carbono y energía utilizada para crecer los cultivos. En glucosa o piruvato la adición de AMP cíclico 5mM inhibe notablemente el crecimiento. En cambio, si se utiliza el glicerol, succinato o malato, el nucleótido no produce ninguna modificación.

Este fenómeno se podría explicar de dos formas:

- a) El efecto del AMP cíclico sería inhibir la actividad de una o varias enzimas requeridas para la metabolización de la glucosa y el piruvato, pero que no serían necesarias para la utilización del glicerol, el succinato o el malato.
- b) Que los niveles endógenos de AMP cíclico en E.coli cultivado en glicerol y succinato ya fueran lo suficientemente altos como para tener saturado el mecanismo por el cual actúa el nucleótido.

A favor de esta segunda hipótesis está el hecho de que los niveles de AMP cíclico en las bacterias dependen estrictamente de la fuente de carbono. En glicerol, succinato y malato la concentración intracelular es 10 veces mayor que en glucosa o piruvato (Makman y Sutherland, 1965; Pastan y Perlman, 1970; Peterkofsky y col., 1971). Como consecuencia de este hecho, en las últimas

fuentes de carbono se observa la represión catabólica de la síntesis de enzimas inducibles (ver tabla 6).

Para distinguir entre las dos posibilidades antedichas, se hicieron experimentos con E.coli CA8306, portadora de la delección del gen adenilato ciclasa, crecida en glicerol. Mientras que en una cepa de tipo salvaje (cya^+), cultivada en esta fuente de carbono, el agregado de AMP cíclico no produce ninguna modificación (fig.19), en la mutante cya^{del} hay una severa inhibición de la multiplicación celular (fig.18).

Como la única diferencia entre ambas cepas está en sus niveles endógenos de AMP cíclico, podemos concluir que el hecho de que no haya inhibición del crecimiento en glicerol en una cepa cya^+ , se debe a la alta concentración intracelular del nucleótido.

Requerimiento de proteína receptora

La inhibición del crecimiento bacteriano requiere la presencia de proteína receptora del AMP cíclico (CAP). En una mutante deficiente en CAP, no se observa ninguna modificación de la multiplicación celular al agregar el nucleótido (fig.15).

El complejo CAP-AMP cíclico es requerido por muchos operones para iniciar la transcripción (tabla 1) y actúa uniéndose a zonas específicas de los promotores (fig.1), lo que le permite a la RNA polimerasa reconocer su sitio de iniciación (Perlman y col., 1970; Arditti y col., 1970). Todos los efectos de AMP cíclico estudiados hasta el momento en bacterias ocurren a este nivel.

Han habido algunas comunicaciones según las cuales el nucleótido cíclico podría actuar a nivel de traducción: en experimentos en que se inhibía la síntesis de RNA con proflavina, la adición del nucleótido aumentaba la síntesis de ciertas enzimas (Atoud y Burger, 1970; Perlman y Fasten, 1969). En la actualidad estos resultados pueden interpretarse como un artificio debido al uso de proflavina, pues este agente intercalante tiene especial afinidad por los promotores de operones sensibles a la represión catabólica y su inhibición de la síntesis de RNA es revertida por AMP cíclico (Sankaran y Fogell, 1973).

El hecho de que la inhibición del crecimiento requiera el factor CAP, sugiere que el nucleótido actúa a nivel de la transcripción genética, y no a través de la modulación de la actividad de una enzima preformada.

Mutaciones que imitan el efecto del AMP cíclico

La regulación de la multiplicación bacteriana por el AMP cíclico se ha podido demostrar también sin necesidad de agregar el nucleótido a concentraciones altas en el medio de cultivo. Para ello se utilizó una mutante cuya transcripción es parcialmente independiente de AMP cíclico. Se trata de E.coli IIB 100, obtenida como una mutante espontánea de una cepa con una delección del gen para la adenilato ciclasa. Dicha mutante es capaz de fermentar lactosa, arabinosa y maltosa en completa ausencia de AMP cíclico (puesto que no contiene adenilato ciclasa). Probablemente la mutación afecte a la proteína CAP, la que no requeriría AMP cíclico para poder unirse a los promotores de operones sensibles a la represión catabólica.

