

Tesis Doctoral

Metabolismo y funciones de las poliaminas en bacterias

Cataldi, Angel Adrián

1986

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 Master's and 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:

Cataldi, Angel Adrián. (1986). Metabolismo y funciones de las poliaminas en bacterias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n1999_Cataldi

Cita tipo Chicago:

Cataldi, Angel Adrián. "Metabolismo y funciones de las poliaminas en bacterias". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1986.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n1999_Cataldi

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis:

METABOLISMO Y FUNCIONES DE LAS POLIAMINAS EN BACTERIAS

Autor:

Angel Adrián Cataldi

Director de Tesis:

Dr. Israel D. Algranati

Lugar de trabajo:

Instituto de Investigaciones Bioquímicas

"Fundación Campomar"

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas

Año 1986

A mi "viejo" Cholo y a mi mamá Noelia
quienes pese a su humilde condición
posibilitaron mi progreso.

A mi esposa Cristina y a mi hija.

A mis tíos René y Tani por la ayuda
brindada.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Israel D. Algranati quien con sus conocimientos y su actitud abierta y crítica posibilitó la concreción de este trabajo.

Al Dr. Luis F. Leloir y a los miembros del Consejo Directivo, por haberme brindado la posibilidad de realizar este trabajo en el Instituto.

Al Dr. Abraham Lemberg quien me inició en la Investigación Científica.

A la Dra. Sara H. Goldemberg, por sus contribuciones y su estímulo.

A los Dres. Ricardo Wolosiuk, Manuel García-Patrone y Laura Mc Murry, a quienes tuve la suerte de conocer como seres humanos y aprender de ellos como científicos.

Al Dr. José A. Santomé y a Dora Beati por la realización del análisis de aminoácidos.

A Mariana Stein, Norberto Iusem, Roberto Geremía, Sonia Iujvidin, Juan Carlos Bossio, Angeles Zorreguieta, Cecilia Hertig, Mario Alperin, Esteban Corley, Antonio Coira y Luis Ielpi con quienes compartí gratos momentos y años de lucha por los derechos de los becarios del CONICET.

A mis amigos Ricardo Morbidoni y Juan José Miret.

A Margarita Mazzardi, Soledad Giménez, Belle Wolf e Irene P. Cangiano, por su indispensable trabajo sin el cual la investigación sería imposible.

A los "muchachos" Francisco Irusta y Salvador Genovese.

A Norberto Malarini, por la excelente realización de los dibujos.

A Susana Raffo y Marta Bravo cuyos consejos y ayudas fueron fundamentales.

Al CONICET por las becas otorgadas.

INDICE

	Página
I. <u>INTRODUCCION</u>	1
1. Poliaminas en bacterias.	3
1.1. Distribución intracelular de poliaminas en bacterias.	6
1.2. Bacterias que carecen de poliaminas en la naturaleza.	7
2. Biosíntesis de poliaminas en bacterias.	8
2.1. Biosíntesis de putrescina en <u>E. coli</u>	8
2.1.1. Ornitina decarboxilasa inducible.	8
2.1.2. Ornitina decarboxilasa constitutiva.	9
2.1.3. Arginina decarboxilasa inducible.	10
2.1.4. Arginina decarboxilasa constitutiva.	10
2.1.5. Agmatinasa.	11
2.2. Biosíntesis de espermidina en <u>E. coli</u>	12
2.2.1. Metionina adenosil transferasa.	12
2.2.2. S-adenosil metionina decarboxilasa.	12
2.2.3. Espermidina sintetasa.	13
2.3. Biosíntesis de cadaverina en <u>E. coli</u>	14
2.3.1. Lisina decarboxilasa inducible.	14
2.3.2. Lisina decarboxilasa constitutiva.	14
2.4. Biosíntesis de N-carbamil putrescina en <u>E. coli</u>	15
3. Regulación de la biosíntesis de poliaminas en <u>E. coli</u>	16
3.1. Control por antizima.	18
3.2. Regulación por la osmolaridad del medio de cultivo.	19
4. Biosíntesis de poliaminas en bacterias distintas a <u>E. coli</u>	20

5. Organización de los genes biosintéticos de poliaminas.	23
6. Cepas mutantes de <u>E. coli</u> deficientes en la síntesis de poliaminas.	24
7. Posibles funciones de las poliaminas en <u>E. coli</u>	27
7.1. Efectos sobre la síntesis de proteínas.	27
7.2. Efectos sobre la síntesis de RNA.	30
7.3. Efectos sobre la síntesis de DNA.	31
7.4. Efectos sobre la multiplicación de bacteriofagos.	31
7.5. Efectos sobre las membranas bacterianas.	32
Objetivos del presente trabajo.	33
II. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	35
1. Cepas bacterianas usadas.	35
2. Medios de cultivo.	35
2.1. Medio mínimo.	35
2.2. Medio rico.	36
3. Crecimiento bacteriano.	36
4. Agotamiento de poliaminas en la cepa <u>E. coli</u> BGA8.	36
5. Análisis de las poliaminas endógenas.	37
6. Análisis de aminoácidos básicos.	38
7. Preparación de extractos celulares para medir enzimas.	39
8. Medición de decarboxilasas.	39
8.1. Ornitina decarboxilasa constitutiva.	40

8.2. Arginina decarboxilasa constitutiva.	40
8.3. Ornitina decarboxilasa inducible.	40
9. Medición de agmatinasa.	41
10. Medición de ornitina transcarbamilasa.	42
11. Dosaje enzimático de carbamifosfato.	42
12. Síntesis "in vivo" de poliaminas y aminoácidos.	43
13. Captación de arginina y ornitina.	44
14. Captación de estreptomycin.	45
15. Análisis de perfiles ribosomales.	45
16. Síntesis "in vivo" de proteínas.	46
17. Procedimientos genéticos.	46
III. <u>RESULTADOS</u>	49
1. Características del crecimiento de la cepa <u>E. coli</u> BGA8.	
2. Cultivos de <u>E. coli</u> BGA8 que se vuelven independientes del agregado de poliaminas para su crecimiento.	49
2.1. Aislamiento de colonias.	50
2.2. Contenido de poliaminas en las bacterias <u>E. coli</u> BGA8 bp. .	51
2.3. Medición de las enzimas biosintéticas de poliaminas.	53
2.3.1. Medición de ornitina decarboxilasa inducible.	54
2.4. Conversión de arginina y ornitina en putrescina.	55
2.4.1. Incubación con ¹⁴ C-arginina.	55
2.4.2. Incubación con ¹⁴ C-ornitina.	56

2.4.3. Captación de arginina y ornitina.	56
2.4.4. Contenido endógeno de arginina y ornitina.	57
2.5. Conversión de glucosa en putrescina.	58
2.5.1. Cinética de la síntesis de poliaminas a partir de glu- cosa.	59
2.6. Conversión de ácido glutámico en putrescina.	60
2.7. Conversión de espermidina en putrescina.	61
2.8. Características de la cepa <u>E. coli</u> BGA8 bp.	62
2.8.1. Fases de crecimiento.	62
2.8.2. Crecimiento prolongado de la cepa BGA8 bp en putrescina..	62
2.8.3. Crecimiento de la cepa BGA8 bp a diferentes temperaturas.	63
2.8.4. Crecimiento de la cepa BGA8 bp en diferentes fuentes de carbono.	63
2.8.5. Crecimiento de la cepa BGA8 bp en distintas condiciones de aereación.	64
2.8.6. Sensibilidad a la estreptomicina de la cepa BGA8 bp	65
2.8.6.1. Efecto de la estreptomicina sobre el crecimiento de la cepa BGA8 bp.	
2.8.6.2. Efecto sobre la síntesis "in vivo" de proteínas.	65
2.8.7. Análisis de distribución ribosomal en la cepa BGA8 bp. ..	66
2.9. Obtención de una mutante auxótrofa para arginina a partir de la cepa BGA8 bp.	67
2.9.1. Características de la cepa BGA8 bp argA-1.	68
2.9.3. Enzimas biosintéticas de poliaminas en la cepa BGA8 bp	

argA-1.	69
3. Crecimiento de <u>E. coli</u> BGA8 en presencia de diferentes amino- ácidos.	71
3.1. Contenido endógeno de poliaminas de la cepa BGA8 cultivada en presencia de arginina.	71
3.2. Medición de las enzimas arginina decarboxilasa y agmatina- nasa.	72
3.3. Contenido endógeno de aminoácidos básicos.	73
3.4. Conversión de arginina en putrescina.	74
3.5. Medición de ornitina transcarbamilasa.	75
3.6. Contenido endógeno de carbamifosfato.	75
3.7. Conversión de ornitina en arginina en bacterias con y sin poliaminas.	76
3.8. Síntesis de ornitina a partir de ácido glutámico.	77
3.9. Toxicidad por ornitina.	78
3.10. Análisis de la distribución ribosomal.	79
<u>DISCUSION.</u>	80
<u>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.</u>	95
<u>BIBLIOGRAFIA.</u>	97

I. INTRODUCCION

Las poliaminas son un grupo de compuestos policatiónicos de naturaleza orgánica que se encuentran en casi todos los seres vivos. Las poliaminas más estudiadas son:

Putrescina	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
Cadaverina	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
Espermidina	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
Espermina	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$

A. van Leeuwenhouek descubrió estas sustancias hacia fines del siglo XVII al encontrar cristales de espermina en el semen humano. Schreiner en 1878 caracterizó a estos cristales como una sal de una base orgánica, pero fue necesario esperar hasta 1920 para que Rosenheim describiera la estructura y la síntesis de la espermidina y la espermina (1). El estudio de estas sustancias se incrementó considerablemente cuando se descubrió la capacidad de las poliaminas para estimular el crecimiento de algunas especies bacterianas (2) y plantas (3). Las poliaminas también demostraron ser importantes en la fisiología del sistema nervioso (4), en la proliferación tumoral (5), en la diferenciación (6) y en otros procesos celulares.

Estos resultados motivaron el estudio de las poliaminas en el campo de la biología molecular. Se comprobó entonces que las poliaminas estaban implicadas en una gran variedad de procesos biológicos, tales como la síntesis de DNA, RNA y proteínas (7), la estabilidad de biomembranas (8), la transglutaminación (9) y la regulación de protein-kinasas (10,11).

Dado el gran conocimiento acumulado en la bacteria Escherichia coli, ésta

constituye un sistema apropiado para estudios genéticos, metabólicos y enzimáticos de las poliaminas. Por esta razón las bacterias fueron los primeros organismos donde se elucidó la biosíntesis de estas sustancias y donde se obtuvo mutantes incapaces de sintetizar poliaminas.

1. Poliaminas en bacterias

Se han hallado poliaminas en casi todas las bacterias. La gran mayoría de estos organismos contienen putrescina y espermidina. En algunos pocos casos se han descrito espermina y otras poliaminas..

Cuando se cultiva E. coli en medio mínimo a 37°C se puede determinar que la bacteria contiene aproximadamente 15 μ moles de putrescina y 4 μ moles de espermidina por gramo de peso húmedo. De acuerdo a la cantidad de agua intracelular, esto equivale a una concentración de 20 mM para putrescina y de 6 mM para espermidina.

Estas concentraciones son similares a las Mg^{2+} (12). Sólo en algunas condiciones es posible hallar cadaverina y su derivado, aminopropil cadaverina (13,14). En ningún caso fue posible encontrar espermina en E. coli cultivada en medio mínimo.

Las condiciones de cultivo afectan la concentración intracelular de poliaminas. Algunos de los factores importantes son la composición, el pH, la osmolaridad del medio y la edad del cultivo (12).

La espermina que se encuentra junto con putrescina y espermidina en todas las células eucariontes, sólo se ha hallado en algunas bacterias como Lactobacillus casei (15) y Acetobacterias (16).

En el pasado se había descrito que la espermina se encontraba en diferentes especies bacterianas, pero el mejoramiento de las técnicas para analizar poliaminas permitió establecer que se trataba de compuestos similares y no de auténtica espermina (17). En otros casos se pudo establecer que

la espermina provenía del medio de cultivo.

En algunas especies de bacterias se han encontrado poliaminas diferentes a las ya mencionadas. Estas poliaminas que a veces son llamadas "inusuales" se muestran en la Tabla I.

Tabla I

1,3 diaminopropano	$H_2N(CH_2)_3NH_2$
2 - hidroxiputrescina	$H_2N(CH_2)_2CH(OH)CH_2NH_2$
Norespermidina (caldina)	$H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH_2$
Homoespermidina	$H_2N(CH_2)_4NH(CH_2)_4NH_2$
Norespermina (termina)	$H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH_2$
Termoespermina	$H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$
Caldopentamina	$H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH_2$
Homocaldopentamina	$H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$

Norespermidina o caldina ha sido hallada en eubacterias termófilas (18), en arqueobacterias termoacidófilas (19) y en vibrios marinos (20).

La homoespermidina reviste especial importancia puesto que se la ha encontrado en microorganismos que fijan N_2 como Rhizobium (21), bacterias fotosintéticas fijadoras de N_2 (22) y en algunas cianobacterias (23). Estos hechos parecen indicar una relación entre homoespermidina y fijación biológica de N_2 . También se ha encontrado esta poliamina en microorganismos termófilos (18) y en arqueobacterias metanogénicas (24).

La norespermidina o termina ha sido detectada en termófilas tanto eubac-

teriales (18) como arqueobacteriales (19).

Las pentaminas caldopentamina y homocaldopentamina fueron halladas en termófilas eubacterianas (18).

El compuesto 1,3 diaminopropano (DAP) fue encontrado en bajas concentraciones en arqueobacterias metanogénicas y en vibrios marinos (20,24).

Por último, la 2-hidroxipturescina fue descrita en ciertas cepas de Pseudomonas que no contienen espermidina (25).

Algunas de las poliaminas de "cadena larga" antes descritas han sido halladas en plantas, algas, hongos y artrópodos (26-28). Además la homoespermidina fue encontrada en algunas células de vertebrados superiores (29).

La cantidad total de poliaminas varía mucho entre las distintas especies bacterianas. En general las bacterias gram negativas tienen contenido endógeno de poliaminas mayor que las gram positivas. En algunas de estas últimas como Staphilococcus, la putrescina y espermidina son apenas detectables (30).

También varía considerablemente la relación putrescina/espermidina; en algunas especies como Xanthomonas campestris sólo se encuentra espermidina (31). Otras especies como Micrococcus contienen altos niveles de cadaverina (22).

1.1. Distribución intracelular de poliaminas en bacterias

A pH fisiológico las poliaminas exhiben una carga neta positiva que les permite unirse a macromoléculas negativamente cargadas como DNA, RNA, proteínas y fosfolípidos. Por esta razón, las poliaminas ejercen "in vitro" un profundo efecto sobre la estructura secundaria y terciaria de los ácidos nucleicos (7,32). Las poliaminas también pueden asociarse a diferentes sustancias mediante uniones tipo puente de hidrógeno.

El estudio de la localización subcelular de las poliaminas se ha visto dificultado durante largo tiempo, por su fácil redistribución luego de la ruptura celular.

Se ha comprobado que minicélulas que carecen de DNA contienen una cantidad normal de poliaminas (33).

Estudios recientes empleando resonancia magnética nuclear "in vivo" demuestran que la putrescina se encuentra asociada a macromoléculas en E. coli. Estas macromoléculas probablemente son ribosomas o fracciones que contienen membranas (34).

Los únicos casos descritos en procariones de unión covalente de una poliamina a una macromolécula lo constituyen la putrescina unida a las bases de timina en el DNA del fago ϕW -14 de Pseudomonas sp (35) y el péptidoglicano de Selenomonas que contiene cadaverina (36).

1.2. Bacterias que carecen de poliaminas en la naturaleza

Desde 1955, en que Herbst demostró que Haemophilus parainfluenzae (2) tenía un requerimiento absoluto de poliaminas para su crecimiento, hasta recientemente no se habían descrito otros ejemplos de bacterias carentes de poliaminas.

En los últimos años se ha determinado que la bacteria Veillonella alcalescens carece de poliaminas endógenas detectables y requiere putrescina o cadaverina para crecer; la espermidina no tiene efecto. Aparentemente esta especie bacteriana sometida a un ayuno de poliaminas tiene un defecto en la síntesis de proteínas (37). Asimismo, algunas especies patógenas de Clostridium también carecen de poliaminas detectables (31). Este resultado, conjuntamente con aquéllos de Haemophilus parainfluenzae y Pasteurella tularensis (2,8), indicaría una incapacidad de algunas bacterias patógenas para sintetizar poliaminas. También se ha descrito que Bdellovibrio, una bacteria parásita obligada de otras, necesita poliaminas para crecer (38).

La arqueobacteria halofílica extrema Halobacterium halobium también carece de cantidades detectables de poliaminas. Además tampoco sintetiza estas sustancias a partir de los precursores conocidos en otras bacterias, ni posee un sistema de transporte de poliaminas. Pero a diferencia de las bacterias mencionadas más arriba H. halobium puede crecer sin poliaminas (39). Coincidentemente en E. coli se ha sugerido una relación inversa entre la osmolaridad del medio y el contenido endógeno de poliaminas (81,82).

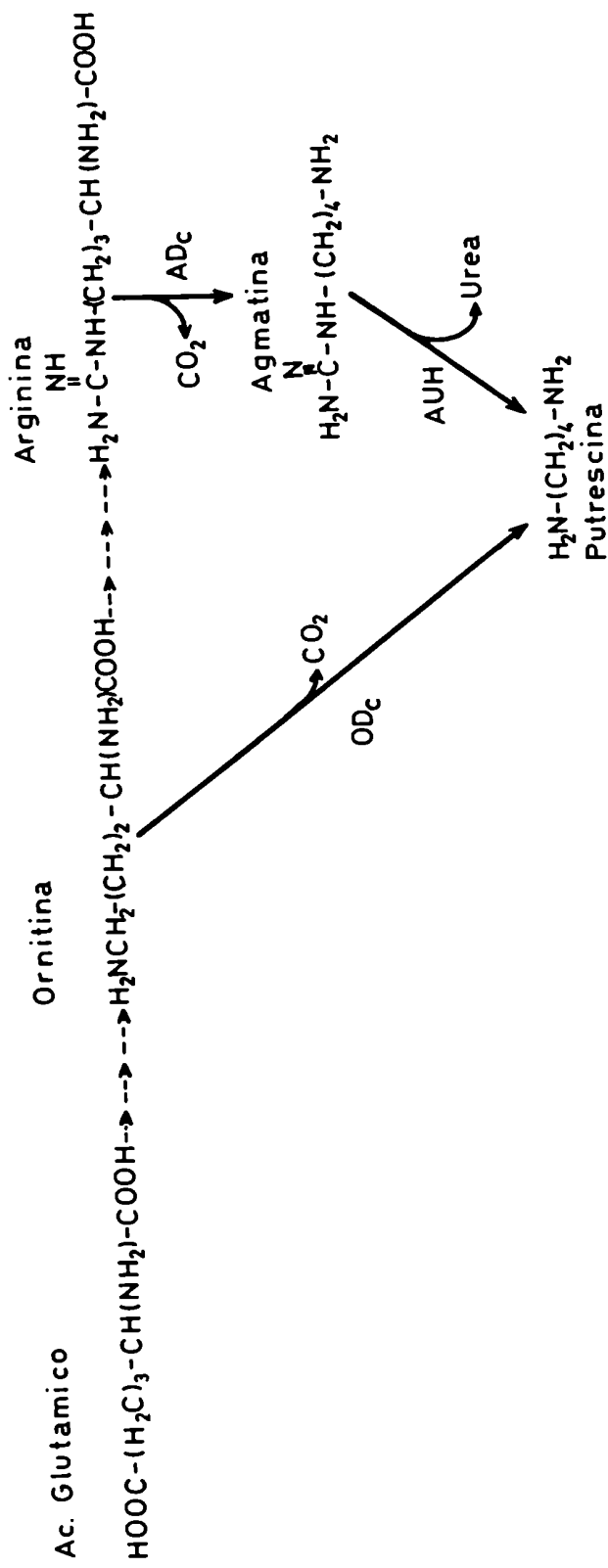


Figura 1: Biosíntesis de putrescina en *E. coli*. ODc, ornítina decarboxilasa constitutiva; ADc, arginina decarboxilasa constitutiva y AUH, agmatinasa.

2. Biosíntesis de poliaminas en bacterias

2.1. Biosíntesis de putrescina en Escherichia coli

El camino biosintético de putrescina en E. coli está esquematizado en la Fig. 1.

Los aminoácidos arginina y ornitina son los precursores de la putrescina y esta, a su vez, lo es de la espermidina. En E. coli existen, entonces dos caminos biosintéticos de putrescina. Uno de ellos implica a la enzima ornitina decarboxilasa y el otro a las enzimas arginina decarboxilasa y agmatinasa. La bacteria E. coli posee una forma constitutiva y otra inducible de cada una de las decarboxilasas mencionadas.

2.1.1. Ornitina decarboxilasa inducible (ODI)

Esta enzima forma parte de un grupo de aminoácido decarboxilasas inducibles a bajo pH en un medio con exceso de sustrato (en este caso, ornitina) (40). En estas condiciones la enzima ODI puede llegar a representar un 7% de las proteínas totales presentes en un extracto crudo de E. coli (41). Sin embargo, esta enzima no se pudo encontrar en muchas de las cepas de E. coli utilizadas en estudios de bioquímica y biología molecular, como E. coli K12. Aunque ODI es inducida cuando el pH del medio de cultivo es 5, su pH óptimo en ensayos de actividad "in vitro" es de 6,5 (42).

La ornitina decarboxilasa inducible ha sido purificada hasta homogeneidad y se observó que se trata de una enzima de peso molecular relativo 160.000 formada por dos subunidades iguales y que necesita piridoxal fosfato

como cofactor (43).

Hasta el momento no se han podido obtener mutantes de esta enzima, ni se logró ubicar el gen en el genoma de E. coli.

2.1.2. Ornitina decarboxilasa constitutiva (ODc)

Morris y Pardee caracterizaron esta enzima y observaron diferencias importantes con la forma inducible. Su actividad es apreciable cuando la bacteria se cultiva a pH neutro; a pH 5 la actividad específica que se obtiene es de unas diez veces menor (44).

La enzima ODc se ha encontrado en todas las cepas estudiadas de E. coli y no muestra reacción cruzada contra anticuerpos preparados contra la enzima OD1.

La ornitina decarboxilasa constitutiva es un dímero formado por dos subunidades iguales de peso molecular relativo 82.000. Es específica para ornitina como sustrato, su pH óptimo es 8,2 y requiere piridoxal fosfato como cofactor (42). Esta enzima es inhibida por poliaminas y activada por GTP y UTP (44). Existen resultados contradictorios sobre el efecto de cAMP sobre la síntesis de la enzima (45,46).

Estudios genéticos demostraron que el gen de la ornitina decarboxilasa constitutiva está ubicada en el minuto 63,4 del mapa genético correspondiente al cromosoma de E. coli (47).