Cuando se estudió el crecimiento de la mutante IIB 100, se vio que el agregado de AMP cíclico no modifica la velocidad de multiplicación ni en glucosa ni en glicerol, a pesar de ser una cepa que carece de adenilato ciclasa y AMP cíclico. El hecho más notable de esta cepa, es que crece más lentamente en glucosa que en glicerol (figs. 23 y 24). Aún en ausencia de AMP cíclico, el crecimiento en glucosa es inhibido por la introducción de una mutación que mimetiza los efectos del AMP cíclico sobre la transcripción del material genético.

Algunas hipótesis de trabajo

Estos resultados llevan a pensar, como mera hipótesis de trabajo, en la posibilidad de que en *E. coli* existiera una (o varias) "proteína reguladora del crecimiento", cuya expresión esté controlada a nivel de transcripción por la cantidad de complejo CAP-AMP cíclico disponible. Considerando las distintas condiciones experimentales:

- a) en glucosa los niveles endógenos del nucleótido son bajos, por lo cual la hipotética "proteína reguladora" se expresaría poco. La adición exógena del AMP cíclico puede aumentar su expresión e inhibir el crecimiento.
- b) en glicerol, succinato o malato, la cantidad de "proteína reguladora" presente alcanzaría para tener inhibido al máximo el crecimiento, y la adición exógena del nucleótido no produce ninguna modificación.
- c) en una cepa deficiente en adenilato ciclasa crecida en glicerol, no hay AMP cíclico disponible para unirse a CAP, por lo cual la expresión de la "proteína reguladora" sería baja y susceptible de ser aumentada por el agregado del nucleótido al cultivo.
- d) en la mutante IIB 100, donde la transcripción es independiente de AMP cíclico, la hipotética "función reguladora" se expresaría lo suficiente como para saturar el mecanismo que modula el crecimiento. En consecuencia, éste no es modificado por el agregado del nucleótido al medio de cultivo y el crecimiento en glucosa sin adiciones se ve disminuído respecto del de una cepa salvaje.

Si bien esta "proteína reguladora" es solamente una hipótesis de trabajo, su existencia es pasible de estudio experimental. En efecto, según este modelo se puede predecir la posibilidad de seleccionar, a partir de la IIB 100 mutantes capaces de crecer rápidamente en glucosa, que mantengan la delección del gen *cya* y la transcripción independiente de AMP cíclico. La nueva mutación corresponderá a la hipotética "proteína reguladora" del crecimiento. Estudios en este sentido han comenzado en nuestro laboratorio.

Otra posibilidad que debe examinarse, es que el aumento de CAP-AMP cíclico cause una síntesis descontrolada de todas las proteínas sensibles a la represión catabólica, con lo cual la bacteria se llenaría de proteínas innecesarias, malgastando energía y creciendo más lentamente. A primera vista, esta explicación parece más sencilla, pero no toma en cuenta un hecho fundamental: todos los operones regulados por el AMP cíclico tienen un doble control. Como se vio en la fig.2, además del control positivo inespecífico dado por el complejo CAP-AMP cíclico cada operon tiene un control propio, dado por la interacción repressor-regulador (que explica los fenómenos conocidos como inducción y represión enzimática) que permite la transcripción genética únicamente cuando las enzimas son imprescindibles (por revisión ver Epstein y Beckwith, 1969). Por otra parte los niveles endógenos de AMP cíclico en glicerol o succinato ya son muy elevados, y esta interpretación debería admitir que en estas fuentes de carbono también se sintetizarían proteínas innecesarias, lo que es sumamente improbable.

Otras interpretaciones

Recientemente Ackerman y col. (1973) han comunicado que la acumulación extracelular de metilglioxal, estimulada por AMP cíclico, produciría muerte celular en cultivos de E.coli crecidos en xilosa como fuente de carbono. Este fenómeno no está relacionado con el descrito en este trabajo puesto que:

- a) la viabilidad celular no está alterada.
- b) nuestro efecto se observa también a densidades celulares bajas (1×10^7 células/ml).
- c) las bacterias crecidas en glucosa con AMP cíclico no acumulan metilglioxal en el medio de cultivo, midiendo éste con el método de la dinitrofenilhidrazina.

Consideraciones finales

En eucariotes se han hecho muchos trabajos tratando de aclarar el mecanismo de acción del AMP cíclico sobre el crecimiento celular. Una de las hipótesis que ha recibido mayor atención es que la regulación del crecimiento dependa de la velocidad de transporte de nutrientes a través de la membrana celular (Holley, 1972; Tomkins, 1973).

La composición de la superficie celular de células transformadas es modificada por el agregado de dibutilil AMP cíclico, produciéndose cambios en la aglutinabilidad por lectinas (Hsieh y col., 1971b), en la composición de glicoproteínas (Roberts y col., 1973) y la expresión de los antígenos tumorales (Kurth y col., 1973).

Coincidiendo con estos cambios estructurales la funcionalidad de la membrana también es modificada. El nucleótido cíclico es capaz de inhibir el transporte de timidina, uridina, leucina y glucosa (Hauschka y col., 1972; Kranz y col., 1973 a y b; Grimes y Schroeder, 1973; Rozengurt y col., 1973). No obstante, algunos cambios de permeabilidad observados en células transformadas o estimuladas con suero son independientes de AMP cíclico (Gazdar y col., 1972; Jiménez de Asúa y col., 1974).

Si bien se han hecho numerosos estudios, ninguno de ellos ha demostrado que la inhibición del transporte de metabolitos sea la causa de la disminución de la proliferación celular.

Nosotros hemos encontrado que en *E. coli* crecida en presencia de AMP cíclico el transporte de uracilo está notoriamente disminuído. Esto es consistente con otros cambios producidos por el nucleótido a nivel de la superficie celular en procariotes (Yokota y Gots, 1970; Wise y col., 1973; Patrick y Dobrogosz, 1973). El uracilo no es requerido por *E. coli* para su crecimiento y por lo tanto la disminución de su transporte no explica la regulación de la multiplicación bacteriana. No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que el transporte de otros nutrientes esté también afectado.

Los resultados presentados en esta tesis indican que al igual que en los organismos eucarióticos, en los procariotes existe un mecanismo de regulación de la multiplicación celular mediado por el AMP cíclico. Los mecanismos de regulación elementales parecen tener una gran persistencia a través de la evolución, seguramente porque le confieren tanto al fibroblasto como a *E. coli* un gran poder de adaptación a las condiciones del medio ambiente. Siendo una bacteria un sistema experimental mucho más sencillo que una célula de mamífero, creemos que la continuación de estos estudios podrá ser de utilidad para comprender el mecanismo molecular que regula la proliferación celular.

CONCLUSIONES

- 1) El AMP cíclico es capaz de inhibir la velocidad de crecimiento de E.coli. Los tiempos de generación de la cepa prototrofa Hfr 3000 crecida en medio mínimo de sales y glucosa aumentan de 60 minutos a 90 minutos por el agregado de AMP cíclico 5mM.
- 2) Este fenómeno se observa tanto midiendo el crecimiento como un aumento de la turbidez del cultivo como determinando el número de células viables.
- 3) La aparición de la inhibición no es inmediata a la adición del nucleótido, sino que debe transcurrir primero un período de tiempo del orden de una generación.
- 4) El efecto es reversible y altamente específico para el AMP cíclico, puesto que no fue observado cuando el nucleótido cíclico fue reemplazado por 5'AMP, ADP, ATP o adenosina.
- 5) La mitad de la inhibición máxima se obtiene agregando concentraciones del nucleótido que oscilan entre 1 y 3mM, dependiendo de la fuente de carbono utilizada.