2.1.3. Arginina decarboxilasa inducible (ADi)

Esta enzima, al igual que otras aminoácido decarboxilasas inducibles se sintetiza cuando se cultiva E. coli en un medio rico a pH ácido y con exceso de sustrato (en este caso arginina).

La enzima fue purificada hasta homogeneidad y cristalizada (48). Se observó que puede existir como un dímero de peso molecular relativo 160.000 o como un decámero de peso molecular relativo 820.000. A pH 5,2, que es el pH óptimo de la enzima, la forma decamérica parece ser la especie activa de la arginina decarboxilasa inducible.

Esta enzima también requiere piridoxal fosfato como cofactor. L-canavanina también puede ser sustrato aunque se decarboxila a una velocidad 2 a 3 veces menor que la L-arginina (49).

2.1.4. Arginina decarboxilasa constitutiva (ADc)

Esta forma de la enzima arginina decarboxilasa se produce cuando la bacteria E. coli se cultiva a pH neutro. La actividad específica de esta enzima resulta ser dos órdenes de magnitud menor que la de arginina decarboxilasa inducible obtenida a pH ácido y 3 veces menor que la actividad específica de la ornitina decarboxilasa constitutiva (50).

La enzima arginina decarboxilasa constitutiva fue purificada hasta homogeneidad y cristalizada (51,52); tiene un requerimiento absoluto de piridoxal fosfato y Mg^{2+} . Esta enzima sólo puede utilizar L-arginina como

sustrato. En presencia de Mg^{2+} es un tetrámero de peso molecular relativo 296.000, pero puede existir como dímero o como monómero según las condiciones.

Recientemente se ha demostrado que esta enzima se sintetiza a partir de un precursor de mayor peso molecular y que una fracción importante de la arginina decarboxilasa se encuentra en el espacio periplásmico de E. coli (53); esto permite explicar por qué la arginina exógena se convierte en putrescina más fácilmente que la arginina producida intracelularmente (54).

El gen de la arginina decarboxilasa constitutiva se ha localizado en el minuto 62,8 del cromosoma de E. coli (56).

El nucleótido ppGpp parece reprimir la síntesis de esta enzima (56).

2.1.5. Agmatinasa

Esta enzima también llamada agmatina ureo-hidrolasa cataliza la conversión de agmatina en putrescina con desprendimiento de urea.

Los métodos de dosaje de esta enzima se basan en la producción de urea, dado que es la única enzima en E. coli que produce esta sustancia (50). Tiene un peso molecular relativo de 38.000 (57), es reprimida por cAMP e inducida por su sustrato, agmatina (58). Otros autores, sin embargo, han encontrado inducción por cAMP (46).

El gen de esta enzima se encuentra en el minuto 62,8 del genoma de E. coli (55).

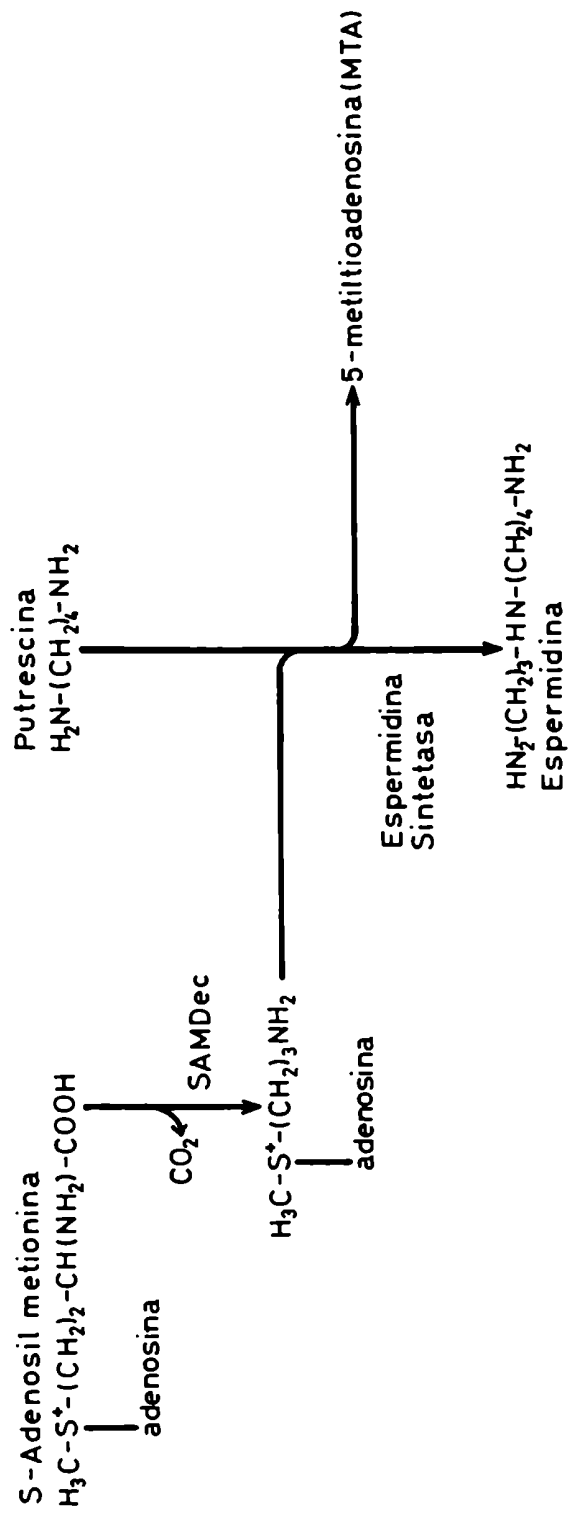


Figura 2: Biosíntesis de espermidina en E. coli. SAMDec, S-adenosil metionina decarboxilasa.

2.2. Síntesis de espermidina en E. coli

La Fig. 2 muestra el camino de biosíntesis de espermidina en E. coli.

El grupo N-propilamina de la espermidina proviene del aminoácido metionina. La metionina primero se convierte en S-adenosilmetionina (SAM); luego se decarboxila y finalmente transfiere su grupo N-propilamina a la putrescina para dar espermidina. En esta síntesis la S-adenosilmetionina no actúa como dador de metilos, como ocurre en muchas otras reacciones bioquímicas.

En el metabolismo descrito intervienen las siguientes enzimas:

2.2.1. Metionina adenosil transferasa: Esta enzima, también llamada S-adenosil metionina transferasa, usa metionina y ATP como sustratos para producir S-adenosil metionina y tripolifosfato; este compuesto se convierte en pirofosfato y fosfato inorgánico por la acción de una tripolifosfatasa asociada (59).

2.2.2. S-adenosilmetionina decarboxilasa: Esta enzima que ha sido purificada hasta homogeneidad, difiere de otras decarboxilasas en que no requiere piridoxal fosfato; en cambio tiene un grupo prostético piruvilo unido covalentemente (60).

La S-adenosilmetionina decarboxilasa nativa tiene un peso molecular relativo de 108.000, está compuesta de seis subunidades idénticas, requiere cationes divalentes (61) y es específicamente inhibida por el compuesto metilglioxal bisguanilhidrazona (MGBG) (62).

El gen de esta enzima está localizado en el minuto 2,7 del mapa genético de E. coli (63). Cuando este gen se expresa se forma una proteína de peso molecular relativo 35.000, que luego se rompe dando lugar a la subunidad de 17.000 con un grupo piruvilo en su extremo N-terminal (64).

La enzima de E. coli difiere de sus similares de eucariontes en que su actividad depende de cationes y en que no se estimula por putrescina.

2.2.3. Espermidina sintetasa: Esta enzima cataliza la reacción Putrescina+S-adenosilmetionina decarboxilada \rightarrow espermidina+metiltioadenosina (MTA).

Ha sido purificada hasta homogeneidad. En estado nativo tiene un peso molecular relativo de 73.000 y contiene dos subunidades idénticas. Su pH óptimo es 10,3. Puede usar cadaverina y espermidina como sustratos, aunque con menor velocidad que con putrescina (65).

Recientemente se han obtenido mutantes y el gen correspondiente se ha podido localizar en la posición 2,7 minutos del cromosoma de E. coli, en un lugar adyacente al gen de la S-adenosilmetionina decarboxilasa con el cual forma un operón (66).

En E. coli el compuesto metiltioadenosina, que es uno de los productos formados por la espermidina sintetasa, se hidroliza a adenina y metiltioribosa por la acción de otra enzima que ha sido purificada (67).

2.3. Síntesis de cadaverina

La cadaverina no se encuentra normalmente en E. coli cultivada en medio mínimo; en cambio aparece cuando la bacteria se cultiva en un medio rico o cuando se bloquea la síntesis de putrescina (14). La cadaverina se forma a partir de la lisina por decarboxilación. En E. coli existen dos tipos de lisina decarboxilasa.

2.3.1. Lisina decarboxilasa inducible: Se induce a pH ácido en condiciones semianaeróbicas en un medio con lisina (40,68). La enzima ha sido purificada hasta homogeneidad y su pH óptimo es 5,7. Está compuesta por subunidades iguales de peso molecular relativo 77.000 y existe como dímero o como decámero. Requiere piridoxal fosfato como cofactor (68).

El gen de esta enzima está localizado en el minuto 92 del mapa genético de E. coli. Se encontró un gen regulatorio que mapea en el minuto 46, cuyo producto parece reprimir la síntesis de la lisina decarboxilasa inducible (69).

2.3.2. Lisina decarboxilasa constitutiva: Se detecta en E. coli cultivada a pH neutro y en ausencia de lisina (14). Esta forma de la enzima es termosensible, se encuentra en cantidades muy reducidas y es inhibida por putrescina y espermidina. Esta inhibición permitiría explicar la falta de cadaverina en células que contienen putrescina o espermidina y su aparición cuando se bloquea por mutación la síntesis de putrescina (70).

2.4. Síntesis de N-carbamil putrescina E. coli

Se ha demostrado que al menos en una cepa de E. coli existe una actividad de citrulina decarboxilasa que convierte la citrulina en N-carbamil putrescina (71). Los autores no describen que la N-carbamil putrescina pueda convertirse en putrescina.

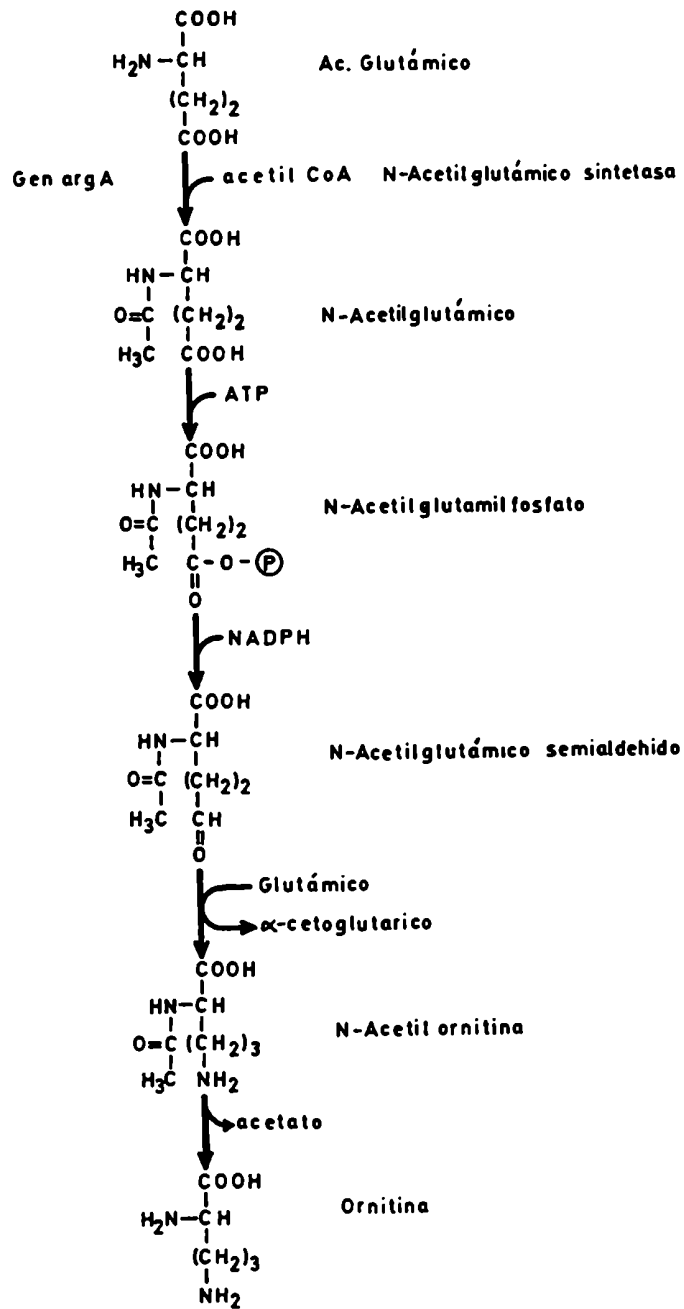


Figura 3A: Biosíntesis de ornitina en E. coli.

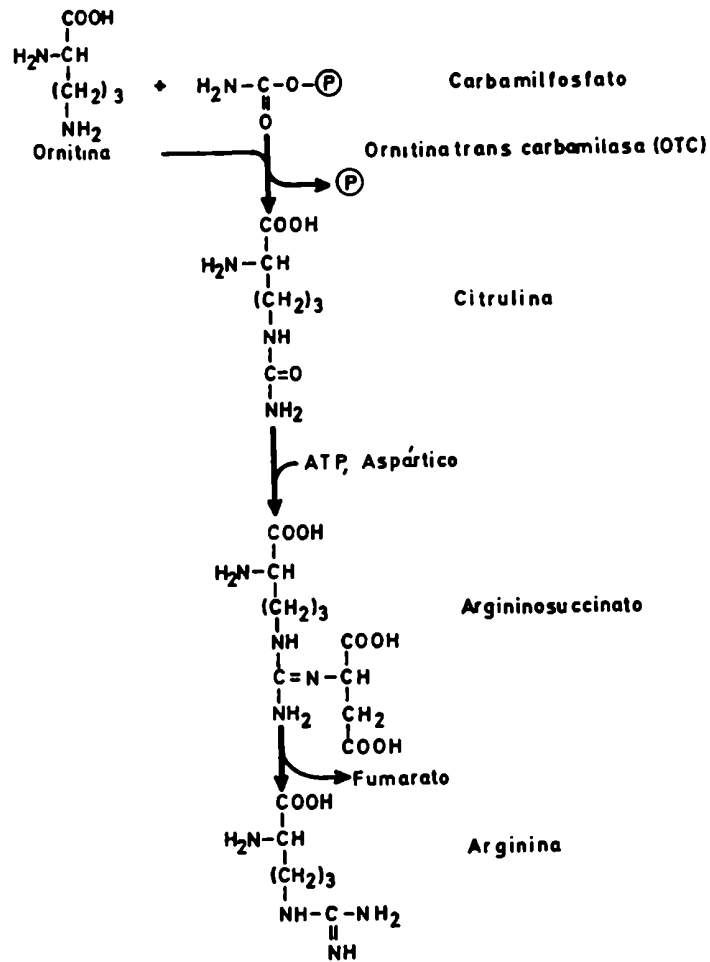


Figura 3B: Biosíntesis de arginina en *E. coli*.

3. Regulación de la biosíntesis de poliaminas en E. coli

En la Fig. 3 se muestra el camino de síntesis de arginina en E. coli. La putrescina se sintetiza a partir de uno de los intermediarios de este camino, la ornitina, y también a partir del producto final, la arginina. Este aminoácido regula su propia síntesis inhibiendo y reprimiendo la primera enzima de la vía metabólica.

La regulación de la síntesis de poliaminas en E. coli comparte las propiedades regulatorias de otros caminos metabólicos ramificados. Es importante, además, conocer el uso relativo de ambas vías de síntesis de putrescina.

Morris demostró que las poliaminas putrescina y espermidina a concentraciones fisiológicas inhiben las enzimas constitutivas ornitina decarboxilasa (ODc) y arginina decarboxilasa (ADc) (72). Otros estudios indican que ambas poliaminas también reprimen la síntesis de las dos decarboxilasas (73).

Morris efectuó una serie de estudios sobre el uso metabólico de los dos caminos de síntesis de putrescina en diferentes condiciones. Para ello determinó la síntesis total de poliaminas y la producción de urea como medida de utilización del camino de arginina a putrescina.

Al comparar la producción total de poliaminas y la utilización de cada ruta cuando las bacterias se cultivaban en un medio mínimo y en un medio suplementado con arginina, se observó que la formación total de putrescina era igual en ambos casos. En condiciones normales la ruta de la ornitina

decarboxilasa es la más utilizada. Esta relación se invierte cuando se agrega arginina al medio de cultivo, pues cesa la producción de ornitina por la represión e inhibición de la primera enzima de su camino biosintético (74).

El aumento de la síntesis de putrescina a partir de arginina se debe, además, a la localización periplásmica de la arginina decarboxilasa (53), que la hace más accesible a la arginina externa.

La síntesis total de poliaminas es considerable, aún cuando los niveles intracelulares de ornitina y arginina estén muy disminuidos. Cuando se suministran cantidades de ornitina que sólo permiten un crecimiento limitado de una bacteria auxótrofa para ornitina el nivel intracelular de poliaminas es un 16% de los valores normales, y un 9% a 18% de la arginina u ornitina agregadas se destinan a la síntesis de putrescina (73).

Un aspecto sorprendente del metabolismo de las poliaminas en E. coli lo constituye el hecho de que esta bacteria en distintas condiciones mantiene el contenido endógeno de espermidina mucho más constante que el de putrescina. De esta manera células cultivadas en quimiostato con arginina limitante muestran una reducción de su contenido en putrescina del 97%, pero el nivel de espermidina sólo disminuye un 35% (73). Asimismo en mutantes bloqueadas en la síntesis de poliaminas el contenido de espermidina sólo se reduce parcialmente (75,76).

No hay resultados tan claros respecto a otros procesos regulatorios que puedan afectar la síntesis de poliaminas. El cAMP ejerce un control negativo sobre la síntesis de ornitina decarboxilasa, arginina decarboxilasa y agmatinasa, según Boyle (45), aunque otro autor describió estimulación de la sín-

tesis de agmatinasa por el mismo compuesto (46).

El nucleótido GTP activa "in vitro" a la ornitina decarboxilasa (7,77) mientras que ppGpp parece inhibir y reprimir dicha enzima (56). Otros estudios indican una relación inversa entre la síntesis de poliaminas y la producción de ppGpp durante la respuesta estricta (77,78).

De las tres enzimas involucradas directamente en la síntesis de putrescina en E. coli, la agmatinasa parece ser la más variable, dependiendo de las condiciones metabólicas; es regulada por AMPc, inducida por agmatina y también varía según la fuente de carbono utilizada (46).

3.1. Control por antizima

Una manera distinta de regulación de la ornitina decarboxilasa ha sido descrita en E. coli por Canellakis. Según este autor esta bacteria posee dos proteínas básicas y una proteína ácida que inhiben la ornitina decarboxilasa. También encontró una proteína activadora. Estos efectores macromoleculares se unen covalentemente a la decarboxilasa formando un complejo que es estable y puede ser aislado "in vitro". Las proteínas básicas inhibitorias o antizimas parecen ser las proteínas ribosomales S20/L26 y L34. Estas proteínas también son capaces de inhibir a la arginina decarboxilasa, pero no afectan las formas inducibles de ambas decarboxilasas. Las antizimas descritas aumentan cuando la bacteria E. coli se cultiva en presencia de poliaminas, lo que indicaría un posible rol fisiológico (79,80).

3.2. Regulación por la osmolaridad del medio de cultivo

Existe una relación entre la osmolaridad del medio y el contenido en poliaminas de E. coli. Cuando la osmolaridad del medio baja a expensas del potasio, aumenta la síntesis y el contenido de putrescina, mientras que la síntesis de espermidina permanece inalterable. Dicha síntesis aumentada de putrescina se lleva a cabo por la vía de la ornitina decarboxilasa y ocurre en forma inmediata cuando las células se transfieren a un medio de baja osmolaridad. Este proceso parece deberse a una activación de la enzima preexistente (81,82). No se conoce aún el fundamento molecular de este mecanismo de regulación.

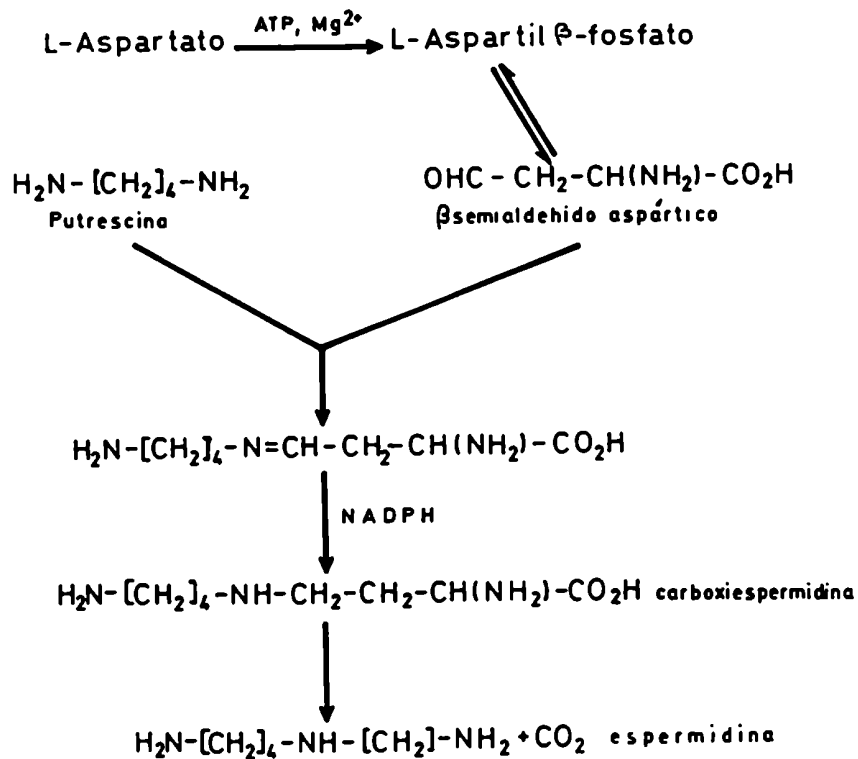


Figura 4: Biosíntesis de putrescina en Pseudomonas aeruginosa. OTC, ornitina transcarbamilasa; ODC, ornitina decarboxilasa y ADc, arginina decarboxilasa.

4. Biosíntesis de poliaminas en bacterias distintas a E. coli

Si bien con ninguna otra bacteria se investigó tan intensamente la biosíntesis de poliaminas como en E. coli, se conocen varios aspectos de la bioquímica de estas sustancias en diversos microorganismos.

En enterobacterias, grupo taxonómico al cual pertenece la E. coli, se pudo detectar actividad de ornitina decarboxilasa en todos los casos. Todos los géneros examinados (Salmonella, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Edwardsiella, Proteus, Serratia, Yersinia y Erwinia, con la excepción de la especie E. coli K12) mostraron mayor actividad de ornitina decarboxilasa inducible que constitutiva. Los géneros Proteus y Erwinia no contienen ODc (83).