- 6) La modificación de la proliferación bacteriana se observa solamente en aquellas fuentes de carbono que, como la glucosa y el piruvato, producen represión catabólica de la síntesis de β -galactosidasa. La limitación de la síntesis de esta enzima se debe a los bajos niveles intracelulares de AMP cíclico en esos cultivos. Por el contrario, en glicerol, succinato o malato, los niveles endógenos del nucleótido son 10 veces más altos y no existe represión de la síntesis de β -galactosidasa. En estas últimas fuentes de carbono, el agregado de AMP cíclico endógeno no produce inhibición del crecimiento.
- 7) Si bien una cepa de tipo salvaje creciendo en glicerol no es afectada por el nucleótido, en idénticas condiciones la multiplicación de una mutante deficiente en adenilato ciclasa es severamente inhibida por el AMP cíclico. Esto indica que el efecto del agregado exógeno del nucleótido está condicionado por los niveles intracelulares endógenos del nucleótido.
- 8) Una mutante portadora de una delección del gen que codifica la adenilato ciclasa, requiere el agregado exógeno del nucleótido cíclico para su crecimiento óptimo. Usando glucosa como fuente de carbono, con 2mM AMP cíclico se obtiene la máxima

velocidad de multiplicación. No obstante, con mayores concentraciones del nucleótido también se obtiene el efecto inhibitorio.

- 9) El mecanismo de regulación del crecimiento parece operar a nivel de la transcripción genética, más específicamente en la interacción entre el complejo proteína receptora-AMP cíclico y los promotores del DNA. En efecto, mutantes deficientes en la proteína receptora del AMP cíclico (CAP⁻) no responden al agregado del nucleótido.
- 10) La regulación del crecimiento se ha podido demostrar aún en ausencia de AMP cíclico agregado al medio de cultivo. Para ello, se seleccionó una mutante cuya transcripción es parcialmente independiente del nucleótido y que además es portadora de una delección del gen adenilato ciclasa. Esta cepa crece más lentamente en glucosa que en glicerol y no responde al agregado del nucleótido exógeno.
- 11) Estos resultados indican que el control de la proliferación celular por el AMP cíclico es un fenómeno muy extendido en la escala zoológica, no sólo limitado a las células de eucariotes, sino que también afecta a organismos mucho más simples como las bacterias.

BIBLIOGRAFIA

- Aboud, M. y Burger, M. (1970), Biochem. Biophys. Res. Comm., 38, 1023.
- Ackerman, R.S.; Cozzarelli, N.R. y Epstein, W. (1973), J. Bacteriol., en prensa.
- Anderson, J.E.; Schneider, A.B.; Emmer, M.; Perlman, R. y Pastan, I. (1971), J. Biol. Chem., 246, 5929.
- Anderson, W.; Johnson, G.S. y Pastan, I. (1973), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 1055.
- Anderson, W. y Pastan, I. (1973), Biochem. Biophys. Acta, 032, 577.
- Arditti, R.; Eron, L.; Zubay, G.; Tocchini-Valentini, G.; Conway, S. y Beckwith, J., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 35, 437. (1970).
- Beckwith, J.; Grodzicker, T. y Arditti, R. (1972) J. Mol. Biol., 59, 155.
- Brickman, E.; Soll, L. y Jon Beckwith (1973), J. Bacteriol., 116, 582.
- Buettner, M.J.; Spitz, E. y Rickenberg, H.V. (1973), J. Bacteriol., 114, 1068.

- Eirik, R.R. (1968), Nature 219, 1272.
- Ryfield, J.E. y Scherbaum, O.M. (1966), Anal.Biochem., 17, 434.
- de Crombrughe, B.; Chen, B.; Anderson, W.; Nissley, P.; Gottesman, M.; Pastan, I. y Perlman, R. (1971) Nature New Biol., 231, 139.
- de Crombrughe, B.; Chen, B.; Anderson, W.; Gottesman, M.; Perlman, R. y Pastan, I. (1971b), J.Biol.Chem., 246, 7345.
- De Robertis, E.M., Judewicz, N.D. y Torres, H.N. (1973) Biochem.Biophys.Res.Comm., 55, 758.
- Emmer, M.; de Crombrughe, B.; Pastan, I. y Perlman, R. (1970), Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 66, 480.
- Epstein, W. y Beckwith, J. (1969), Ann.Rev.Biochem., 37, 111.
- Epstein, W. y Kim, B. (1971), J.Bacteriol., 108, 639.
- Flisak, M.M. y Torres, H.N. (1973), J.Biol.Chem., 248, 4517.
- Gazdar, A.; Hatanaka, M.; Herberman, R.; Russel, E. e Ikawa, Y. (1972), Proc.Soc.Exp.Biol. and Med., 141, 1044.
- Gilman, A.G. (1970), Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 67, 305.