En Klebsiella pneumoniae también se encontró actividad de agmatinasa inducible por agmatina (84).

En Pseudomonas aeruginosa, que no contiene agmatinasa, hay dos caminos distintos para convertir arginina en putrescina (Fig. 4). Existe una arginina decarboxilasa que forma agmatina; ésta se transforma por acción de la enzima agmatina deiminasa en N-carbamil putrescina que se convierte finalmente en putrescina por medio de la enzima N-carbamil putrescina hidrolasa (vía A). Por otro lado la enzima arginina deiminasa convierte arginina en citrulina y este compuesto es transformado en ornitina mediante la ornitina carbamil transferasa. Finalmente la ornitina produce putrescina por la acción de la ornitina decarboxilasa (vía B) (85,86). Ambos caminos biosintéticos existen también en Streptococcus faecalis (87) y en plantas (3). Las enzimas arginina decarboxilasa y agmatina deiminasa se inducen por sus respectivos sustratos. La arginina decarboxilasa es estimulada por putrescina, contrariamente a lo

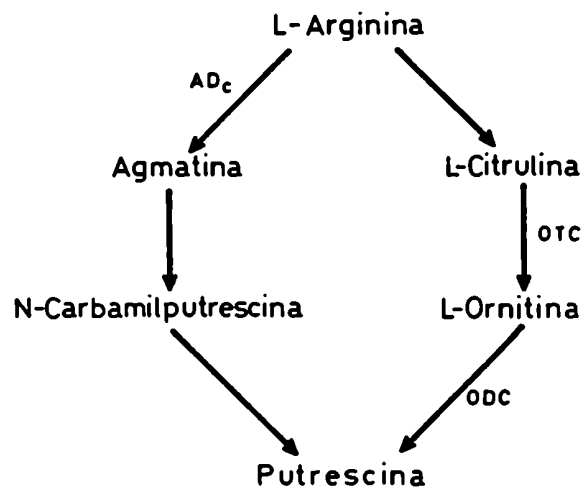


Figura 5: Biosíntesis de espermidina en Rhodopseudomonas spheroides y Micrococcus denitrificans.

que sucede en E. coli cuya enzima es inhibida por esta sustancia (85).

La ornitina decarboxilasa de P. aeruginosa tiene propiedades distintas a las de E. coli, ya que es inhibida por DL- α -difluor-metilornitina (88).

La bacteria termofílica extrema Clostridium thermohydrosulfuricum contiene una ornitina decarboxilasa que no se inhibe por putrescina (89).

En algunas otras bacterias como Rhodopseudomonas spheroides y Micrococcus denitrificans se comprobó que el grupo propilamino de la espermidina no proviene de metionina sino de ácido aspártico (90). Este aminoácido se convierte en α -semialdehído aspártico que luego se condensa con putrescina para formar una base de Schiff que es reducida al aminoácido básico carboxiespermidina; este compuesto a su vez se decarboxila produciendo espermidina (Fig. 5)

Algunas de las enzimas mencionadas han sido caracterizadas; se pudo comprobar que la decarboxilasa de carboxiespermidina requiere la presencia de piridoxal fosfato. Existen enzimas similares en Agrobacterium tumefaciens (91). Esta vía metabólica también se demostró en plantas (92).

La biosíntesis de poliaminas como homoespermidina y norespermidina aún no se conoce con exactitud. Se ha propuesto el camino esquematizado en la Fig. 6 para la síntesis de las poliaminas del tipo $(H_2N(CH_2)_3NH)_n$ ($n=1$ corresponde a diamino propano; $n=2$ a norespermidina o caldina; $n=3$ a norespermina o termina y $n=4$ a caldopentamina).

Según esta hipótesis el compuesto 1,3 diaminopropano (DAP) se produciría por la acción de la enzima diamina oxidasa sobre la espermidina originando también Δ_1 -pirrolina que luego se metaboliza a CO_2 . La adición a una molécula de DAP de un grupo propilamino proveniente del SAM decarboxilado (Deca SAM)

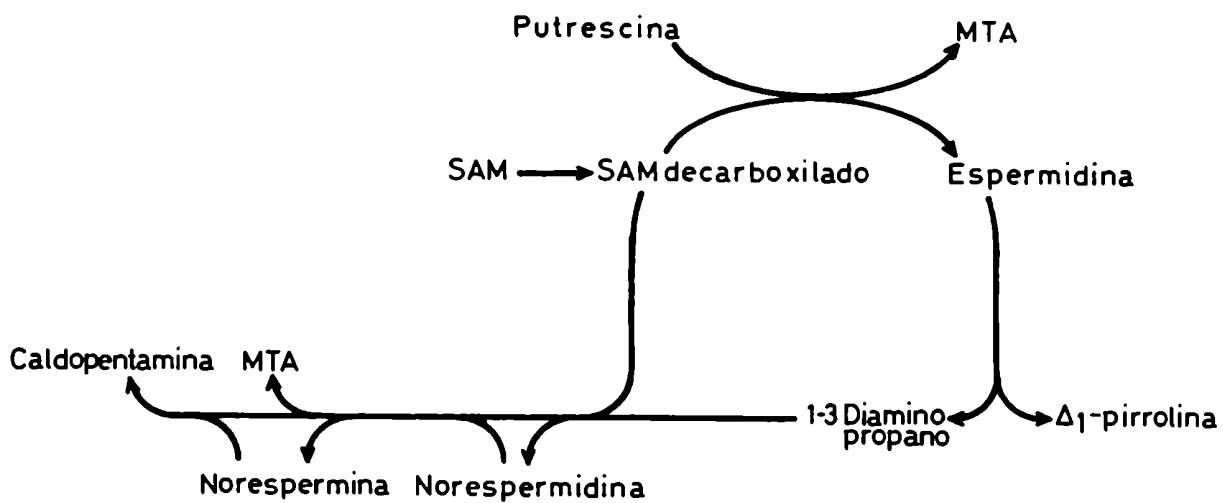


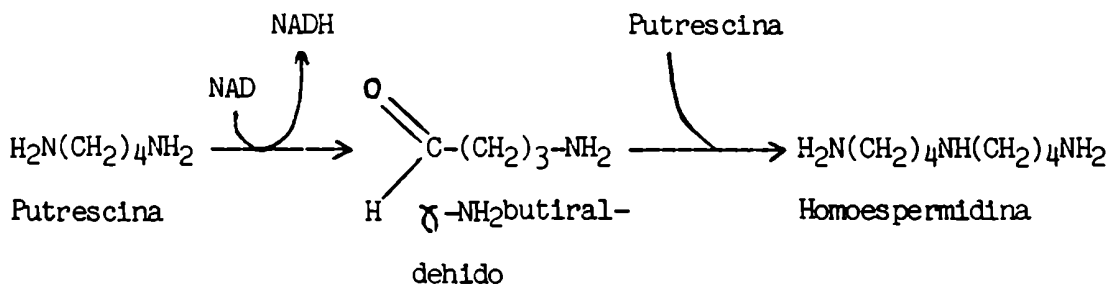
Figura 6: Biosíntesis de norespermidina, norespermina y caldopentamina

SAM, S-adenosil metionina y MTA, S-metiltioadenosina.

produciría norespermidina, y los sucesivos agregados de grupos propilamino darían lugar a norespermina y caldopentamina (93).

La arqueobacteria termófila Caldariella acidófila (Sulfolobus acidocalcaricus) contiene norespermidina, norespermina y un alto nivel de SAM decarboxilado; se comprobó también que la radioactividad proveniente del grupo propilamino de la metionina se incorporaba a norespermina y norespermidina (3). En otra bacteria termófila, el Clostridium termohidrosulfuricum, se observó la incorporación de diaminopropano a norespermidina y se detectó una actividad aminopropiltransferasa que utiliza SAM decarboxilado y diaminopropano como sustratos (94).

La síntesis de homoespermidina en Rhodopseudomonas viridis ocurre según las siguientes reacciones:



Ambas reacciones son catalizadas por una única enzima que ha sido purificada (91).

Tabla II: Genes de enzimas biosintéticas de poliaminas en E. coli

Enzima	Gen	Posición en el cromosoma de <u>E. coli</u> (min)
Arginina decarboxilasa constitutiva	speA	62,8
Agmatinasa	speB	62,8
Ornitina decarboxilasa constitutiva	speC	63,4
Metionina adenosil transferasa	metK	63,0
S-adenosil metionina decarboxilasa	speD	2,7
Espermidina sintetasa	speE	2,7

5. Organización de los genes biosintéticos de poliaminas

Mediante experimentos de mapeo genético se pudo conocer la ubicación en el cromosoma de E. coli de los genes correspondientes a las enzimas biosintéticas de putrescina, espermidina y cadaverina.

Como se ve en la Tabla II los genes de las enzimas de síntesis de putrescina se encuentran muy cercanos en el cromosoma de E. coli. Pese a este hecho estos tres genes no constituyen un operón (95). En cambio los genes speD y speE forman un operón con un promotor común (66).

Se han obtenido plásmidos que contienen los genes de las enzimas citadas y que producen cantidades aumentadas de las mismas (57).

El gen metK es el único que ha sido secuenciado (96).

No se han obtenido aún mutantes correspondientes a las enzimas ornitina y arginina decarboxilasa inducibles.

En cuanto a los genes de las enzimas involucradas en la síntesis de cadaverina, sólo se han obtenido mutantes del correspondiente a la lisina decarboxilasa inducible; este gen, cadA, mapea en el minuto 92 del cromosoma de E. coli. Existe otro gen, cadR que es regulador y codifica para una proteína represora de la lisina decarboxilasa. Está localizado en el minuto 46 (69).

6. Cepas mutantes de E. coli deficientes en la síntesis de poliaminas

Las primeras cepas de E. coli incapaces de sintetizar poliaminas fueron mutantes de la enzima agmatinasa. Cuando estas bacterias se desarrollan en un medio con arginina no se produce ornitina debido a la represión e inhibición de la primera enzima del camino de síntesis de putrescina; además por la falta de actividad de agmatinasa estas cepas no pueden sintetizar putrescina en presencia de arginina; este tipo de mutantes se denominan condicionales, ya que sólo en presencia de arginina son auxótrofas para poliaminas. Una de estas mutantes, obtenida por el grupo de Maas y col. (97), tiene las siguientes características: es capaz de desarrollarse en un medio mínimo, (tiempo de duplicación \sim 65 min) pero su crecimiento se vuelve más lento en un medio mínimo con arginina (tiempo de duplicación \sim 200 min), este retraso en el crecimiento se puede revertir por el agregado de putrescina o espermidina. Una concentración de putrescina tan baja como 0,1 $\mu\text{g/ml}$ es suficiente para estimular el crecimiento.

Otra mutante aislada por Morris y col. (75) tiene características generales de crecimiento similares a las señaladas anteriormente, aunque en presencia de arginina el crecimiento no es tan lento (esta cepa muestra menor necesidad de poliaminas para su crecimiento óptimo). Los contenidos endógenos de putrescina y espermidina de esta mutante representan el 20 y 55% respectivamente de los niveles hallados en una cepa salvaje. Morris también aisló una cepa mutante deficiente en arginina decarboxilasa (ADc) que tenía, como era de esperar, las mismas características de crecimiento que la

cepa carente de agmatinasa (75).

Las cepas mutantes mencionadas fueron obtenidas por tratamiento con mutágenos químicos; por ello presumiblemente tienen mutaciones puntuales (98).

Posteriormente, Maas obtuvo una doble mutante en los genes de las enzimas de ambos caminos biosintéticos de la putrescina. Para ello partió de una mutante carente de agmatinasa y le introdujo una segunda mutación en el gen de ornitina decarboxilasa, obteniendo una doble mutante AUH⁻ODc⁻. Esta cepa crece muy lentamente (tiempo de duplicación ~ 250 min) en un medio sin poliaminas. Cuando se agrega putrescina o espermidina se acorta considerablemente el tiempo de duplicación que llega a ser similar al de una cepa salvaje (60-70 min). La doble mutante tiene niveles de ornitina decarboxilasa y agmatinasa del orden de 2 a 4% de los hallados en la cepa salvaje progenitora. Como resultado de estas mutaciones la concentración endógena de putrescina es muy baja, mientras que la espermidina es equivalente a un tercio de la encontrada en la cepa salvaje. En la doble mutante cultivada en medio mínimo sin putrescina aumenta marcadamente el contenido de cadaverina (47,76).

Tabor empleó la mutagénesis con el fago Mu para obtener mutantes auxótrofos para poliaminas que no contenían ninguna de las cuatro enzimas biosintéticas: ornitina decarboxilasa, arginina decarboxilasa, agmatinasa y adenosilmetionina decarboxilasa. El fago Mu se integra al azar en el genoma de E. coli; al insertarse en un gen interrumpe su expresión. En determinadas condiciones es posible hacer que el fago se desprenda del gen provocando una

delección. Estas mutaciones son mucho más eficaces que las mutaciones puntuales para eliminar la actividad de un producto génico. Las mutantes cuádruples obtenidas por Tabor carecen por completo de putrescina y espermidina; se desarrollan con un tiempo de duplicación de 240 min en medio mínimo, y de 90 min en medio mínimo con poliaminas (95).

Estudios posteriores con las mutantes cuádruples permitieron introducir con el fago Mu una nueva mutación, ahora en el gen de la lisina decarboxilasa (cadA) determinando que la actividad de esta enzima se redujera al 0,5% de los valores normales en la cepa salvaje progenitora. La eliminación de esta enzima no provocó, sin embargo, un aumento adicional del tiempo de duplicación de esta cepa auxótrofa para poliaminas; el agregado de cadaverina al medio tampoco mejoró el crecimiento (69).

También se han aislado mutantes que sólo son deficientes en la enzima S-adenosil metionina decarboxilasa. Estas cepas carecen de espermidina y tienen niveles algo aumentados de putrescina; sin embargo pueden multiplicarse a una velocidad que es sólo algo menor a la de una cepa salvaje con niveles normales de espermidina (63). Este hecho sugeriría que la espermidina no es un factor esencial en el crecimiento de E. coli, aunque puede promover el crecimiento de bacterias mutantes que carecen tanto de putrescina como de espermidina, pese a que esta última no se puede convertir en putrescina en E. coli. Parecería, entonces, que cualquiera de estas dos poliaminas es capaz de cumplir un rol fisiológico en la proliferación de bacterias.

7. Posibles funciones de las poliaminas en E. coli

El aislamiento de mutantes carentes de poliaminas significó la aparición de una herramienta invaluable para el estudio de las funciones de estas bases orgánicas en bacterias. Estas mutantes y el estudio de los efectos de las poliaminas sobre algunos sistemas "in vitro" posibilitaron una mayor comprensión del significado fisiológico de las poliaminas.

Es necesario distinguir que cuando se agregan poliaminas a sistemas "in vitro", en general sólo se observan los efectos que produce la presencia de estas sustancias sobre el proceso en estudio (efectos similares a los que produce el Mg^{2+}). En cambio cuando se cultiva una bacteria mutante carente de poliaminas en un medio suplementado con putrescina o espermidina, se observan también los efectos de estas sustancias sobre la expresión génica y sobre la biosíntesis de complejos subcelulares como los ribosomas, las membranas, etc.

7.1. Efectos sobre la síntesis de proteínas

Las bacterias mutantes sometidas a un ayuno de poliaminas muestran defectos en la síntesis de DNA, RNA y proteínas (7); cuando se agrega putrescina al medio la síntesis proteica es la primera en recuperarse (99).

En bacterias auxótrofas para poliaminas la velocidad de síntesis proteica es dos a tres veces mayor en presencia de putrescina, tanto "in vivo" como en un sistema libre de células (100,101). Algranati demostró que el defecto en la síntesis de proteínas en las bacterias mutantes sometidas al ayuno de poliaminas podría atribuirse a la presencia de subunidades ribosoma-

les 30S defectuosas (102). Igarashi encontró que dichas subunidades contenían una cantidad anormalmente baja de proteína ribosomal S1 y que el RNA ribosomal 16S estaba submetilado (103).

Cuando se agrega poliaminas al medio de cultivo de una bacteria mutante carente de estas sustancias se observa que la primer proteína que comienza a sintetizarse tiene un peso molecular relativo 62.000. Esta proteína llamada PI, cuya función fisiológica se desconoce, estimula la síntesis proteica en sistemas "in vitro" (104). Trabajando con las mismas mutantes se vio que los ribosomas de las bacterias sometidas a ayuno de poliaminas eran más resistentes a la acción de la estreptomicina, tanto "in vivo" como "in vitro" (101). Posteriormente se comprobó que la afinidad de la estreptomicina por los ribosomas es menor cuando las partículas ribosomales provienen de bacterias cultivadas en ausencia de poliaminas (105).

Estudios realizados con sistemas libres de células indicaron que las poliaminas eran capaces de reemplazar parcialmente el requerimiento de magnesio de la síntesis proteica y que estimulaban dicha síntesis hasta obtener valores superiores a los producidos por Mg^{2+} solo, aún a concentraciones óptimas (106,107).

En otros sistemas bacterianos como los de Bacillus thuringiensis y de arqueobacterias termófilas existe una necesidad absoluta de poliaminas para la síntesis de proteínas (108,109).

Las poliaminas en determinadas concentraciones tienen un efecto estimulador sobre casi todos los pasos de la síntesis proteica. Se unen al tRNA promoviendo cambios conformacionales que lo hacen más activo en su capacidad

aceptora de aminoácidos (110,111); inducen la asociación de las subunidades ribosomales (112,113) y la unión del RNA mensajero (poliU) y del aminoacil tRNA a los ribosomas (114). Muchos de estos procesos pueden inhibirse por un exceso en la concentración de poliaminas.

Un gran número de experimentos han indicado que las poliaminas también pueden afectar la fidelidad de la síntesis de proteínas tanto "in vivo" como "in vitro". Se denomina fidelidad a la capacidad de la maquinaria de síntesis proteica de colocar en cada posición de una cadena peptídica el aminoácido correcto correspondiente al codón traducido.

En sistemas libres de células las poliaminas aumentan la fidelidad de la síntesis proteica cuando se agregan en concentraciones fisiológicas y a niveles subóptimos de Mg^{2+} . Esto se comprobó tanto en sistemas de células eucariontes (115,116) como bacterianos (101,108). Aún no se han publicado trabajos sobre fidelidad de la traducción con sistemas libres de células provenientes de bacterias mutantes cultivadas en ausencia de poliaminas.

Recientemente se han diseñado experimentos para medir "in vivo" el error de la síntesis de proteínas en cepas de E. coli auxótrofas para poliaminas y cultivadas en presencia y ausencia de estas sustancias. Se concluyó que las poliaminas disminuyen los errores que suceden "in vivo" a alta frecuencia, mientras parecen no tener efecto sobre los errores que ocurren a menor frecuencia (118).

Tabor y col. han descripto que al introducir una mutación de resistencia a estreptomycin en una cepa auxótrofa para poliaminas aparece un requerimiento absoluto de estas sustancias para el crecimiento de la bacteria (119).

De esta cepa se pueden aislar mutantes capaces de proliferar en ausencia de poliaminas, aun cuando no sintetizan estas sustancias (120). Estas mutaciones supresoras compensatorias se ubican en la zona de los genes de las proteínas ribosomales. Según los autores se trataría de un caso similar a la mutación ribosomal r.a.m. de Gorini (121). Todos estos resultados fueron interpretados por Tabor considerando que las poliaminas disminuirían, de alguna manera, la fidelidad de la síntesis proteica. Una mutación ribosomal de resistencia a la estreptomycinina, al contrario de una mutación r.a.m., disminuye la ambigüedad. Estos hechos explicarán porqué una cepa de E. coli que no contenga poliaminas y además sea resistente a estreptomycinina, no puede crecer y sólo el agregado de poliaminas o la aparición de una mutación de tipo r.a.m. restaura un grado de ambigüedad necesario para el crecimiento.

Otros estudios demuestran que las poliaminas son necesarias para la traducción de codones de terminación ámbar por parte de los tRNA supresores (122). Los resultados mencionados indican que todavía no hay acuerdo sobre la acción de las poliaminas en la fidelidad de la traducción.

7.2. Efectos sobre la síntesis de RNA

Las poliaminas estimulan la síntesis de RNA catalizada "in vitro" por la RNA polimerasa bacteriana (123,124). Esta estimulación se observa sólo cuando se usa DNA doble cadena, lo que podría sugerir que las poliaminas actúan sobre la conformación del DNA y no sobre la polimerasa misma.

La síntesis total de RNA "in vivo" en cepas de E. coli auxótrofas para

poliaminas es menor cuando las bacterias se cultivan en ausencia de dichas sustancias (99,127); cuando se agrega putrescina o espermidina a estas bacterias la síntesis de RNA se recupera luego de la síntesis de proteínas (99). Recientemente se demostró que las subunidades β y β' de la RNA polimerasa están entre las primeras proteínas cuya síntesis aumenta en E. coli por agregado de poliaminas (126) al medio de cultivo. Estas sustancias también afectan el control de la síntesis de RNA dado que cepas mutantes sometidas a un ayuno de poliaminas se comportan como relajadas cuando se omite un aminoácido esencial. En cambio las células suplementadas con poliaminas se comportan como estrictas, es decir, su síntesis de RNA cesa cuando se detiene la síntesis de proteína por falta de un aminoácido (127).

7.3. Efecto sobre la síntesis de DNA

Kornberg demostró que la espermidina es necesaria para la síntesis "in vitro" del DNA del bacteriófago $\phi \times 174$ (128).

Trabajando con una mutante carente de poliaminas Morris comprobó que estas sustancias estimulaban la elongación del DNA y no su iniciación (129).

7.4. Efecto sobre la multiplicación de bacteriófagos

Tabor demostró que las poliaminas son esenciales para el crecimiento en E. coli de varios bacteriófagos como T4 y T7. Por otra parte las poliaminas parecen ser esenciales para el desarrollo del fago λ afectando especialmente una etapa temprana de la infección de las bacterias por el fago (130,95).

7.5. Efectos sobre las membranas bacterianas

Tanto las poliaminas como algunas otras sustancias pueden tener efectos osmoprotectores. Se ha demostrado que las poliaminas protegen la integridad de protoplastos y esferoplastos en medios hipotónicos (8) y que asimismo son capaces de promover el crecimiento de algunas bacterias halofílicas en medios fuertemente hipotónicos (8,12).

OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

La obtención de bacterias mutantes incapaces de sintetizar poliaminas, significó un gran adelanto en la comprensión de las funciones fisiológicas de estas poliaminas. Para poder obtener estas mutantes fue necesario bloquear los dos caminos metabólicos conocidos de síntesis de poliaminas en enterobacterias.

En nuestro laboratorio se trabajó con una de estas cepas doble mutante (E. coli BGA8) que carece de las enzimas ornitina decarboxilasa (ODc) y agmatinasa (AUH). Esta cepa necesita del agregado de putrescina o espermidina para alcanzar una velocidad de crecimiento normal, similar a la de una cepa salvaje. Cuando se agregan cantidades variables de poliaminas al medio de cultivo se pueden regular a voluntad las concentraciones intracelulares de estas sustancias, y de esta manera la misma bacteria cultivada en distintas condiciones constituye un buen sistema para el estudio de las diversas funciones de las poliaminas en la síntesis proteica "in vivo" (101) e "in vitro" (102), la fidelidad de la traducción (118), la estructura ribosomal (102), el control estricto de la síntesis de RNA (127), la respuesta a una elevación brusca de la temperatura ("heat shock") (153), el efecto de antibióticos aminoglucoídos (101) y la síntesis de cadaverina (14).

En numerosos experimentos se había observado que luego de períodos prolongados de crecimiento lento en un medio de cultivo sin poliaminas, la bacteria E. coli BGA8 comenzaba a crecer rápidamente perdiendo su requerimiento de dichas sustancias, y que además, la arginina podía reemplazar parcialmente

a las poliaminas en el efecto estimulador del crecimiento.

Con el propósito de explicar a nivel molecular las observaciones mencionadas se inició el presente trabajo con los siguientes objetivos:

- 1) Establecer si la aparición de las bacterias que dejan de requerir poliaminas en cultivos de la cepa EGA8 se debe a una reversión genética de los genes mutados o a la aparición de una vía biosintética de poliaminas distinta a las dos ya conocidas, y en caso de confirmarse esto último intentar conocer los precursores de la putrescina.
- 2) Estudiar la causa del efecto estimulador de la arginina sobre el crecimiento de la cepa EGA8 y el posible rol regulador de las poliaminas sobre la vía biosintética de dicho aminoácido.

II. MATERIALES Y METODOS

1. Cepas bacterianas usadas

E. coli: MRE600: cepa salvaje

MA17 (thr⁻ leu⁻ ser⁻ his⁻ thi⁻)

MA255 (thr⁻ leu⁻ thi⁻ rpsL speB speC) cepa auxótrofa para poliaminas derivada de MA17

BGA8 (thr⁻ leu⁻ thi⁻ speB speC) mutante auxotrófica para poliaminas derivada de MA255

BGA8bp revertante fenotípica de BGA8 que no requiere poliaminas

EW319 (thr⁻ pro⁻ thi⁻ Δ (speAspeB) Δ (speCglc) Δ spe D), cepa auxótrofa para poliaminas

Enterobacter aerógenes: cepa salvaje

2. Medios de cultivo

2.1. Medio mínimo: Se usó el medio mínimo de Davis y Mingioli (131) que contiene por litro: 9,2 g de PO₄HK₂, 3 g de PO₄H₂K, 0,47 g de citrato de sodio, 0,1g de sulfato de magnesio y 1 g de SO₄(NH₄)₂.

Se suplementa con 0,5% de glucosa y 10 µg/ml de tiamina.

Los aminoácidos requeridos como así también la putrescina se agregaron a una concentración final de 100µg/ml.

Estos medios se designan de la siguiente manera:

MM: medio mínimo descrito más arriba

MMP:MM + putrescina

MM:MM + arginina

MMO:MM + ornitina

2.2. Medio rico (TYE)

Este medio contiene 8 g de bactotripton, 5 g de bactolevadura y 5 g de ClNa por litro.

3. Crecimiento bacteriano

Los cultivos se realizaron normalmente a 37°C con agitación enérgica, para asegurar una aereación abundante.

El crecimiento bacteriano se determinó midiendo la absorbancia a 490 nm.

Un valor de $A_{490} = 1$ corresponde a un cultivo que contiene aproximadamente 4×10^8 bacterias/ml.

4. Agotamiento de poliaminas en la cepa E. coli EGA8

Los cultivos de EGA8 en medio TYE se diluyeron en un volumen 200 veces mayor de medio MM y se dejaron desarrollar durante toda la noche hasta alcanzar la fase estacionaria tardía. Estas células tienen muy bajo contenido endógeno de poliaminas y requieren el agregado de estas sustancias al medio para su crecimiento óptimo.

5. Análisis de las poliaminas endógenas

Para analizar el contenido de poliaminas las bacterias se recogieron por centrifugación y se lavaron con buffer A (Tris ClH pH 7,8 50 mM, ClNH₄ 60 mM, acetato de Mg 5 mM y mercaptoetanol 6 mM). Luego se sometieron a una extracción a 4°C con ácido perclórico 0,2 M, usando 0,1 ml de ClO₄H para un peso húmedo de bacterias de 20 mg. Se centrifugó 10 min a 5.000 g y el sobrenadante resultante se dansiló de acuerdo al método de Dion y Herbst (132), que consiste en agregar 100 µl de solución saturada de CO₃Na₂ y 200 µl de cloruro de dansilo a 100 µl de muestra, dejando reaccionar toda la noche en la oscuridad; la reacción se detuvo con 50 µl de prolina 100 mg/ml. Finalmente se realizó una extracción con 0,5 volúmenes de tolueno. En estas condiciones sólo pasan a la fase orgánica las dansilaminas. Se procedió en la misma forma con soluciones "standard" de distintas poliaminas.

Las fases toluénicas correspondientes a distintas muestras se analizaron por cromatografía en capa delgada (TLC) usando placas recubiertas con sílica gel (Merck kieselgel 60). Como solventes de desarrollo se usaron cloroformo:trietilamina (10:1) o acetato de etilo:ciclohexano (1:1). Para estabilizar la fluorescencia después de la cromatografía las placas se rociaron con isopropanol:trietanolamina (4:1) y finalmente se observaron bajo luz ultravioleta para detectar las manchas fluorescentes.

Para cuantificar las poliaminas, las placas de TLC se secaron al vacío en la oscuridad y se rasparon las zonas correspondientes a las distintas

manchas, extrayendo luego con benceno:triethylamina (95:5). La fluorescencia de las soluciones resultantes se determinó por fluorometría comparando los valores con curvas obtenidas con cantidades conocidas de poliaminas. Para las mediciones de fluorescencia se empleó un espectrofluorómetro Aminco usándose longitud de onda de excitación (λ_{ex}) de 350 nm y de emisión (λ_{em}) de 490 nm.

6. Análisis de aminoácidos básicos

Se utilizaron extractos perclóricos similares a los usados para analizar poliaminas. Después de neutralizar con KOH se separó el precipitado de ClO_4K por centrifugación. Las distintas muestras y las soluciones con cantidades conocidas de aminoácidos básicos se colocaron sobre papel Whatman 3 MM y se realizó una electroforesis en ácido sulfosalicílico 50 mM pH 3,2 a 600 V durante 3 hs. Luego de la electroforesis las aminas y aminoácidos se revelaron con reactivo de ninhidrina-cadmio (133). Esta técnica permite detectar hasta 5 nanomoles de aminas.

Se efectuó un dosaje cuantitativo eluyendo las manchas coloreadas con H_2O :ácido acético:etanol (10:50:40) que contenía 2% de acetato de cadmio, y se determinó la absorbancia a 540 nm comparando los valores con curvas "standard".

7. Preparación de extractos celulares para medir enzimas

Porciones de 100 ml de cultivos en fase logarítmica media de crecimiento se centrifugaron 10 min a 10.000 g y las bacterias obtenidas se lavaron con buffer A.

Las células se resuspendieron en 1 ml de Tris.ClH 50 mM pH 8,2, ditiotreitól 1 mM y EDTA 2,4 mM y se rompieron por sonicación. Se centrifugó 10 min a 10.000 g y los sobrenadantes obtenidos (S₁₀) se usaron como fuente de enzimas (en el caso de medir arginina decarboxilasa no se agrega EDTA a las soluciones).

8. Medición de decarboxilasas

El método se basa en utilizar como sustrato aminoácido radioactivo marcado en el carbono 1 y retener sobre un papel impregnado con alcali el CO₂ radioactivo liberado en la reacción.

En todos los casos se inicia la reacción por agregado de fosfato de piridoxal. Una unidad de actividad de decarboxilasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 nanomol de CO₂ por hora de incubación a 37°C.

8.1. Ornitina decarboxilasa constitutiva

Se usaron las condiciones de Applebaum (42), con 0,5 ml de volumen de reacción que contenía Tris ClH 50 mM pH 8,2, ditiotreitól 1 mM EDTA 2,4 mM, 40 μ M de fosfato de piridoxal y 5 mM de L(1-¹⁴C)ornitina (0,1 μ Ci/ml).

8.2. Arginina decarboxilasa constitutiva

Se utilizaron las condiciones de Hirschfield (97) con buffer Tris ClH pH 7,5 100 mM, DTT 1mM, Cl₂Mg 2 mM, L(U-¹⁴C)arginina 5 mM (0,1 μ Ci/ml) y 40 μ M de fosfato de piridoxal en un volumen de 0,5 ml.

8.3. Ornitina decarboxilasa inducible

Para medir esta enzima se usaron extractos celulares provenientes de 100 ml de cultivos en medio rico, con exceso de ornitina y a pH ácido, según el método descrito por Applebaum (43).

Las bacterias se recogieron, lavaron con buffer A y resuspendieron en 1 ml de buffer MES pH 6,3 50 mM, ditiotreitól 1 mM y EDTA 2,4 mM. Después de la sonicación se centrifugó a 10.000 g por 10 min y se usó el sobrenadante (S₁₀) para medir la actividad enzimática. La mezcla de reacción es similar a la utilizada para la enzima constitutiva utilizando buffer MES pH 6,3 50 mM en lugar de Tris.ClH.

9. Medición de agmatinasa

El método empleado mide la urea producida. La reacción enzimática se llevó a cabo en un volumen de 0,5 ml que contenía buffer MES pH 6,3, 100 mM y agmatina 14,8 mM. Después de incubar 15 min a 37°C la reacción se detuvo calentando a 100°C durante 3 min. Luego de centrifugar para eliminar las proteínas coaguladas, la urea producida se midió empleando ureasa y el reactivo de fenol-hipoclorito (134). La reacción se realizó en un volumen final de 0,2 ml que contenía ureasa y la muestra, después de incubar 15 min a 37°C se agregaron 0,5 ml de reactivo A (fenol 10 g/l y nitroprusiato de sodio 0,05 g/l) y 0,5 ml de reactivo B (HONa 5 g/l e hipoclorito de sodio 0,84% (v/v)). Después de 10 min se midió la absorbancia a 625 nm. Se procedió de la misma forma con soluciones "standards" de urea.

En algunas ocasiones se determinó la urea producida según el método de Hunnighake y Grisolia (135). Un volumen final de 1.5 ml con la muestra, 0.5% de diacetilmonoxima, 0.4 mg/ml de semidina (N-p-fenil-p-fenilendiamina) y SO₄H₂ 20%, se calentó a 90°C por 10 min y se agregó luego 0,6 ml de Cl₃Fe 0,1 M en SO₄H₂. Después de 10 min para desarrollar el color se midió la absorbancia a 545 nm usando una curva de calibración con cantidades conocidas de urea.

Una unidad de actividad de agmatinasa es la cantidad de enzima que produce 1 nanomol de urea por min de incubación a 37°C.

10. Medición de ornitina transcarbamilasa (OTC)

Para dosar esta enzima se empleó el método de Legrain que mide colorimétricamente la citrulina producida (136). La mezcla de reacción contenía 5 mM de ornitina, 5 mM carbamifosfato y 100 mM Tris.ClH en 0,3 ml de volumen final.

El pH del buffer utilizado fue 8,2 o 6,8 según las condiciones elegidas para la reacción. Esta se detuvo por agregado de ClO_4H y luego de centrifugar, la citrulina se dosó en el sobrenadante de acuerdo al método de Hunninghake y Grisolia (135).

Un procedimiento alternativo del mismo autor emplea (^{14}C)carbamifosfato, que en medio ácido y a 100°C se descompone liberando CO_2 . La radioactividad estable remanente debida a la citrulina formada da una medida de la actividad enzimática. La mezcla de reacción es la misma descrita anteriormente, pero usando en este caso $0,05 \mu\text{Ci}$ de ^{14}C -carbamifosfato.

Una unidad de actividad de ornitina transcarbamilasa es la cantidad de enzima que produce un micromol de citrulina por minuto a 37°C .

11. Dosaje enzimático de carbamifosfato

Se utilizó el método de Wanders que emplea la enzima carbamatoquinasa de Streptococcus sp. Esta enzima produce ATP a partir de carbamifosfato y ADP. El ATP formado se mide luego espectrofotométricamente usando las enzimas hexoquinasa y glucosa 6 fosfato dehidrogenasa que producen la reducción de

NADP⁺ mediante reacciones acopladas (139). El carbamil fosfato endógeno se midió en un extracto de ClO₄H 0,2 M neutralizado que se preparó a partir de 60 mg (peso húmedo) de bacterias.

La mezcla de reacción (1,1 ml) contenía trietanolamina ClH 50 mM pH 7,4 SO₄Mg 10 mM, EDTA 5 mM, ClK 75 mM, NADP⁺ 0,4 mM, glucosa 2,5 mM, ADP 0,5 mM, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa 5 ug/ml, carbamatoquinasa (EC 2.7.2.2.) 10 ug/ml y extracto perclórico bacteriano. Se preincubó 5 min a 37°C y se inició la reacción mediante el agregado de carbamatoquinasa; luego se siguió la reducción del NADP⁺ por el incremento de la absorbancia a 365 nm en un espectrofotómetro con cubeta termostatzada a 37°C y equipado con registrador. Se realizaron curvas de calibración con cantidades conocidas de carbamil fosfato.

12. Síntesis "in vivo" de poliaminas y aminoácidos

Para medir la síntesis de poliaminas y aminoácidos se incubó 10 ml de cultivo bacteriano en las condiciones indicadas en cada caso con uno de los siguientes compuestos: L(U-¹⁴C)ornitina(0,7 μM; 0,1 μCi/ml); L(U-¹⁴C)arginina(0,25 μM; 0,1 μCi/ml); L(U-¹⁴C)ácido glutámico(1,9 μM;0,5 μCi/ml); L(2,3 ³H)ácido glutámico(0,1 μM;2 μCi/ml); (U-¹⁴C)espermidina(8 μM; 0,1 μCi/ml y D-(U-¹⁴C)glucosa(3,86 μM;1 μCi/ml). Cuando se utilizó glucosa radioactiva la concentración de este azúcar en el medio se redujo a 0,1%. Al final del período de incubación las bacterias se trataron con ClO₄H 0,2 M a 4°C y después de centrifugar se recogió el sobrenadante resultante.

Para estudiar la síntesis de poliaminas, los extractos obtenidos se dansilaron como se describió anteriormente. Los dansil derivados se separaron por TLC empleando como solvente de desarrollo $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{trietilamina}$ (10:1) y se detectó la radioactividad en cada mancha usando un radiocromatógrafo Packard 7201; las zonas correspondientes a las poliaminas se rasparon de la placa y se midió la radioactividad por centelleo líquido.

Para estudiar la síntesis de aminoácidos los sobrenadantes obtenidos por extracción de las bacterias con ClO_4H se neutralizaron y se analizaron por electroforesis en papel con el sistema descrito en "Análisis de aminoácidos básicos". Las zonas radioactivas se localizaron mediante el radiocromatógrafo, se eluyeron y se midió la radioactividad por centelleo líquido usando el reactivo de Bray.

13. Captación de arginina y ornitina

Con el fin de medir la captación de estos aminoácidos, los cultivos bacterianos en fase logarítmica media de crecimiento se incubaron con 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cloranfenicol durante 30 min a 37°C . Una alícuota que contenía 3×10^6 bacterias en 1 ml de medio mínimo fresco se incubó por el período indicado en presencia del aminoácido marcado (0,15 μM , 0,05 μCi); las bacterias se recogieron por filtración a través de membrana Millipore (tamaño de poro 0,45 μM) y se lavaron a temperatura ambiente con medio mínimo que contenía 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del aminoácido no radioactivo. Los filtros se secaron y se midió la radioactividad por centelleo líquido.

En algunos casos se agregó a la mezcla de captación ácido aminoxiacético (AOA), que es un inhibidor de decarboxilasas.

14. Captación de estreptomicina

Los cultivos bacterianos en fase exponencial media se incubaron durante 45 min con 20 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina. Luego se agregó ^3H -dihidroestreptomina (3 $\mu\text{Ci/ml}$) y a distintos tiempos se tomaron muestras que se filtraron a través de membrana Millipore (0,45 μm); los filtros se lavaron con 3 ml de estreptomicina 10 $\mu\text{g/ml}$, se secaron y se midió la radioactividad por centelleo líquido.

15. Análisis de perfiles ribosomales

Los cultivos en fase de crecimiento exponencial media se enfriaron lentamente con el fin de transformar los polisomas en monómeros y subunidades (138).

Después de centrifugar, las bacterias se resuspendieron en buffer A y se rompieron por sonicación. El extracto celular se centrifugó primero por 10 min a 10.000 g y luego a 30.000 g por 30 min, obteniéndose el sobrenadante que contiene los ribosomas (S_{30}).

Una alícuota de la fracción S_{30} con 0.5 unidades de A_{260} se depositó sobre un gradiente lineal de sacarosa (15 - 40%) preparado en buffer A y se centrifugó durante 135 min a 45.000 rpm en un rotor SW 50.1 (Spinco). La absorción óptica se midió en forma continua a 254 nm con un analizador ISCO.

16. Síntesis "in vivo" de proteínas

La velocidad de síntesis de proteínas "in vivo" se determinó en cultivos en fase exponencial media. Se agregó 0,5 μCi de ^{14}C -fenilalanina (concentración final 20 μM) a 5 ml de cultivo bacteriano, se continuó la incubación y a distintos tiempos se tomaron muestras de 0,5 ml que se recibieron en 0,5 ml de HONa 1 N que contenía albúmina y fenilalanina no radioactiva. Luego de 30 min a 37°C, las proteínas se precipitaron a 4°C con ácido tricloroacético (concentración final: 10%). Se filtró a través de papel de vidrio Whatman GF/C, los filtros se secaron y se midió la radioactividad en un contador de centelleo líquido.

17. Procedimientos genéticos

a) Obtención de la cepa BGA8 bp thyA: Para obtener mutantes thyA se empleó el método de Miller (140).

La cepa BGA8 bp se cultivó en medio mínimo con 200 $\mu\text{g/ml}$ de timina y cantidades crecientes del antibiótico trimetoprima. Por encima de 60 $\mu\text{g/ml}$ de antibiótico se inhibió el crecimiento, pero después de 48 hs de incubación se observó el desarrollo de bacterias resistentes. Se prepararon diluciones de estos cultivos en cajas de Petri con medio rico y 100 $\mu\text{g/ml}$ de timina de manera de obtener 50-100 colonias, algunas de las colonias formadas se repicaron en medio mínimo sin y con timina. Se observó que 49 de las 50 colonias ensayadas eran auxótrofas para timina. Se hicieron culti-

vos en medio líquido a partir de una de estas colonias para continuar el procedimiento.

- b) Obtención de un lisado de bacterias argA infectadas con fago P1: Se cultivó la cepa MA4 (argA) en medio rico L con Cl_2Ca 2,5 mM hasta obtener 5×10^5 células/ml de cultivo; 1,9 ml de este cultivo se mezclaron con 0,1 ml de suspensión de fagos P1 ($7 \cdot 10^7$ PFU/ml) y se dejó a 37°C durante 20 min; luego de ese período se tomaron seis alícuotas de 0,2 ml que se agregaron a sendos tubos que contenían 4 ml de agar blando L con Cl_2Ca 2,5 mM. Las mezclas obtenidas se vertieron en seis cajas de Petri con agar L y Cl_2Ca 2,5 mM y se incubaron a 37°C durante 8 hs. Luego a cada placa se agregó 2 ml de medio L con 2,5 mM Cl_2Ca , se recogió la parte líquida y después de centrifugar se tomó el sobrenadante que es el lisado producido por el fago P1.
- c) Transducción con fago P1 a la cepa BGA8 bp thyA: 5 ml de un cultivo fresco de la cepa BGA8 bp thyA en medio L con Cl_2Ca 2,5 mM se centrifugaron y las bacterias se resuspendieron en 5 ml de SO_4Mg 1 mM y CaCl_2 5 mM. A esta suspensión se agregaron distintas diluciones del lisado que contenía fago P1 desarrollado en la cepa MA4. Se incubó 20' a 37°C y la adsorción del fago se interrumpió con citrato de sodio 0,33 M. Las mezclas se pasaron a cajas de Petri que contenían medio mínimo con arginina (MMArg). En este medio no puede crecer la cepa BGA8 bp thyA, dado que no contiene timina, y sólo pueden multiplicarse las bacterias que han recibido el gen thyA por transducción. Todas las colonias obtenidas se probaron también para

auxotrofía de arginina. El 20% de las colonias requerían arginina por lo que se puede concluir que se produjo un 20% de cotrasducción de los genes *argA* y *thyA*. Una de estas colonias se purificó y se usó posteriormente (cepa BGA8 bp *argA*-1).

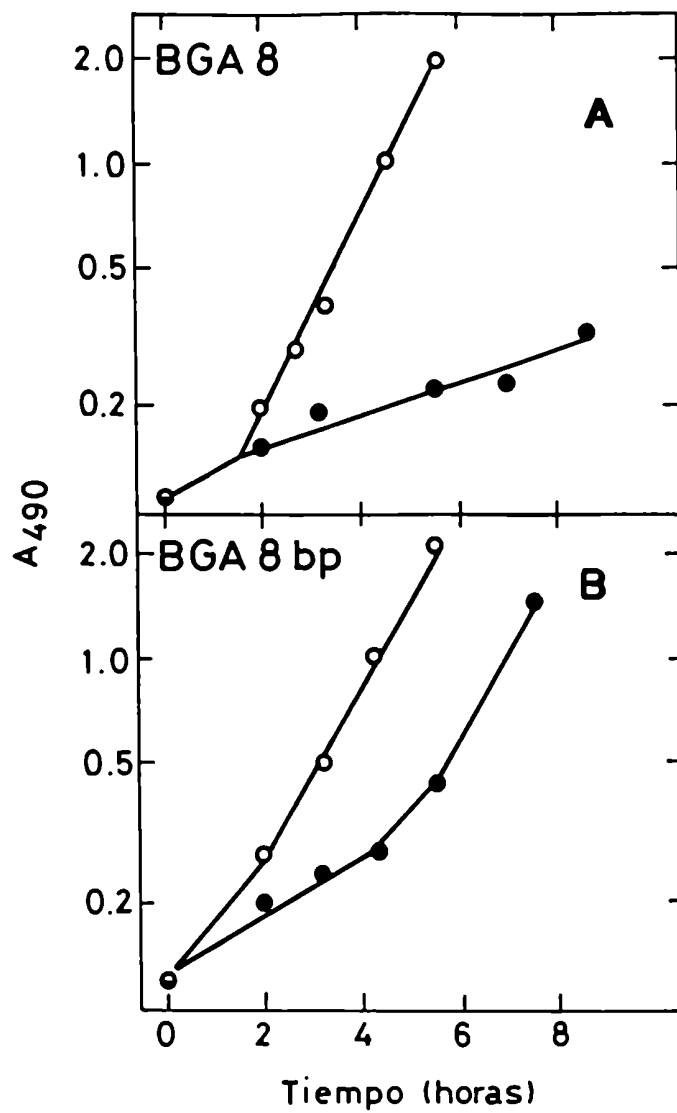


Figura 7: Curva de crecimiento de las cepas E. coli BGA8(A) y BGA8 bp(B)

Cultivos en ausencia (●) y presencia (○) de putrescina.