- Grimes, W. y Schroeder, J. (1973), J. Cell Biol., 56, 487.
- Grodzicker, T.; Arditti, R. y Eisen, H. (1972), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 366.
- Hauschka, P. V.; Everhart, L. P. y Rubin, R. (1972), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 3542.
- Holley, R. W. (1972), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 284C.
- Hong, J.; Smith, G. y Ames, B. N. (1971), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67, 290.
- Hsie, A. W. y Puck, T. T. (1971), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 358.
- Hsie, A. W.; Jones, J. y Puck, T. T. (1971b), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 1648.
- Illiano, G. y Cuatrecasas, P. (1972), Science, 175, 906.
- Ippen, K.; Miller, J.; Scaife, J. y Beckwith, J. (1968), Nature, 217, 825.
- Jacob, F. y Monod, J. (1961), Cold Spring Harbor Symp. of Quant. Biol., 26, 193.
- Jaquet, H. y Kepes, A. (1969), Biochem. Biophys. Res. Commun., 36, 84.
- Jiménez de Asúa, L.; Surian, E., Flawiá, K. M. y Torres, H. J. (1973), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 1388.

- Jiménez de Asúa, L.; Rozengurt, E. y Dulbecco, R. (1974), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, en prensa.
- Johnson, G.S.; Friedman, R.M. y Pastan, I. (1971), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 425.
- Johnson, G.S. y Pastan, I. (1971b), J. Nat. Cancer Inst., 47, 1357.
- Johnson, G.S. y Pastan, I. (1972), Nature New Biol., 235, 247.
- Johnson, G.S.; Morgan, W.D. y Pastan, I. (1972b), Nature, 235, 54.
- Judewicz, N.D.; De Robertis, E.M. y Torres, H.N. (1973), Biochem. Biophys. Res. Commun., 52, 1257.
- Krakow, J. y Pastan, I. (1973), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 2529.
- Kren, R.; Mamont, P. y Tomkins, G. (1973), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 1432.
- Kren, R. y Tomkins, G. (1973b), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 1659.
- Kurth, R. y Bauer, H. (1973), Nature New Biol., 243, 243.
- Magasanik, B. (1961), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 26, 249.

- Magasanik, B. (1970) en The Lactose Operon, J. Beckwith y D. Zipser Eds., Cold Spring Harbor Laboratory, pp 189.
- Makman, R. y Sutherland, E.W. (1965), J. Biol. Chem., 240, 1309.
- Mandelstam, J. (1962), Biochem. J., 82, 489.
- Miller, J.H. (1970), en the Lactose Operon; J. Beckwith y D. Zipser Eds., Cold Spring Harbor Laboratory, pp 173.
- Miller, J.H. (1972), Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Miller, Z.; Varmus, H.E.; Parks, J.; Perlman, R. y Pastan, I. (1971), J. Biol. Chem., 246, 2896.
- Monard, D.; Janacek, J. y Rickenberg, H.V. (1969), Biochem. Biophys. Res. Commun., 35, 584.
- Monard, D.; Janacek, J. y Rickenberg, H.V. (1970), en The Lactose Operon, J. Beckwith y D. Zipser Eds., Cold Spring Harbor Laboratory.
- Monod, J. (1941), Recherches sur la croissance des cultures bactériennes, Herman Edit., Paris.
- Nath, J. y Reoham, L.I. (1973), Exp. Cell. Res., 82, 73.
- Nissley, P.; Anderson, W.B.; Gallo, M. y Pastan, I. (1972), J. Biol. Chem., 247, 4264.