III. RESULTADOS

1. Características del crecimiento de la cepa E. coli BGA8

La cepa E. coli BGA8 no puede sintetizar poliaminas debido a que posee mutaciones en los genes de las enzimas ornitina decarboxilasa y agmatinasa. La velocidad de crecimiento de esta cepa aumenta considerablemente cuando se agrega putrescina o espermidina al medio de cultivo (Fig. 7A).

En medio mínimo el tiempo de duplicación es de 200 a 300 min en ausencia de poliaminas y de 75 min en presencia de 100 $\mu\text{g/ml}$ de putrescina. La espermidina acelera el crecimiento en forma similar.

La Figura 8 muestra el crecimiento de E. coli BGA8 en función de la concentración de putrescina en el medio de cultivo. Se puede observar que con niveles tan bajos como 3 $\mu\text{g/ml}$ ya se produce una neta estimulación del crecimiento.

2. Cultivos de E. coli BGA8 que se vuelven independientes del agregado de poliaminas para su crecimiento

Después de repetidos cultivos de E. coli BGA8 en ausencia de poliaminas observamos que esta cepa perdía su requerimiento de poliaminas y comenzaba a crecer rápidamente aún en ausencia de estas sustancias.

En cada período de ayuno de poliaminas un cultivo plenamente desarrollado hasta la fase estacionaria tardía se diluía 200 veces en un medio mínimo fresco sin poliaminas (MM). Luego de repetir de tres a seis veces con-

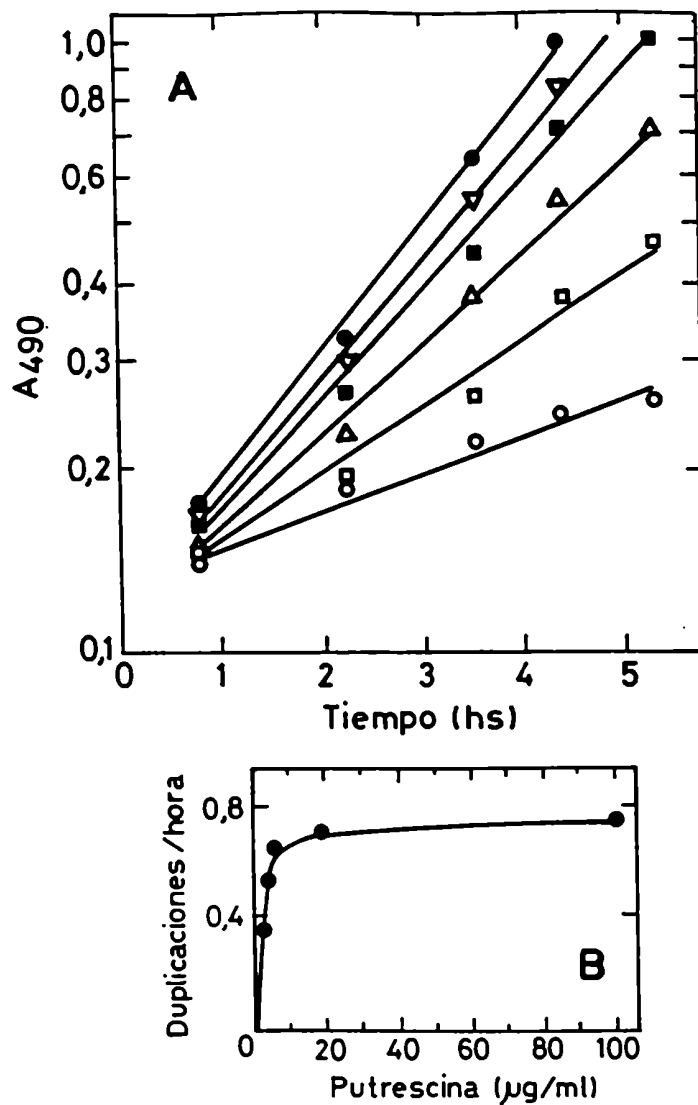


Figura 8: Crecimiento de la cepa E. coli BGA8 en función de la concentración de putrescina

(a) Crecimiento de E. coli BGA8 en cultivos con diferentes concentraciones de putrescina (○,0; □,0,1; ▲,1,0; ■,5,0; ▼,20 y ●,100 µg/ml). Los datos obtenidos a partir de (A) se utilizaron para calcular las velocidades de crecimiento (en duplicaciones/hora) representadas en (B) en función de la concentración de putrescina en el medio de cultivo.

secutivas este procedimiento (lo que representa 20 a 45 generaciones) los cultivos comenzaban a crecer a la misma velocidad en ausencia o presencia de poliaminas (Fig. 7B).

Cuando se incubó por 48 hs a 37°C la cepa BGA8 en cajas de Petri en medio sólido mínimo sin poliaminas, aparecieron algunas colonias grandes sobre un fondo de colonias pequeñas. Los cultivos obtenidos a partir de las colonias grandes demostraron también ser independientes de las poliaminas; en cambio, los cultivos desarrollados a partir de las colonias más pequeñas crecían lentamente sin poliaminas, en la forma característica de la cepa BGA8.

El cambio de alguna de las condiciones de cultivo de E. coli BGA8 como la temperatura, la fuente de carbono o la intensidad de aereación no impidieron la aparición de organismos independientes de poliaminas. Este resultado también se reprodujo trabajando con E. coli MA255 que es la cepa parental de la cual se obtuvo E. coli BGA8. Ambas difieren en que la primera es resistente y la segunda es sensible al antibiótico estreptomycin. Con E. coli MA255 sin embargo, fue mayor el número de generaciones requeridas para llegar a un crecimiento independiente de poliaminas, tanto en ausencia como en presencia de 50 ug/ml de estreptomycin.

2.1. Aislamiento de colonias

Se seleccionaron colonias aisladas de varios de los cultivos de BGA8 que habían perdido el requerimiento de poliaminas y se trabajó con una de ellas denominada E. coli BGA8 bp (por "by pass").

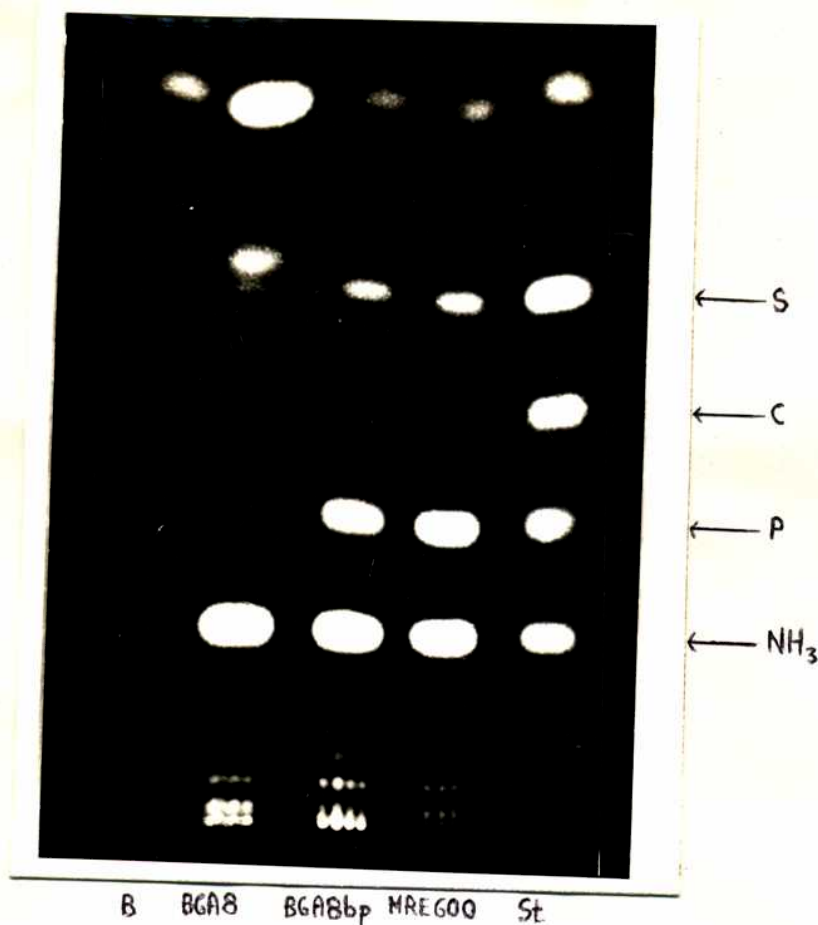


Figura 9: Contenido endógeno de poliaminas de E. coli BGA8, BGA8 bp y MRE600

Cromatografía en capa delgada de los extractos dansilados que se obtuvieron de bacterias cultivadas en ausencia de putrescina. Se analizaron también un "blanco" de reactivos (B) y "standards" de poliaminas puras (st). Como solvente de desarrollo se usó cloroformo:triethylamina (10:1, v/v). Se muestran las posiciones de putrescina (P), cadaverina (C) y espermidina (S). Se usaron diferentes volúmenes de muestras correspondientes a un número constante de bacterias. La fotografía se tomó bajo luz ultravioleta.

2.2. Contenido de poliaminas en las bacterias E. coli BGA8 bp

Para investigar si los microorganismos que habían perdido el requerimiento de poliaminas como la cepa BGA8 bp, habían recuperado la capacidad de sintetizar estas sustancias, o si podían crecer aún en ausencia de las mismas, se analizó el contenido endógeno de poliaminas. Para ello se utilizó el método de dansilación de extractos ácidos bacterianos y separación por T.L.C. que se describe en "Materiales y Métodos".

Se utilizaron como controles la cepa salvaje MRE600, E. coli MA17 (que dio origen a la cepa MA255) y la cepa BGA8; ésta última sirvió como control negativo, dado que carece de poliaminas (101).

En la Fig. 9 se muestra un análisis por cromatografía en capa delgada de los derivados dansilados de las poliaminas presentes en las cepas mencionadas anteriormente y en la Tabla III se dan los valores normalizados para igual número de células.

Se puede observar que mientras la cepa BGA8 contiene sólo trazas de putrescina y un tercio de la concentración normal de espermidina, E. coli BGA8 bp posee concentraciones de putrescina y espermidina similares a las de la cepa salvaje MRE600.

Los niveles de putrescina y espermidina hallados en la cepa MRE600 son semejantes a los encontrados en otras cepas salvajes cultivadas en medio mínimo (41,76).

El contenido relativamente alto de espermidina remanente en la cepa BGA8

Tabla III: Contenido endógeno de poliaminas en E. coli BGA8, BGA8 bp, MRE600 y MA17

Bacteria	Putrescina (nmol/ml A490)	Espermidina
E. coli BGA8	0,38	0,55
E. coli BGA bp	7,47	1,85
E. coli MRE600	10,08	1,67
E. coli MA17	6,00	1,22

Las bacterias se cultivaron en ausencia de putrescina y los extractos se dan-silaron y analizaron como se describe en la Figura 9 y en "Materiales y Métodos". Los valores representan promedios de, por lo menos, dos deter-minaciones en cada caso y están normalizados para 1 ml de cultivo con una absorbancia de 1 a 490 nm.

puede deberse a que la escasa cantidad de putrescina formada por la actividad residual de las enzimas biosintéticas, se convierte en espermidina que se acumula como producto final.

La mancha fluorescente que se observa delante de dansil-espermidina en la muestra correspondiente a la cepa BGA8 fue identificado previamente como el derivado dansilado de γ -aminobutiraldehído (76) formado a partir de ornitina durante la reacción de dansilación (141).

Las manchas fluorescentes en el frente del cromatograma se deben a productos formados por los reactivos, ya que también están presentes en el ensayo "blanco" de la reacción.

Las manchas que aparecen cerca del origen son de naturaleza desconocida y no se deben a los derivados dansilados de poliaminas acetiladas, pues no modifican su movilidad luego de hidrolizar las muestras con ClH 10N a 110°C durante 1 hora.

La presencia de putrescina y espermidina en E. coli BGA8 bp fue confirmada utilizando otro solvente (ciclohexano:acetato de etilo (1:1)) en los análisis cromatográficos de los extractos dansilados.

Aunque la presencia en la cepa BGA8 bp de una poliamina desconocida que se comporte como putrescina en las cromatografías con varios solventes no se puede descartar totalmente, los resultados sugieren que E. coli BGA8 bp recuperó la capacidad de sintetizar putrescina.

Tabla IV: Actividades específicas de las enzimas biosintéticas de poliaminas en varias cepas de E. coli

Bacteria	Ornitina decarboxilasa constitutiva		Arginina decarboxilasa constitutiva		Agmatinasa	
	Unidades/ mg.proteína	%	Unidades/ mg.proteína	%	Unidades/ mg.proteína	%
E. coli MRE600	414,00	100	728	100	15,10	100
E. coli BGA8	0,38	0,09	666	91	0,33	2,1
E. coli BGA8 bp	1,10	0,26	666	91	0,62	4,0
E. coli MA17	288,0	69	473	65	3,20	22,0
E. coli BGA8 4MM	89,0	21	nd	nd	0,25	1,26
E. coli BGA8 61	0,8	0,19	nd	nd	6,00	40,0

Los ensayos enzimáticos se realizaron como se describe en "Materiales y Métodos". Los valores representan promedios de, por lo menos, dos determinaciones en cada caso. Los resultados también se expresan como porcentajes de los respectivos valores hallados en E. coli MRE600.
nd: no dosado.

2.3. Medición de las enzimas biosintéticas de poliaminas

Con el propósito de investigar si la cepa BGA8 bp había recuperado la capacidad de sintetizar poliaminas por reversión genética o por la inducción de un camino biosintético desconocido, se midieron las actividades enzimáticas de ornitina decarboxilasa, agmatinasa y arginina decarboxilasa.

Los valores hallados se muestran en la Tabla IV.

Los resultados indicaron que las cepas BGA8 y BGA8 bp contienen muy baja cantidad de ornitina decarboxilasa y agmatinasa. La actividad residual de esta última es un orden de magnitud mayor que la actividad remanente de ornitina decarboxilasa. Sin embargo, los métodos de dosaje utilizados en ambos casos son de muy diferente sensibilidad, ya que se empleó un método radioisotópico para la ornitina decarboxilasa y un método fotocolorimétrico para dosar agmatinasa. La actividad de arginina decarboxilasa constitutiva fue similar en las cepas BGA8, BGA8 bp y MRE600 como se podía prever, dado que el gen de esta enzima no se encuentra mutado en ninguna de las tres cepas.

En el caso de la cepa salvaje MA17 las actividades específicas de las tres enzimas fueron menores que en la cepa MRE600. La causa de estos resultados es desconocida, pero es interesante señalar que E. coli MA17 creció lentamente aún en un medio mínimo con todos sus requerimientos nutritivos, por lo que se sospecha que tiene alguna deficiencia adicional.

De los resultados descriptos se puede concluir que el crecimiento ace-

Tabla V: Actividad específica de ornitina decarboxilasa inducible en E. coli BGA8 y BGA8 bp y Enterobacter aerogenes .

Bacteria	Unidades/mg.proteína	%
E. aerogenes	1046	100
E. coli BGA8	11,8	1,1
E. coli BGA8 bp	3,4	0,3

Los cultivos se efectuaron a pH 5,0 y con exceso de ornitina. La actividad enzimática se ensayó a pH 6,3 como se detalla en la sección experimental. Los valores representan promedios de determinaciones por duplicado. Los resultados también se expresan como porcentajes de los valores obtenidos en E. aerogenes.

lerado de E. coli BGA8 bp en ausencia de poliaminas no se debe a una reversión genética de los genes de ornitina decarboxilasa ni de agmatinasa.

Algunos cultivos obtenidos a partir de colonias aisladas resultaron ser verdaderos revertantes como se ve en la Tabla IV, (BGA8⁴MM y G1) ya que poseen niveles considerables de actividad de ornitina decarboxilasa o agmatinasa. Pese a que no se realizó un estudio estadístico, estas reversiones "verdaderas" aparecieron más frecuentemente que las formas "by pass" que no poseen ninguna de las dos enzimas. En este trabajo de tesis sólo se utilizó la cepa E. coli BGA8 bp.

2.3.1. Medición de ornitina decarboxilasa inducible

Algunas cepas de E. coli poseen una forma inducible de la ornitina decarboxilasa además de la forma constitutiva. Por esta razón, la capacidad de la cepa BGA8 bp para sintetizar putrescina podría deberse a la aparición de una ornitina decarboxilasa inducible. Para dosar esta actividad se usó como control positivo un extracto de Enterobacter aerogenes, pues se conoce que esta bacteria posee niveles muy altos de dicha enzima (83).

La actividad de la ornitina decarboxilasa inducible también resultó ser muy baja en la cepa BGA8 bp (Tabla V). Este resultado está de acuerdo con los de otros autores que no encontraron actividad ornitina decarboxilasa inducible en E. coli K12 ni en las cepas derivadas de ella.

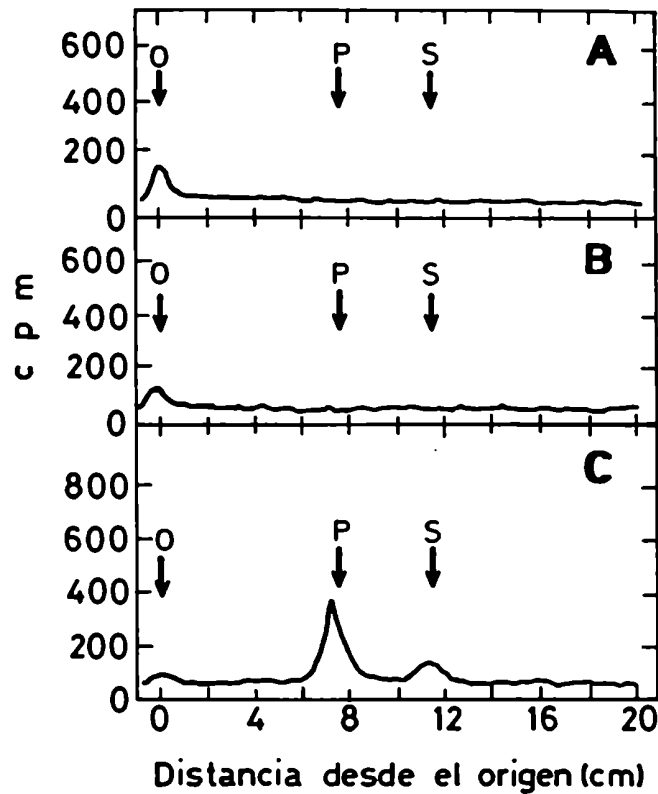


Figura 10: TLC de los extractos dansilados obtenidos de bacterias E. coli BGA8 (A), BGA8 bp (B) y MRE 600 (C) cultivadas en presencia de ^{14}C -arginina

Las 3 cepas se cultivaron sin poliaminas. Luego de la incubación con ^{14}C -arginina por 1 h, los extractos celulares se trataron y analizaron por TLC como se describe en "Materiales y Métodos" empleando como solvente de desarrollo cloroformo:triethylamina (10:1).

Se muestra la distribución de la radioactividad en los cromatogramas y las posiciones del origen de siembra (O), de putrescina (P) y espermidina (S).

Tabla VI: Conversión de ^{14}C -arginina en poliaminas en E. coli BGA8, BGA8 bp y MRE600

Bacteria	Putrescina		Espermidina	
	cpm/A490.ml	%	cpm/A490.ml	%
E. coli MRE600	3860	100	1660	100
E. coli BGA8	48	1,2	22	1,3
E. coli BGA8 bp	58	1,5	12	0,7

Los picos radioactivos correspondientes a los cromatogramas en capa delgada (TLC) (Fig. 10) fueron eluidos y se determinó su radioactividad. Los valores están normalizados para 1 ml de cultivo con una absorbancia de 1 a 490 nm.

2.4. Conversión de arginina y ornitina en putrescina

Para confirmar que la ornitina y la arginina no se convierten en putrescina en E. coli BGA bp, se llevaron a cabo varios experimentos "in vivo" en los cuales los cultivos bacterianos se incubaron con ^{14}C -arginina o ^{14}C -ornitina durante 1 hora analizando luego por T.L.C. los extractos ácidos dansilados. Las zonas correspondientes a poliaminas se localizaron en las placas con un radiocromatógrafo, se rasparon, eluyeron y se determinó su radioactividad mediante centelleo líquido.

2.4.1. Incubación con ^{14}C arginina

La Figura 10 muestra la distribución de radioactividad de cromatogramas correspondientes a extractos de distintas cepas bacterianas incubadas con ^{14}C -arginina.

En la Tabla VI se dan los valores normalizados para igual número de células.

Se puede observar que la conversión de ^{14}C -arginina en putrescina en las cepas BGA8 y BGA8 bp es prácticamente despreciable comparada con la que ocurre en la cepa salvaje MRE600. Por lo tanto se puede concluir que en E. coli BGA8 bp no ocurre síntesis de putrescina a partir de arginina. Este resultado descarta además una posible conversión a través de N-carbamil putrescina (71,85,86 y Fig. 4).

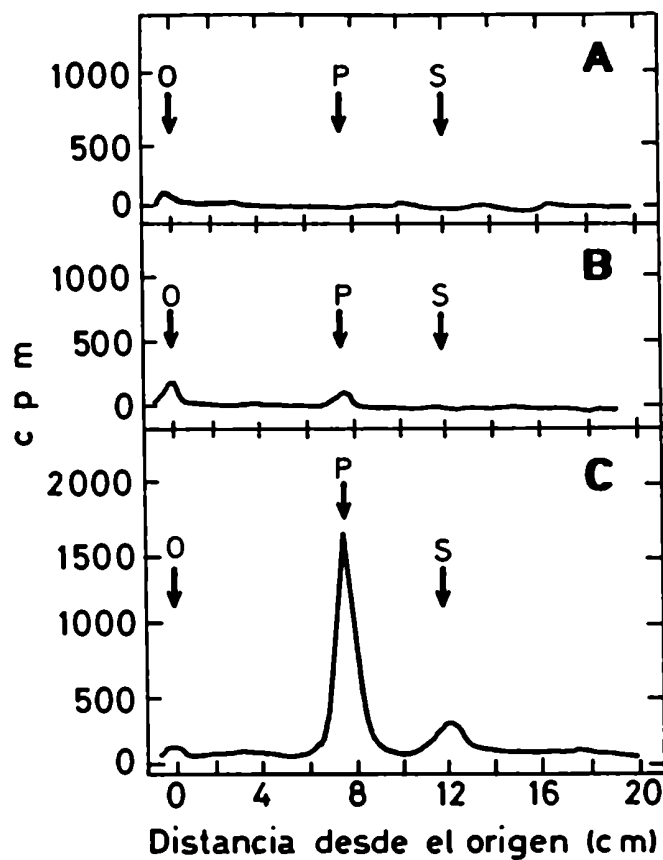


Figura 11: TLC de los extractos dansilados obtenidos de bacterias E. coli BGA8 (A), BGA8 bp (B) y MRE600 (C) cultivadas en presencia de ^{14}C -ornitina

Los detalles son similares a los descritos en la Fig. 10, excepto que en este caso se utilizó ^{14}C -ornitina.

Tabla VII: Conversión de ^{14}C -ornitina en poliaminas en E. coli BGA8, BGA8 bp y MRE600

Bacteria	Putrescina		Espermidina	
	cpm/A490.ml	%	cpm/A490.ml	%
E. coli MRE600	11155	100	2220	100
E. coli BGA8	130	1,1	117	5,2
E. coli BGA8 bp	387	3,5	82	3,6

Los detalles son similares a los de la Tabla VI; los picos radioactivos fueron eluidos del cromatograma correspondiente a la Fig. 11.

2.4.2. Incubación con ^{14}C -ornitina

En la Figura 11 y en la Tabla VII se muestran los resultados correspondientes a la incubación con ^{14}C -ornitina.

En este caso también se observa que en la cepa BGA8 bp la conversión de ornitina en putrescina fue considerablemente menor a la que ocurrió en la cepa salvaje MRE600. En estos experimentos los resultados fueron más variables que los obtenidos cuando se usó ^{14}C -arginina como precursor.

El pico radioactivo en el origen fue identificado como correspondiente al dansil derivado de agmatina por elución de la zona y recromatografiado en T.L.C. usando benceno:metanol(9:1) como solvente. En dicho sistema se observaron dos picos radioactivos con Rf de 0,00 y 0,19 que corresponden de acuerdo a Seiler a los derivados monodansilados de agmatina (142).

2.4.3. Captación de arginina y ornitina

Los resultados de la formación de putrescina a partir de ^{14}C -arginina o ^{14}C -ornitina no permitían descartar la posibilidad de que en la cepa BGA8 bp existiera un defecto en el transporte de dichos aminoácidos, en vez de un verdadero bloqueo metabólico entre arginina u ornitina y putrescina. Por lo tanto, se midió la captación de ambos aminoácidos en E. coli BGA8 bp y en ambas cepas control. En la Figura 12 se muestran las curvas de velocidad de captación de ornitina y arginina.

La captación de arginina fue similar en las cepas BGA8 bp y MRE600,

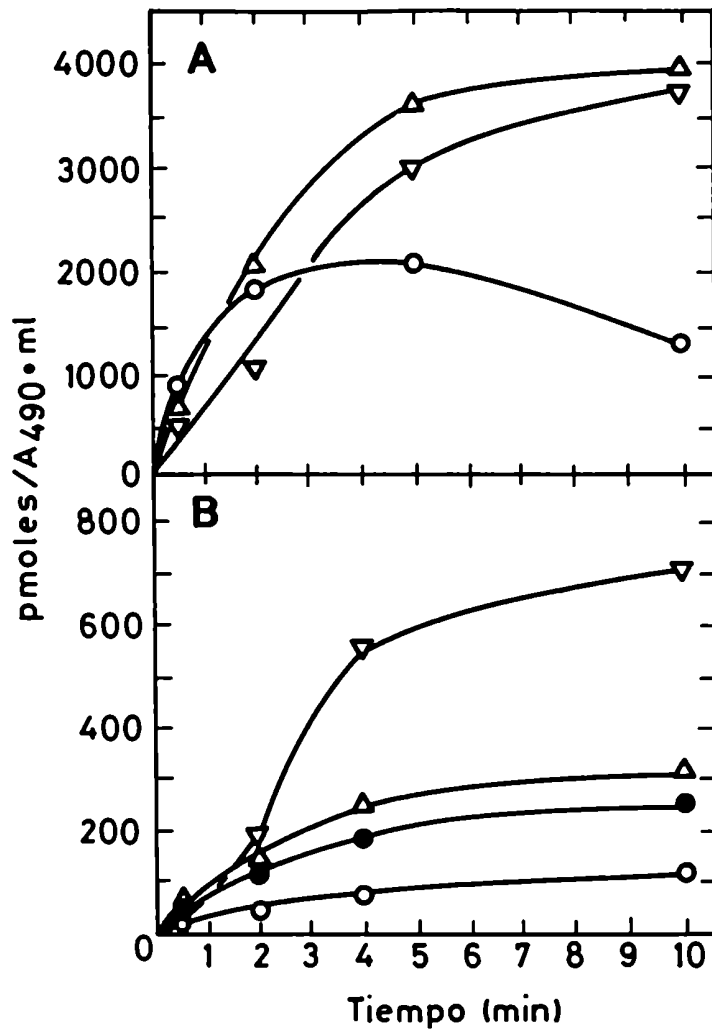


Figura 12: Captación de ornitina y arginina por E. coli BGA8, BGA8 bp y MRE600 en presencia de cloramfenicol

Las bacterias se incubaron con ^{14}C -arginina (A) o ^{14}C -ornitina (B) y se tomaron muestras a los tiempos indicados. Las curvas corresponden a E. coli MRE600 (∇), BGA8 bp (Δ) y BGA8 cultivada sin (\circ) y con (\bullet) poliaminas. Los valores están normalizados para 1 ml de cultivo con una absorbancia a 490 nm de 1.

pero menor en E. coli BGA8 cultivada sin poliaminas. Por otro lado la velocidad inicial de captación de ornitina fue igual en las cepas MRE600 y BGA8 bp llegando esta última a un nivel final del orden de la mitad del alcanzado en la cepa salvaje. A su vez la cepa BGA8 mostró mayor captación de ornitina cuando los cultivos se realizaron en presencia de putrescina.

En otro experimento de captación de ornitina se agregó el compuesto ácido aminooxiacético (AOA), que es inhibidor de las decarboxilasas. Los resultados obtenidos fueron similares. Se puede concluir que la incapacidad de la cepa BGA8 bp para formar putrescina a partir de ^{14}C -arginina no se debe a un defecto en la captación del aminoácido. Respecto de la formación de putrescina a partir de ^{14}C -ornitina se llega a la misma conclusión ya que la captación de ornitina (50% menor en la cepa BGA8 bp respecto de la cepa salvaje), no permite explicar la radioactividad en putrescina que resultó 20 veces menor en la cepa BGA8 bp.

2.4.4. Contenido endógeno de arginina y ornitina

En los experimentos descriptos de formación de putrescina a partir de ornitina o arginina radioactivas, un elevado contenido endógeno de estos aminoácidos en la cepa BGA8 bp podría producir una gran dilución isotópica de estos compuestos e impedir la detección de putrescina radioactiva. Esta posibilidad fue descartada, ya que las concentraciones de ornitina y arginina medidas con un analizador automático de aminoácidos indicaron que no había diferencias significativas entre las cepas BGA8 bp y MRE600 cuando se com-

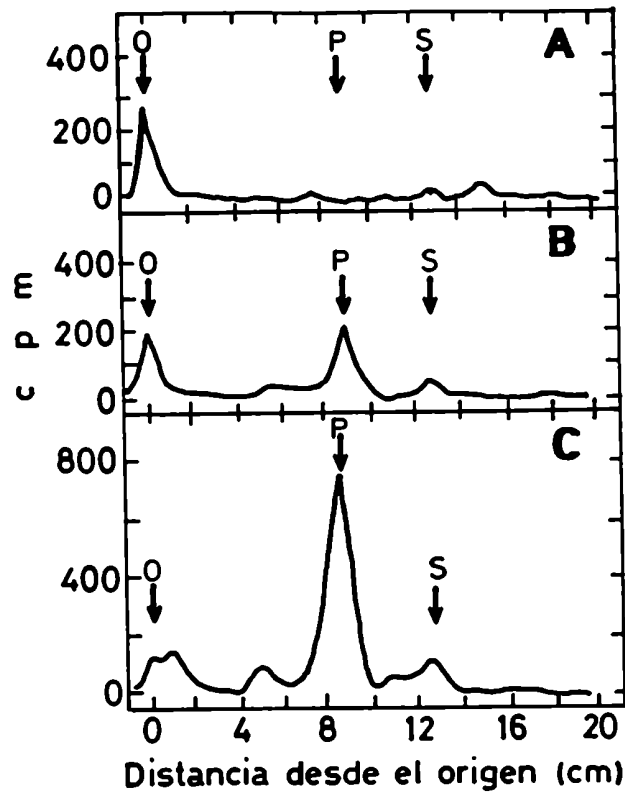


Figura 13: TLC de los extractos dansilados obtenidos de bacterias E. coli BGA8 (A), BGA8 bp (B) y MRE600 (C) cultivadas en presencia de ^{14}C -glucosa

Las 3 cepas se cultivaron sin poliaminas. Luego de la incubación con ^{14}C -glucosa durante 2 h, los extractos celulares se trataron y analizaron por TLC como se describe en "Materiales y Métodos", empleando como solvente de desarrollo cloroformo:triethylamina (10:1). Se muestra la distribución de radioactividad en los cromatogramas y las posiciones del origen de siembra (O), putrescina (P) y espermidina (S).

Tabla VIII: Conversión de ^{14}C -glucosa en poliaminas en *E. coli* BGA8, BGA8 bp y MRE600

Bacteria	Agregado de ornitina	Putrescina		Espermidina	
		cpm/A490.ml	%	cpm/A490.ml	%
<i>E. coli</i> BGA8	-	22	100	42	100
	+	41	186	76	181
<i>E. coli</i> BGA8 bp	-	300	100	276	100
	+	147	49	176	64
<i>E. coli</i> MRE600	-	610	100	230	100
	+	2	0,3	40	17

Los cultivos bacterianos se incubaron con ^{14}C -glucosa durante 2 hs en medios sin poliaminas sin ningún agregado (-) o con 100 $\mu\text{g/ml}$ de ornitina (+), se prepararon los extractos perclóricos que se dansilaron y analizaron por TLC. Las zonas correspondientes a las poliaminas se rasparon, eluyeron y se determinó su radioactividad. Los valores están normalizados para 1 ml de cultivo con una absorbancia de 1 a 490 nm.

paraba los niveles endógenos de cada una de estas sustancias. Pese a esto en la cepa BGA8 bp no se detectó putrescina radioactiva, mientras en MRE600 se formó una cantidad considerable de esta sustancia (Figs. 10 y 11).

2.5. Conversión de glucosa en putrescina

También se estudió la síntesis de putrescina a partir de ^{14}C -glucosa uniformemente marcada. Los cultivos bacterianos se incubaron con el azúcar radioactivo durante 120 min y se analizaron luego por T.L.C. los extractos ácidos dansilados.

La Figura 13 muestra uno de los radiocromatogramas obtenidos y en la Tabla VIII se dan los resultados normalizados para igual número de células.

Los resultados mostraron que se formó putrescina radioactiva en las cepas BGA8 bp y MRE600, siendo negativo el resultado en la cepa BGA8. La conversión de glucosa en putrescina en E. coli BGA8 bp fue aproximadamente la mitad de la observada en la cepa MRE600.

En otro experimento los cultivos bacterianos se incubaron con ^{14}C -glucosa y un exceso de ornitina. Si el camino metabólico desde glucosa a putrescina involucrara a la ornitina como intermediario, el agregado de esta sustancia al medio provocaría una disminución marcada en la actividad específica del "pool" endógeno de ornitina y por consiguiente una drástica reducción de la radioactividad de putrescina.

La Tabla VIII muestra que la disminución de la radioactividad en putrescina fue mucho mayor en la cepa salvaje que en la cepa BGA8 bp; en cam-

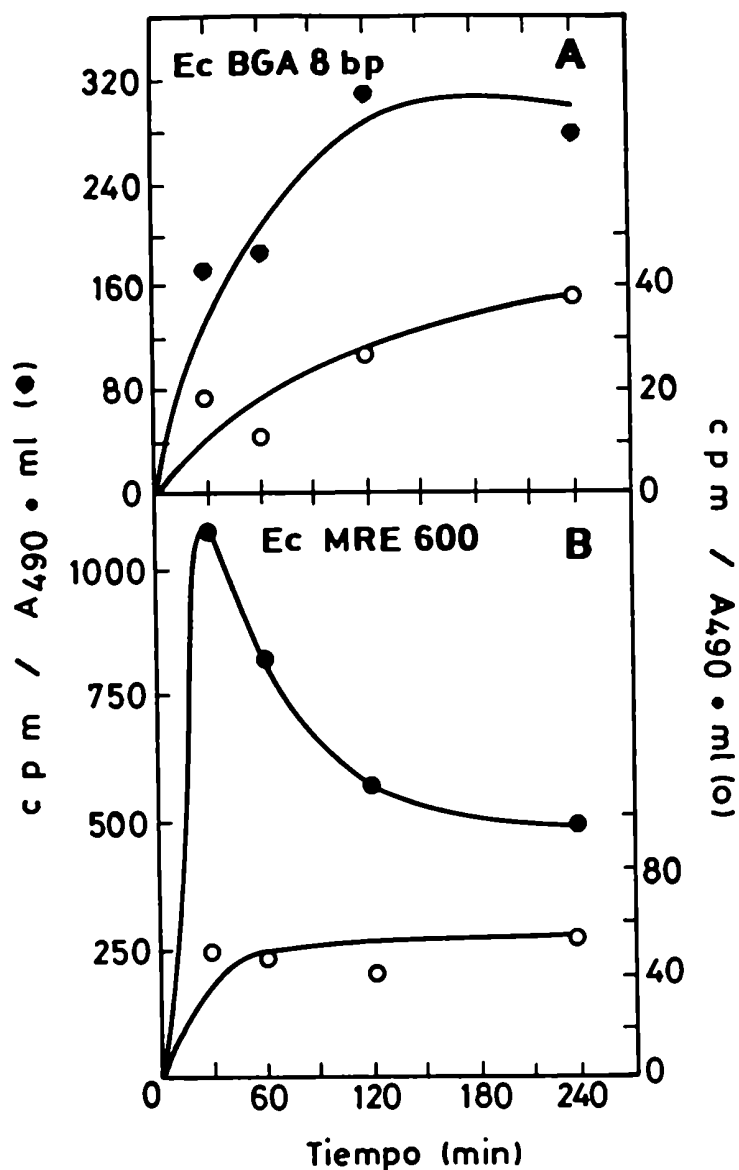


Figura 14: Cinética de la conversión de ^{14}C -glucosa en putrescina

Las bacterias *E. coli* BGA8 bp (A) y MRE600 (B) fueron incubadas con ^{14}C -glucosa a diferentes tiempos y los extractos solubles obtenidos fueron analizados por TLC. Las zonas correspondientes a putrescina (●) y espermidina (○) se rasparon y fueron extraídas, determinándose la radioactividad por centelleo líquido.

bio, la radioactividad en la espermidina se redujo poco en ambas cepas. Estos resultados parecen indicar que en E. coli BGA8 bp el camino biosintético de putrescina a partir de glucosa, no involucra a la ornitina como intermediario.

Experimentos similares a los anteriores realizados con ^{14}C -glucosa y arginina provocaron una gran caída en la radioactividad de la putrescina en las cepas BGA8 bp y MRE600. En este caso, sin embargo, no es válida la interpretación mencionada más arriba, pues se conoce que la arginina inhibe la acetilación del ácido glutámico (74), que podría ser un paso intermedio de la síntesis de putrescina.

2.5.1. Cinética de la síntesis de poliaminas a partir de glucosa

La Figura 14 muestra la cinética de conversión de ^{14}C -glucosa en putrescina y espermidina en las cepas MRE600 y BGA8 bp.

En E. coli MRE600 se llegó a un máximo de putrescina radioactiva en el tiempo más corto de marcación estudiado, y en los tiempos más largos se produjo una disminución continua. En la cepa BGA8 bp se observó un aumento constante de la radioactividad en putrescina hasta las dos horas de incubación. En ambas cepas la marcación en espermidina fue apreciablemente menor que en putrescina.

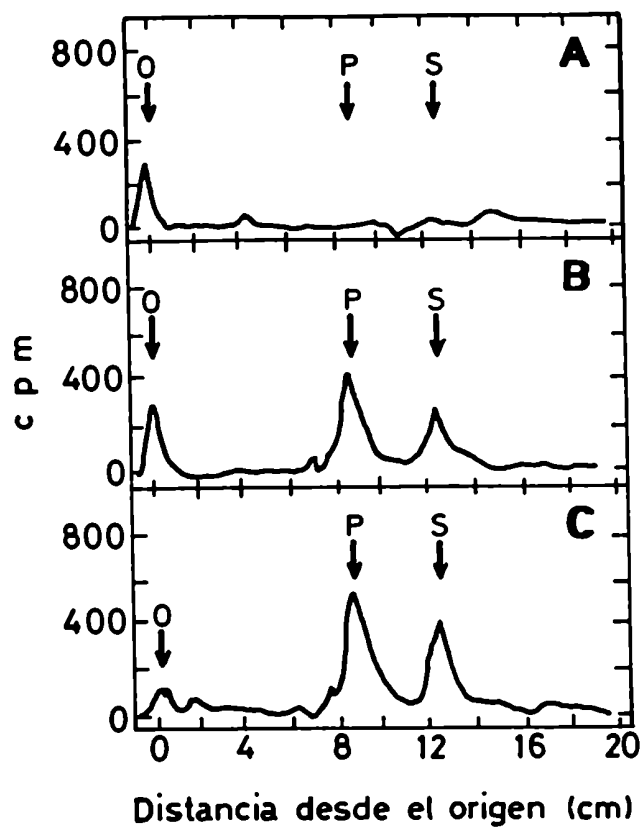


Figura 15: TLC de los extractos dansilados obtenidos de bacterias E. coli BGA8 (A), BGA8 bp (B) y MRE600 (C) cultivadas en presencia de ^{14}C -ácido glutámico

Los detalles son similares a los descritos en la Figura 13.

Tabla IX: Conversión de ^{14}C -ácido glutámico en poliaminas en *E. coli* BGA8, BGA8 bp y MRE600

Bacteria	Agregado de ornitina	Putrescina		Espermidina	
		cpm/A490.ml	%	cpm/A490.ml	%
<i>E. coli</i> BGA8	-	32	100	54	100
	+	22	67	50	92
<i>E. coli</i> BGA8 bp	-	1052	100	477	100
	+	410	39	192	40
<i>E. coli</i> MRE600	-	695	100	309	100
	+	62	9	222	36

Los cultivos bacterianos se incubaron sin o con ornitina en presencia de ^{14}C -ácido glutámico por 2 hs. Todos los otros detalles son similares a los de la Tabla VIII.

2.6. Conversión de ácido glutámico en putrescina

Cultivos de E. coli BGA8 bp, BGA8 y MRE600 se incubaron durante 2 horas con ^{14}C -ácido glutámico (uniformemente marcado) con el fin de investigar su posible conversión en poliaminas. En forma similar a los experimentos realizados con ^{14}C -glucosa se observó que en las cepas BGA8 bp y MRE600 hay síntesis de putrescina y espermidina a partir de ácido glutámico (Fig. 15). En cambio en E. coli BGA8 no se detectó esta conversión.

En la Tabla IX se dan los resultados normalizados para igual número de células.

En otro experimento los cultivos bacterianos se incubaron simultáneamente con ornitina y con ^{14}C -ácido glutámico. Si el camino metabólico desde ácido glutámico a putrescina involucrara a la ornitina como intermediario se debería esperar que la radioactividad en putrescina disminuyera drásticamente. La Tabla IX muestra que la reducción de la radioactividad en putrescina fue mayor en la cepa salvaje que en la cepa E. coli BGA bp aunque dicha diferencia fue menor que la observada en la marcación a partir de ^{14}C -glucosa. Por otra parte, la disminución en la radioactividad en espermidina fue igual en ambas cepas.

Si se toman en conjunto los experimentos de síntesis de putrescina a partir de glucosa y de ácido glutámico, se puede concluir que la disminución de radioactividad en putrescina provocada por el agregado de ornitina a los cultivos fue mayor en la cepa salvaje que en E. coli BGA8 bp. Estos resulta-

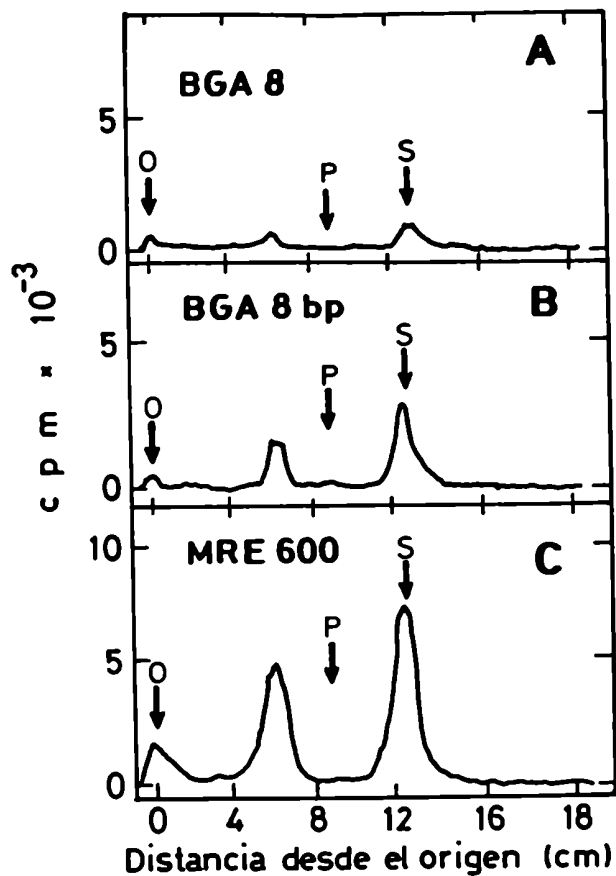


Figura 16: TLC de los extractos dansilados obtenidos de bacterias *E. coli* BGA8 (A), BGA8 bp (B) y MRE600 (C) incubadas con ¹⁴C-espermidina

Las 3 cepas se cultivaron sin poliaminas. Luego de agregar ¹⁴C-espermidina durante 1 h los extractos celulares se trataron y analizaron por TLC como se describe en "Materiales y Métodos" empleando como solvente cloroformo:triethylamina (10:1). Se muestra la distribución de la radioactividad en los cromatogramas y las posiciones correspondientes al origen de siembra (O), putrescina (P) y espermidina (S).

dos apoyan la hipótesis de que la ornitina no es un intermediario de la síntesis de putrescina en la cepa BGA8 bp.