- Otten, J.; Johnson, G.S. y Pastan, I. (1971), Biochem. Biophys. Res. Commun., 44, 1192.
- Otten, J.; Johnson, G.S. y Pastan, I. (1972), J. Biol. Chem., 247, 7082.
- Otten, J.; Bader, J.P.; Johnson, G.S. y Pastan, I. (1972b), J. Biol. Chem., 247, 1632.
- Pastan, I. y Perlman, R. (1968), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 61, 1336.
- Pastan, I. y Perlman, R. (1969), J. Biol. Chem., 244, 2226.
- Pastan, I. y Perlman, R. (1970), Science, 169, 339.
- Pastan, I. (1973) en Current Topics in Biochemistry C.B. Anfinsen, R. Goliberger y A. Schechter, Eds., Academic Press, New York, pp 67.
- Pastan, I.; Anderson, W.B.; Carchman, R.A.; Willingham, M.C.; Russel, T. y Johnson, G.S. (1973) en Control of Cell Proliferation, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Patrick, J.M. y Dobrogosz, W. (1973), Biochem. Biophys. Res. Commun., 54, 55.
- Perlman, R. y Pastan, I. (1968), Biochem. Biophys. Res. Commun., 30, 656.
- Perlman, R. y Pastan, I. (1968b), J. Biol. Chem., 243, 5420.

- Perlman, R.; de Crombrughe, B. y Pastan, I. (1969), Nature, 223, 810.
- Perlman, R. y Pastan, I. (1969b), Biochem. Biophys. Res. Commun., 37, 151.
- Perlman, R.; Chen, B.; de Crombrughe, B.; Emmer, M.; Gottesman, M.; Varmus, H. y Pastan, I. (1970), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 35, 419.
- Peterkofsky, A. y Gazdar, C. (1971), Proc. Nat. Sci. USA, 68, 2794.
- Peterkofsky, A. y Gazdar, C. (1973), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 2149.
- Price, J. y Nayler, W.G. (1967), Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 166, 490.
- Prusiner, S.; Miller, R. y Valentine, R. (1972), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 2922.
- Hall, T.W.; Sutherland, E.W. y Bertinet, . (1967), J. Biol. Chem., 218, 483.
- Riggs, A.D.; Reiness, G. y Zubay, G. (1971), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 1222.
- Roberts, R.; Walker, A.; Cotorelli, M. (1973), Nature New Biol., 244,

- Robison, G.; Butcher, R.W. y Sutherland, E.W. (1971), Cyclic AMP, Academic Press, N.Y.
 - Rosbell, M. (1973) en Current topics in Biochemistry C.B. Anfinsen, R. Goldberger y A. Schechter, Eds., Academic Press, New York.
 - Rozengurt, E. y Jiménez de Asúa (1973), Proc.Nat.Acad. Sci.USA, diciembre 1973.
 - Sackern, C. y Pogell, B. (1973), Nature New Biol., 245, 257.
 - Schwartz, D. y Beckwith, J. (1970), en The Lactose Operon, J. Beckwith y D. Zipser, Eds., pp 417.
 - Sheppard, J.R. (1971), Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 68, 1310.
 - Sheppard, J.R. (1972), Nature New Biol., 236, 14.
 - Silverstone, A.; Magasanik, B.; Reznikoff, W.; Miller, J. y Beckwith, J. (1969), Nature, 221, 1012.
 - Silverstone, A.; Ardetti, R. y Magasanik, B. (1970), Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 66, 773.
 - Silverstone, A. y Magasanik, B. (1972), J.Bacteriol. 112, 1972.
- Sutherland, E.A. y Rall, T. (1958), J.Biol.Chem., 232 1077.

- Tomkins, G. (1973), en "Control of cell proliferation" Cold Spring Harbor Laboratory.
- Ullman, A. y Monod, J. (1968), Fed. Europ. Biochem. Soc. Letters, 2, 57.
- Varnus, H. E., Perlman, R. y Pastan, I. (1970), J. Biol. Chem., 245, 2259.
- Wallenfels, K. (1962), Methods in Enzymology, 5, 212.
- Willingham, M. C.; Cashman, R.; y Pastan, I. (1973), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 2906.
- Wise, E.; Alexander, S. y Powers, M. (1973), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 471.
- Yokota, T. y Gots, J. (1970), J. Bacteriol., 103, 513.
- Zubay, G. y Chambers, D. A. (1969), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 753.
- Zubay, G.; Schwartz, D. y Beckwith, J. (1970), Proc. Nat. Acad. Sci., 66, 104.

E. De Robertis

EdUARDO E. F. De Robertis

H. Torres

Héctor N. Torres