También se estudió la síntesis de putrescina a partir de (2,3-³H)ácido glutámico y se detectó putrescina radioactiva en las cepas BGA8 bp y MRE600, pero no en E. coli BGA8.

2.7. Conversión de espermidina en putrescina

La posible conversión de espermidina en putrescina también se investigó en E. coli BGA8 bp, BGA8 y MRE600. Los cultivos se incubaron con ¹⁴C-espermidina durante 1 hora y los extractos obtenidos con ácido perclórico se dansilaron y analizaron por T.L.C. como ya se ha descrito. En la Figura 16 se puede observar que no hubo conversión significativa de espermidina en putrescina en ningún caso, en cambio se detectó un pico radioactivo importante entre el origen y la putrescina, que presumiblemente corresponde a N-acetilespermidina, pues no se movió del origen de la cromatografía cuando se desarrolló con acetato de etilo:ciclohexano(1:1) como ocurre con el compuesto mencionado (142).

Tabla X: Contenido endógeno de poliaminas en las distintas fases de crecimiento de E. coli BGA8 bp

Cultivo recogido en:	Putrescina (n.nmol/A490.ml)	Espemidina (n.nmol/A490.ml)
Fase lenta	0,55	0,91
Fase exponencial	8,88	1,40
Fase estacionaria	0,46	0,91

Las bacterias se cultivaron en ausencia de poliaminas y se recogieron en distintas fases de crecimiento, determinándose el contenido endógeno de poliaminas como se describe en la Tabla III y en "Materiales y Métodos".

2.8. Características de la cepa E. coli BGA8 bp

2.8.1. Fases de crecimiento: La cepa BGA8 bp presenta una etapa de crecimiento lento antes de alcanzar su velocidad máxima de desarrollo (Fig. 7B).

Este efecto sólo se observa si el cultivo se inicia con células provenientes de un inóculo en fase estacionaria. Por otra parte si se diluyen bacterias BGA8 bp en crecimiento exponencial estas continúan desarrollándose rápidamente sin pasar por ninguna fase lenta.

Al medir el contenido endógeno de poliaminas en bacterias BGA bp provenientes de la fase estacionaria y de la etapa de crecimiento lento se comprobó que éstas tenían una cantidad de putrescina 15 veces menor que las bacterias en crecimiento exponencial. En cambio el nivel de espermidina disminuyó sólo a la mitad (Tabla X).

El contenido de poliaminas de la cepa MRE600 no cambia significativamente en las distintas fases de crecimiento.

2.8.2. Crecimiento prolongado de E. coli BGA8 bp en putrescina: Con el propósito de investigar si las bacterias BGA8 bp perdían su capacidad de crecer rápidamente en ausencia de poliaminas cuando se las mantenía por varias generaciones en presencia de 100 µg/ml de putrescina o en el medio rico TYE, se las sometió a tales tratamientos. La cepa BGA8 bp mantuvo su característico crecimiento rápido sin el agregado de poliaminas exógenas, luego de haber sido cultivada en medio rico o en presencia de poliaminas y sometida nuevamente a un ayuno de estas sustancias.

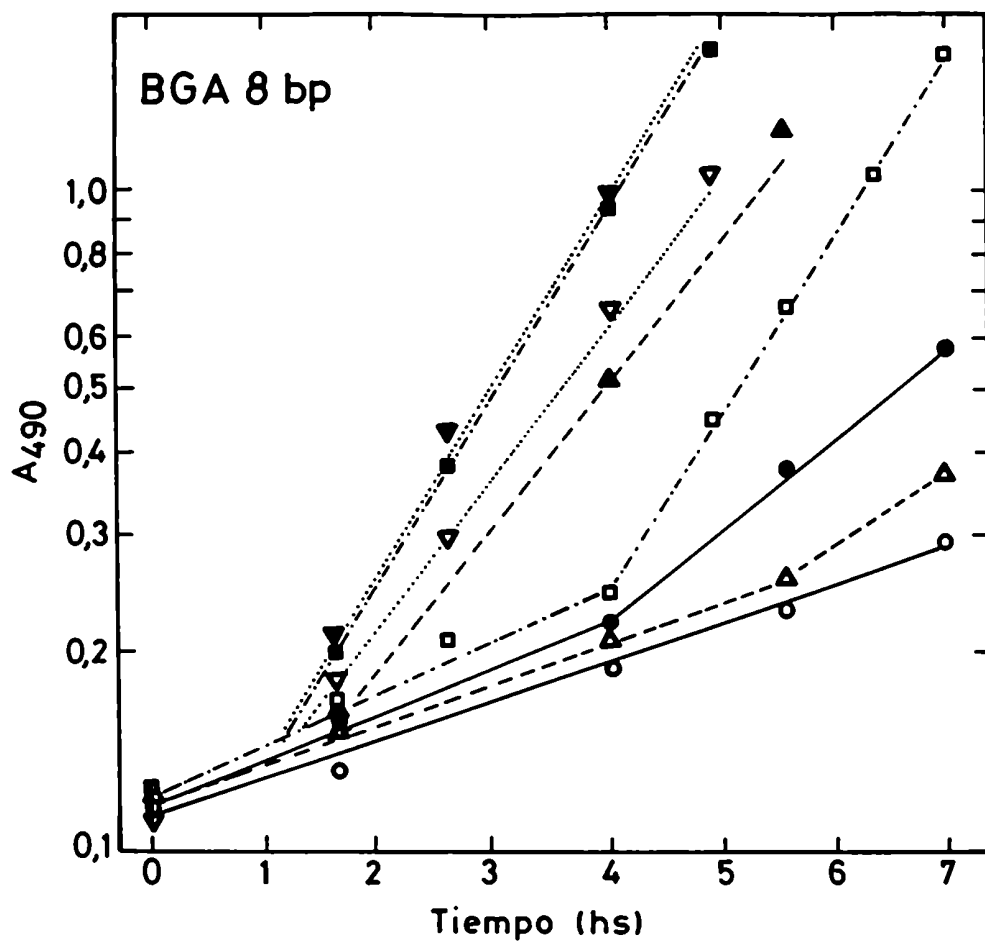


Figura 17: Curvas de crecimiento de E. coli BGA8 bp a diferentes temperaturas

Crecimiento de E. coli BGA8 bp en cultivo realizados a 24°C (O,●), 30°C (Δ,▲), 37°C (□,■) y 42°C (▽,▼), en ausencia (O,Δ,□,▽) o presencia (●,▲,■,▼) de putrescina.

Tabla XI: Tiempo de duplicación de E. coli BGA8, BGA8 bp y MRE600 cultivadas a diferentes temperaturas

Tiempo de duplicación (min)

	24°C		30°C		37°C		42°C	
	-P	+P	-P	+P	-P	+P	-P	+P
	BGA8	435	175	350	115	240	80	320
BGA8 bp	350	155	160	95	90	75	90	75
MRE600	120	-	70	-	55	-	60	-

Los valores se obtuvieron en la fase logarítmica media de crecimiento de cultivos sin (-P) y con (+P) putrescina.

2.8.3. Crecimiento de la cepa BGA8 a diferentes temperaturas: En la Figura 17 se muestran las curvas de crecimiento de la cepa BGA8 bp a diferentes temperaturas en medios con o sin putrescina y en la Tabla XI se dan los tiempos de duplicación de las cepas BGA8, BGA8 bp y MRE600 en las diferentes condiciones mencionadas.

Se puede observar que en la cepa BGA8 bp la etapa de crecimiento lento se hace más corta a medida que aumenta la temperatura. Este hecho determina que a 42°C no se observe el crecimiento bifásico, característico de estas bacterias que se desarrollan rápidamente desde la iniciación del cultivo.

La diferencia de crecimiento de la cepa BGA8 en medios con y sin putrescina se mantiene a todas las temperaturas dentro del rango estudiado.

A 37°C la cepa salvaje MRE600 crece con el mismo tiempo de duplicación en medios con y sin poliaminas.

2.8.4. Crecimiento de la cepa BGA8 bp en diferentes fuentes de carbono: Se emplearon cuatro fuentes de carbono diferentes para el crecimiento de E. coli BGA8 bp y las cepas controles. Las sustancias utilizadas fueron glucosa, manosa, succinato de sodio y glicerol, todas a una concentración final de 1%. La elección de las fuentes de carbono se realizó por las siguientes razones: manosa, por ser una hexosa diferente de glucosa; succinato de sodio, como una fuente de carbono poco utilizada por E. coli y glicerol, por ser un carbohidrato que no causa represión catabólica.

En la Tabla XII se indican los tiempos de duplicación de las cepas

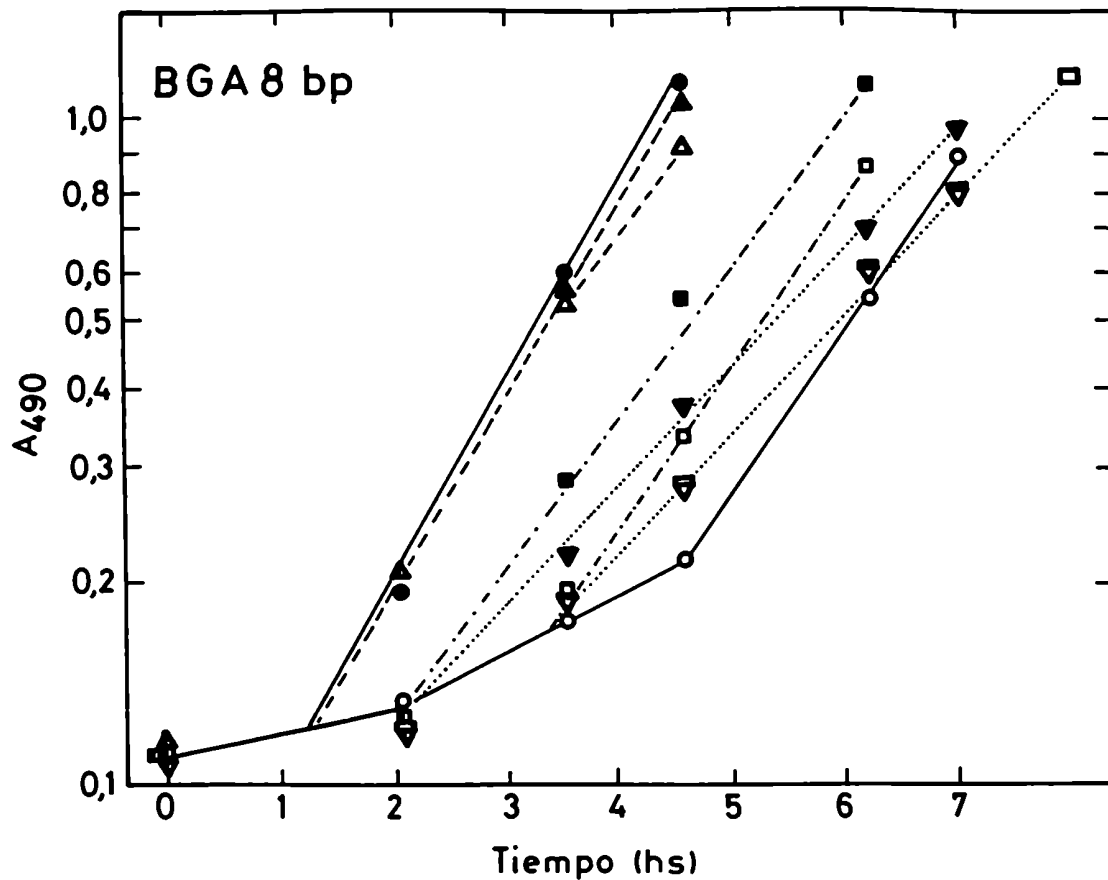


Figura 18: Curvas de crecimiento de E. coli BGA8 bp en diferentes fuentes de carbono

Crecimiento de E. coli BGA8 bp en cultivos en que se empleó glucosa (○, ●), manosa (△, ▲), succinato (▽, ▼) o glicerol (□, ■) como fuentes de carbono, en ausencia (○, △, ▽, □) o presencia (●, ▲, ▼, ■) de putrescina.

Tabla XII: Tiempo de duplicación de E. coli BGA8, BGA8 bp y MRE600 cultivadas en diferentes fuentes de carbono

Tiempo de duplicación (min)

	Glucosa		Manosa		Succinato		Glicerol	
	-P	+P	-P	+P	-P	+P	-P	+P
	BGA8	240	80	200	105	245	110	360
BGA8 bp	85	75	80	60	110	90	120	110
MRE600	55	-	85	-	90	-	115	-

Los valores se obtuvieron en la fase logarítmica media de crecimiento de cultivos sin (-P) y con (+P) putrescina.

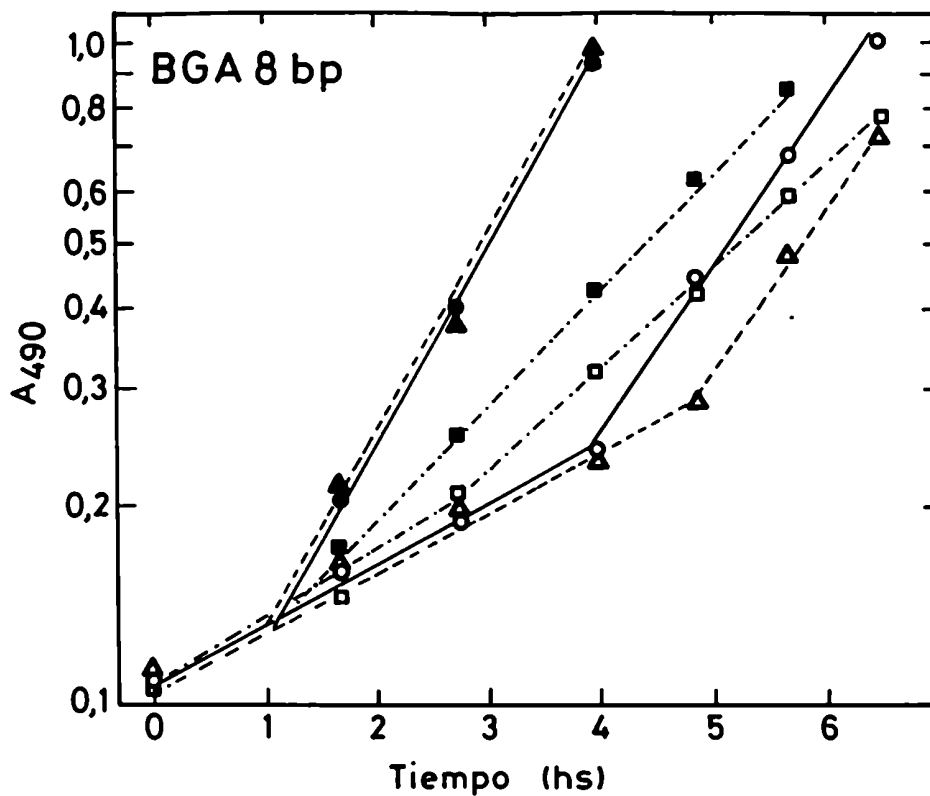


Figura 19: Curvas de crecimiento de E. coli BGA8 bp en distintas condiciones de aereación

Crecimiento de E. coli BGA8 bp en cultivo con alta (▲, ●), media (○, ●) y baja (□, ■) aereación realizadas en ausencia (△, ○, □) o presencia (▲, ●, ■) de putrescina.

Tabla XIII: Tiempo de duplicación de E. coli BGA8, BGA8 bp y MRE600 cultivadas en distintas condiciones de aireación

Tiempo de duplicación (min)

	Aereación intensa		Aereación mediana		Aereación reducida	
	-P	+P	-P	+P	-P	+P
BGA8	230	75	230	75	270	125
BGA8 bp	85	80	90	80	120	120
MRE600	55	-	60	-	120	-

Los valores se obtuvieron en la fase logarítmica media de crecimiento de cultivos sin (-P) y con (+P) putrescina.

BGA8, BGA8 bp y MRE600 en las diversas fuentes de carbono mencionadas. La Figura 18 muestra las correspondientes curvas de crecimiento de la cepa BGA8 bp en ausencia y presencia de putrescina.

Los resultados indicaron que al utilizar manosa como fuente de carbono desaparecía la fase lenta en el crecimiento de la cepa BGA8 bp. Además se mantuvo la diferencia de velocidad de crecimiento de E. coli BGA8 en medios con y sin poliaminas, independientemente de la fuente de carbono utilizada.

2.8.5. Crecimiento de la cepa E. coli BGA8 pb en distintas condiciones de aereación: En estos experimentos se varió la disponibilidad de aire de los cultivos de BGA8 bp. Para obtener un alto grado de aereación se colocaron 5 ml de cultivo en frascos Erlenmeyer de 125 ml y se incubó con agitación (200 revoluciones/min); una aereación mediana correspondía a 5 ml de cultivo en un frasco de 25 ml incubándose también con agitación y para una aereación reducida se incubó 10 ml de cultivo en un frasco del mismo volumen, que se mantuvo en reposo.

La Tabla XIII y la Figura 19 muestran los resultados obtenidos.

Se pudo observar una relación inversa entre el grado de aereación y la duración de la fase de crecimiento lento de la cepa BGA8 bp. Por otro lado, con baja aereación disminuye la velocidad de crecimiento tanto en E. coli BGA8 bp como en la cepa BGA8 cuyo desarrollo en condiciones de escasa disponibilidad de aire se afecta más en presencia de poliaminas que en ausencia de dichas sustancias.

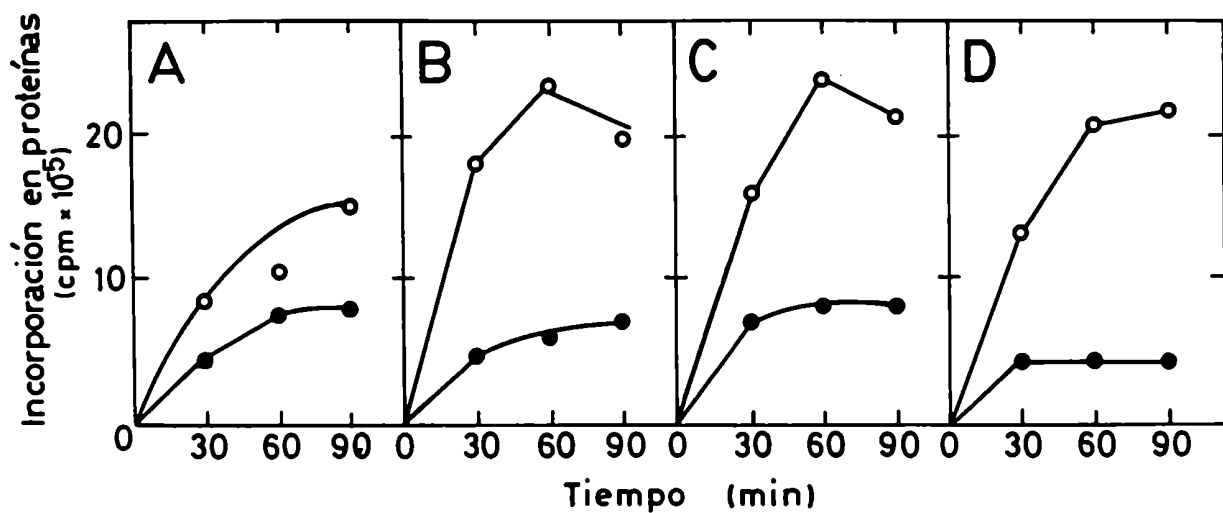


Figura 20: Efecto de la estreptomina sobre la cinética de la síntesis proteica "in vivo"

Las cepas *E. coli* BGA8 (A y B) y BGA8 bp (C y D) se cultivaron en medios sin (A y C) y con (B y D) putrescina. Las bacterias se incubaron con ¹⁴C-fenilalanina en ausencia (○) o presencia de 40 μg/ml de estreptomina (●) y se tomaron muestras a los tiempos indicados. Los valores están normalizados para 1 ml de cultivo con una absorbancia a 490 nm de 1.

2.8.6. Sensibilidad a la estreptomycinina de la cepa E. coli BGA8 bp: Para caracterizar mejor a la cepa BGA8 bp se estudió su sensibilidad al antibiótico aminoglicósido estreptomycinina. Trabajos anteriores habían demostrado que esta droga ejerce su máximo efecto inhibitorio sobre la síntesis proteica cuando la cepa BGA8 se cultiva en presencia de poliaminas.

2.8.6.1. Efecto de la estreptomycinina sobre el crecimiento de la cepa BGA8 bp: El agregado de diferentes cantidades de estreptomycinina a cultivos de la cepa BGA8 bp produjo el cese del crecimiento en ausencia de poliaminas cuando la concentración de estreptomycinina era de 4 $\mu\text{g/ml}$, en cambio, en los cultivos con putrescina aumentó algo la sensibilidad, ya que el desarrollo bacteriano se detuvo a niveles de 1,5 μg del antibiótico por ml.

La cepa BGA8 bp presentó una sensibilidad a la estreptomycinina similar a la de E. coli BGA8 en condiciones de ayuno de poliaminas, pues el crecimiento de estas últimas bacterias se detuvo a 4 o 5 μg de antibiótico por ml de cultivo.

2.8.6.2. Efecto sobre la síntesis "in vivo" de proteínas: La Figura 20 muestra el efecto de la estreptomycinina sobre la cinética de síntesis proteica en las cepas BGA8 y BGA8 bp cultivadas con y sin putrescina. El antibiótico se agregó durante la fase logarítmica media de crecimiento y 15 minutos después se adicionó el aminoácido radioactivo.

Se observó que todas las bacterias que contienen poliaminas (los

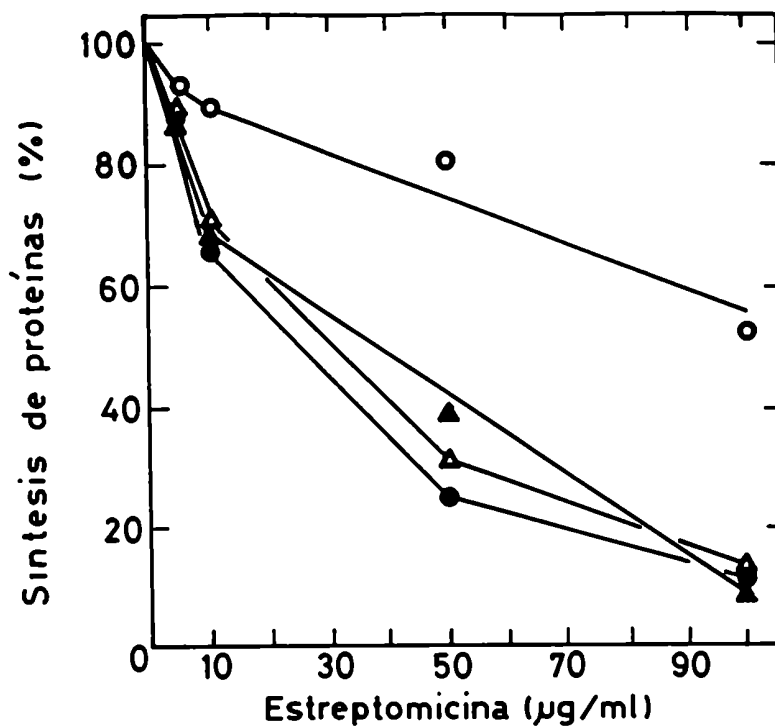


Figura 21: Inhibición de la síntesis proteica "in vivo" en función de la concentración de estreptomicina en E. coli EGA8 (○, ●) y EGA8 bp (▲, △)

Las bacterias se cultivaron en ausencia (○, △) o presencia (●, ▲) de putrescina con distintas cantidades de estreptomicina, y después de agregar ¹⁴C-ferilalanina durante 20 min se midió la radioactividad incorporada a proteínas. Los resultados están expresados en porcentajes de los respectivos valores obtenidos en ausencia de antibiótico.

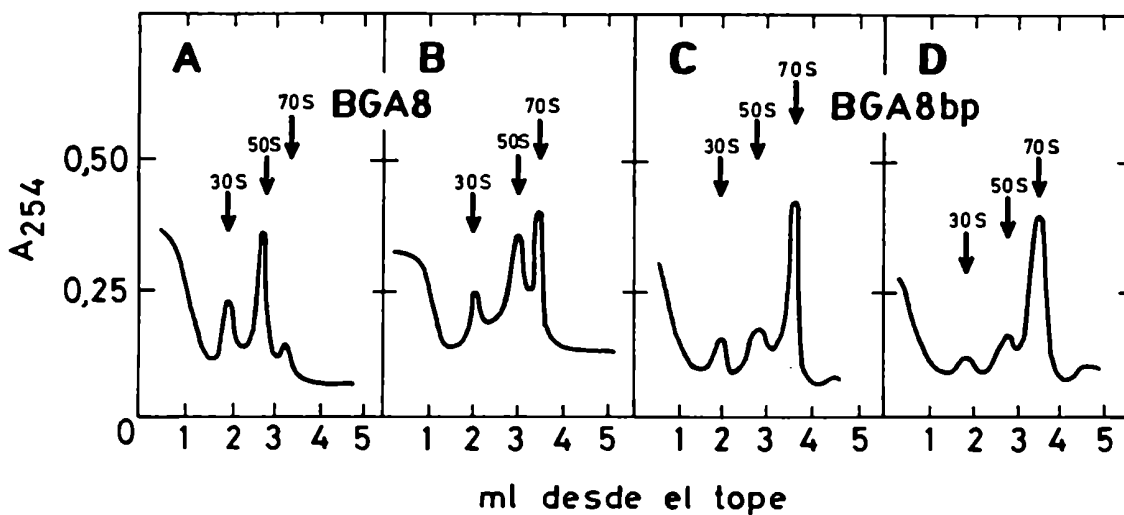


Figura 22: Perfiles ribosomales en gradientes de sacarosa correspondientes a E. coli BGA8 (A y B) y BGA8 bp (C y D)

Los extractos celulares provenientes de bacterias cultivadas sin (A y C) y con poliaminas (B y D) se prepararon y analizaron por centrifugación en gradientes de sacarosa como se detalla en "Materiales y Métodos". Se indican las posiciones de las partículas 30S, 50S y 70S en los gradientes.

cultivos de la cepa BGA8 bp y el de BGA8 realizado en presencia de putrescina) fueron más sensibles al efecto del antibiótico que los cultivos de E. coli BGA8 sometidos a un ayuno en poliaminas.

Por lo tanto la síntesis de proteínas de la cepa BGA8 bp muestra una sensibilidad a estreptomycinina característica de las bacterias con una concentración endógena normal de putrescina.

La Figura 21 muestra la inhibición de la síntesis de proteínas en función de la concentración de antibiótico. En el caso de las bacterias BGA8 hay un efecto máximo de la estreptomycinina en presencia de poliaminas; en cambio con la cepa BGA8 bp el antibiótico ejerce inhibición máxima con o sin agregado de poliaminas al medio, como se debería esperar por el hecho de que estas bacterias tienen niveles endógenos normales de los poliaminas.

Las diferencias en el grado de inhibición producido por la estreptomycinina en las condiciones estudiadas no se pueden atribuir a captaciones diferentes del antibiótico, ya que la entrada de la droga a la bacteria fue similar en cultivos con y sin poliaminas.

2.8.7. Análisis de distribución ribosomal en la cepa BGA8 bp

El estudio de los perfiles ribosomales después de centrifugar los extractos bacterianos en gradientes de sacarosa indicó que en E. coli BGA8 bp el equilibrio entre subunidades y partículas 70S se encuentra desplazado hacia los monómeros 70S como ocurre en la cepa BGA8 cultivada en presencia de poliaminas (Fig. 22).

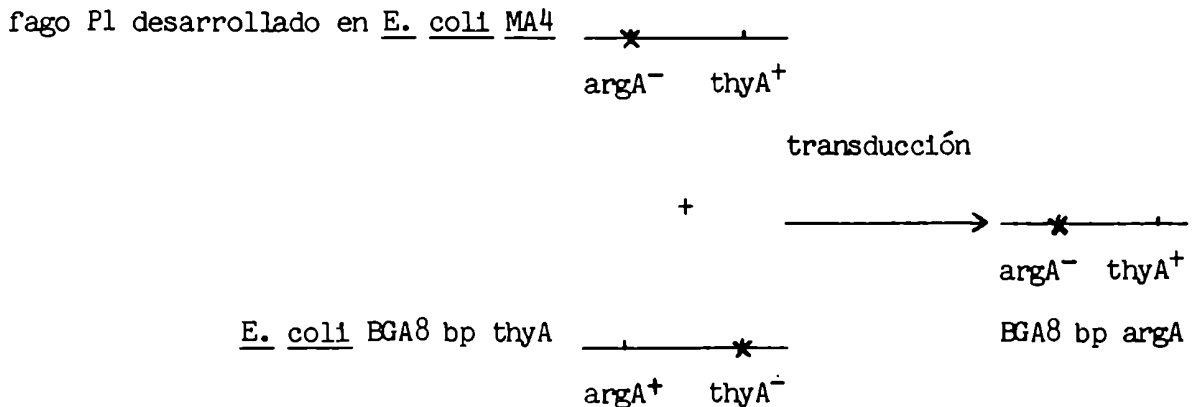
2.9. Obtención de una mutante auxotrófa para arginina a partir de la cepa EGA8 bp

Con el propósito de investigar si el posible camino alternativo de biosíntesis de putrescina en la cepa EGA8 bp involucra a la enzima acetilglutámico sintetasa se intentó eliminar dicha actividad mediante una mutación. El procedimiento seguido fue el siguiente: en un primer paso se transformó la cepa EGA8 bp en auxótrofa que requiere timina (thyA). Este marcador está ubicado en el minuto 61 del mapa genético de E. coli, muy cerca del gen argA correspondiente a la N-acetilglutámico sintetasa. Por otro lado, se preparó un lisado de E. coli MA4 que es una mutante (argA) deficiente en la enzima N-acetilglutámico sintetasa, por infección con bacteriofagos P1 virulentos que se dejaron desarrollar en dicha cepa.

Al infectar E. coli EGA8 bp thyA con el lisado anterior se obtuvieron por transducción algunas colonias que eran EGA8 bp argA.

Probablemente el evento genético ocurrido sea el esquematizado en la Figura 23.

Figura 23



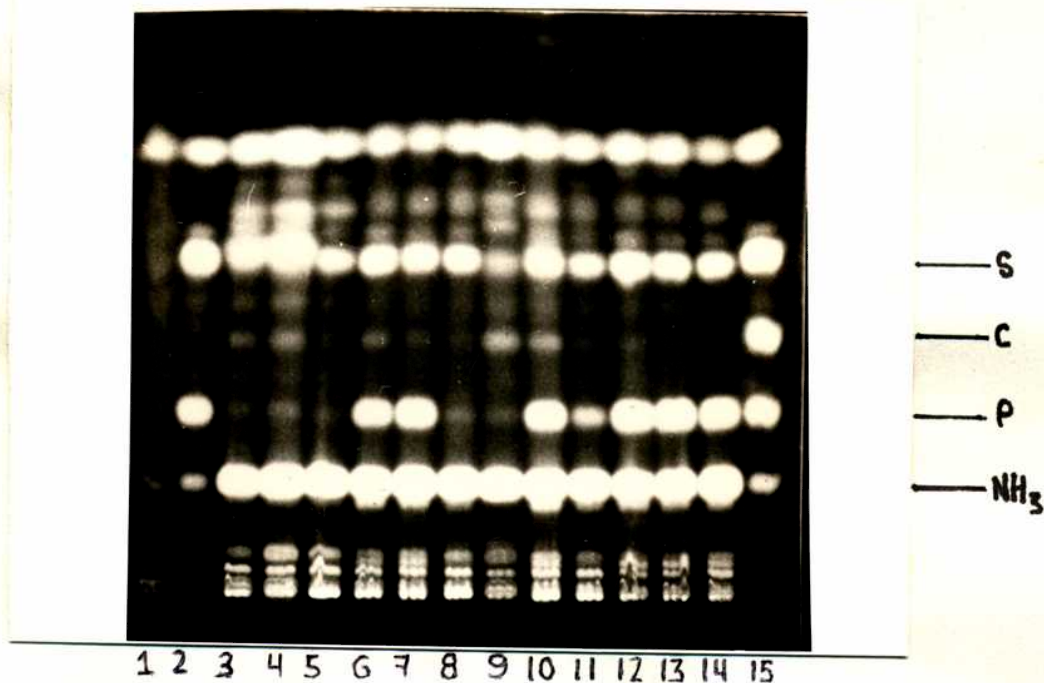


Figura 24: Contenido endógeno de poliaminas de E. coli BGA8 (calles 3 a 5), BGA8 bp (calles 6 a 8), BGA8 bp argA-1 (calles 9 a 11) y MRE600 (calles 12 a 14)

Cromatografía en capa delgada de los extractos dansilados obtenidos de bacterias cultivadas sin ningún agregado (calles 3, 6, 9 y 12), con ornitina (calles 4, 7, 10 y 13) y con arginina (calles 5, 8, 11 y 14). Se analizaron también un "blanco" de reactivos (calle 1) y los "standards" de poliaminas puras (calles 2 y 15). Se usó cloroformo:triethylamina (10:1), como solvente de desarrollo y se indican las posiciones de los "standards" de putrescina (P), cadaverina (C) y espermidina (S).

Se aisló una de estas colonias, que se denominó BGA8 bp arg A-1 y se estudió su capacidad de desarrollo en distintos medios.

2.9.1. Características de la cepa BGA8 bp argA-1

Esta mutante tiene requerimiento de arginina y sólo puede desarrollarse en medios mínimos que contienen por lo menos 10 ug/ml de este aminoácido. En estas condiciones crece a la misma velocidad en medios con y sin poliaminas.

2.9.2. Contenido endógeno de poliaminas

La Figura 24 muestra una cromatografía en capa delgada de los extractos ácidos dansilados provenientes de las cepas BGA8 cultivada sin putrescina, BGA8 bp, BGA8 bp argA-1 y MRE600 (cepa salvaje).

Los resultados indicaron que la cepa BGA8 bp argA-1 no contiene poliaminas pese a que se multiplica rápidamente. Como se mencionó anteriormente requiere arginina, a diferencia de lo que ocurre con las cepas BGA8, BGA8 bp y MRE600. Es interesante señalar que el agregado de arginina a E. coli BGA8 bp también produce la desaparición de la putrescina endógena sin alterar su velocidad de crecimiento normal. En cambio si las cepas BGA8 bp y BGA8 bp argA-1 son cultivadas en presencia de ornitina, se recupera el contenido de putrescina. Este resultado se podría explicar si la arginina reprime la síntesis de putrescina en la cepa BGA8 bp y la ornitina no tuviera ese efecto. Otros resultados apoyan la idea de que la arginina reprime la

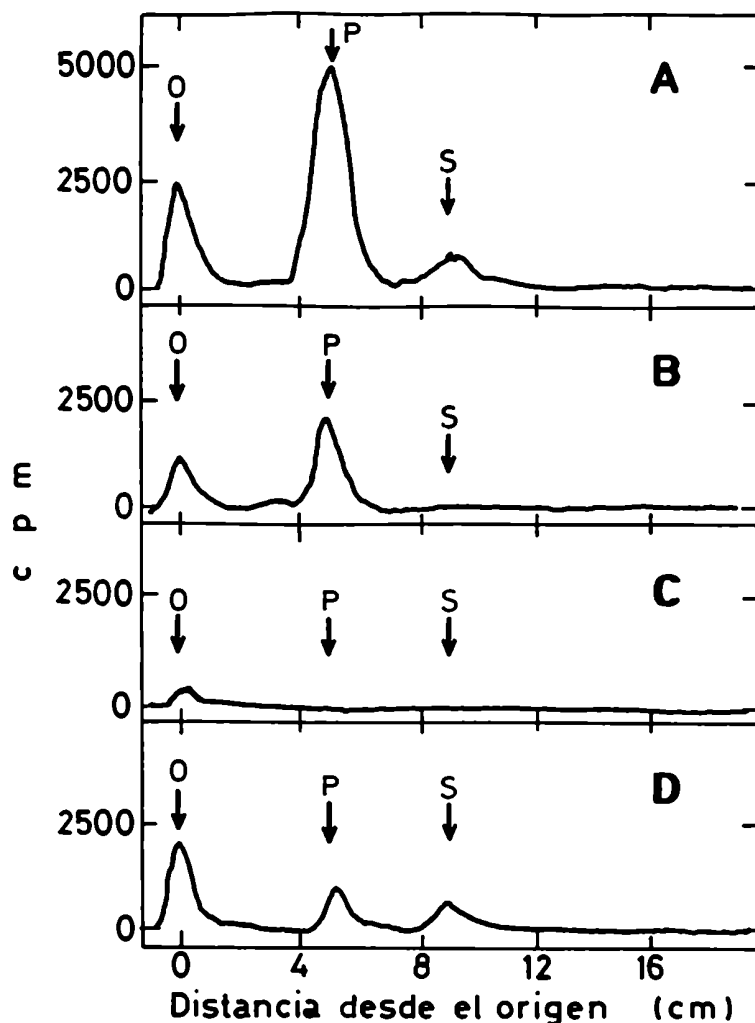


Figura 25: TLC de los extractos dansilados obtenidos de bacterias *E. coli* BGA8 bp (A y B) y BGA8 bp argA-1 (C y D) incubadas con ^{14}C -ácido glutámico

Los cultivos se efectuaron en medio mínimo sin ningún agregado (A), con ornitina (B y D) o con arginina (C). Luego de incubar con ^{14}C ácido glutámico durante 2 hs, los extractos celulares se trataron con ^{14}C -ácido glutámico y analizaron por TLC como se describe en "Materiales y Métodos" empleando cloroformo:triethylamina (10:1) como solvente de desarrollo. Se muestra la distribución de la radioactividad en los cromatogramas y las posiciones correspondientes al origen de siembra (O), putrescina (P) y espermidina (S).

Tabla XIV: Conversión de ^{14}C -ácido glutámico en poliaminas en *E. coli* BGA8 bp y BGA8 bp argA-1

Bacteria	Medio de cultivo	Putrescina		Espermidina	
		cpm/A490.ml	%	cpm/A490.ml	%
<i>E. coli</i> BGA8 bp	MM	4476	100	973	100
	MMO	1685	35	326	33
<i>E. coli</i> BGA8 bp argA-1	MMA	8	0,1	0	0
	MMO	294	6,1	240	25

Cultivos de *E. coli* BGA8 bp y BGA8 bp argA-1 en el medio mínimo correspondiente a cada cepa, con o sin 100 ug/ml de ornitina, se incubaron con ^{14}C -ácido glutámico durante 2 hs. La radioactividad en las dansil poliaminas obtenidas se determinó como se describe en "Materiales y Métodos". Los valores están normalizados para 1 ml de cultivo con una absorbancia de 1 a 490 nm.

síntesis de putrescina en BGA8 bp; por ejemplo cuando se agregó un exceso de arginina a cultivos de esta cepa incubados con ^{14}C -glutámico, desapareció la putrescina radioactiva, tal como ocurrió con la cepa salvaje MRE600. En este último caso la síntesis neta de putrescina ocurrió a partir de arginina, vía metabólica que se encuentra bloqueada en la cepa BGA8 bp.

Posteriormente se pudo establecer que cuando la cepa BGA8 bp argA-1 se cultiva con citrulina también desaparece la putrescina intracelular.

2.9.3. Enzimas biosintéticas de poliaminas en la cepa BGA8 bp argA-1

No se pudieron detectar las actividades de ornitina decarboxilasa y agmatinasa en la cepa BGA8 bp argA-1. Los niveles residuales de estas enzimas son aún más bajas en esta cepa que en E. coli BGA8 bp de la cual proviene.

2.9.4. Conversión de ácido glutámico en putrescina en la cepa BGA8 bp argA-1

Cultivos en medio mínimo con y sin ornitina de cada una de las cepas BGA8 bp argA-1 y BGA8 bp, se incubaron durante 2 horas con ^{14}C -glutámico (uniformemente marcado). Los extractos ácidos bacterianos se analizaron como se describió anteriormente. La Figura 25 muestra los radiocromatogramas resultantes y en la Tabla XIV se dan los valores de radioactividad normalizados para igual número de células.

Se puede observar que la cepa BGA8 bp argA-1 no sintetizó putrescina cuando fue cultivada en presencia de arginina y en cambio se detectó cierta cantidad de putrescina radioactiva al reemplazar la arginina por ornitina,

aunque dicha cantidad era reducida si se la compara con la que contiene la cepa BGA⁸ bp. En este experimento no fue posible dilucidar si la putrescina se formaba por un camino biosintético que no involucra a la enzima N-acetilglutámico sintetasa o si la mutación de dicha enzima no era completa permitiendo la síntesis de la poliamina.

Tabla XV: Tiempos de duplicación de E. coli BGA8 cultivadas en presencia de diferentes aminoácidos

Medio de cultivo	Tiempo de duplicación (min)
MM	240
MMP	.75
MMA	90
MMCit	90
MMASA	100
MMO	270

Tiempos de duplicación en la fase logarítmica media de E. coli BGA8 cultivada en medio mínimo (MM), con el agregado de arginina (MMA), citrulina (MMCit), ácido argininosuccínico (MMASA), ornitina (MMO) o putrescina (MMP) a concentraciones finales de 100 ug/ml de cada compuesto.

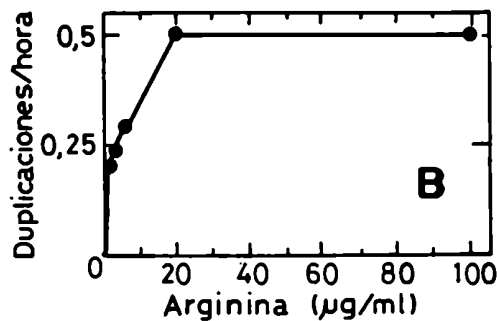
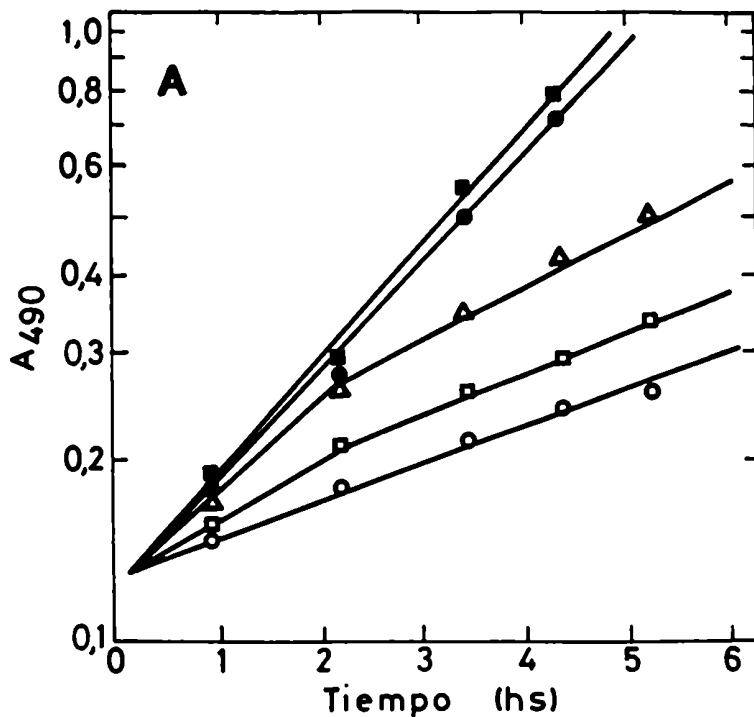


Figura 26: Crecimiento de E. coli BGA8 en función de la concentración de arginina

(A) Crecimiento de E. coli BGA8 en cultivos con diferentes concentraciones de arginina (○, ●; □, I; △, 5; ■, 20 y ●, 100 µg/ml). Las velocidades de crecimiento calculadas a partir de las distintas curvas se representan (en duplicaciones/hora) en función de la concentración de arginina en el medio de cultivo.

Tabla XVI: Contenido endógeno de poliaminas en E. coli BGA8

Medio de cultivo	Putrescina (nmol/A490.ml)	Espermidina
MM	0,38	0,55
MMP	11,0	1,98
MMA	0,41	0,42

E. coli BGA8 se cultivó en medio mínimo con 100 ug/ml de arginina (MMA) y el contenido endógeno de poliaminas se determinó como se describe en la Tabla III y en "Materiales y Métodos".

Se utilizaron como controles cultivos sin (MM) o con (MMP) putrescina.

3. Crecimiento de E. coli BGA8 en presencia de diferentes aminoácidos

La Tabla XV muestra las velocidades de crecimiento de E. coli BGA8 en medio mínimo al cual se agregó diferentes aminoácidos que forman parte del camino metabólico de síntesis de arginina.

Sorprendentemente se observó que la arginina y la citrulina estimulan el crecimiento, aunque de manera menos pronunciada que la producida por la putrescina. Otra cepa auxótrofa para poliaminas, E. coli MA255, mostró una estimulación similar del crecimiento.

Un análisis de la arginina utilizada en estos experimentos demostró que no contenía niveles detectables de putrescina.

La Figura 26 indica la velocidad de crecimiento de la cepa BGA8 en función de la concentración de arginina agregada al medio de cultivo. Se llega a un máximo de velocidad de crecimiento (tiempo de generación de 90 min) con niveles de 20 ug de aminoácido por ml de cultivo.

3.1. Contenido endógeno de poliaminas de la cepa BGA8 cultivada en presencia de arginina

Teniendo en cuenta el resultado anterior se decidió investigar si el nivel endógeno de poliaminas de la cepa BGA8 cultivada en presencia de arginina permitía explicar su velocidad de crecimiento.

El dosaje de poliaminas se realizó mediante la técnica de dansilación de extractos bacterianos descrita en "Materiales y Métodos".

Los valores de la Tabla XVI indican que el contenido de putrescina de la

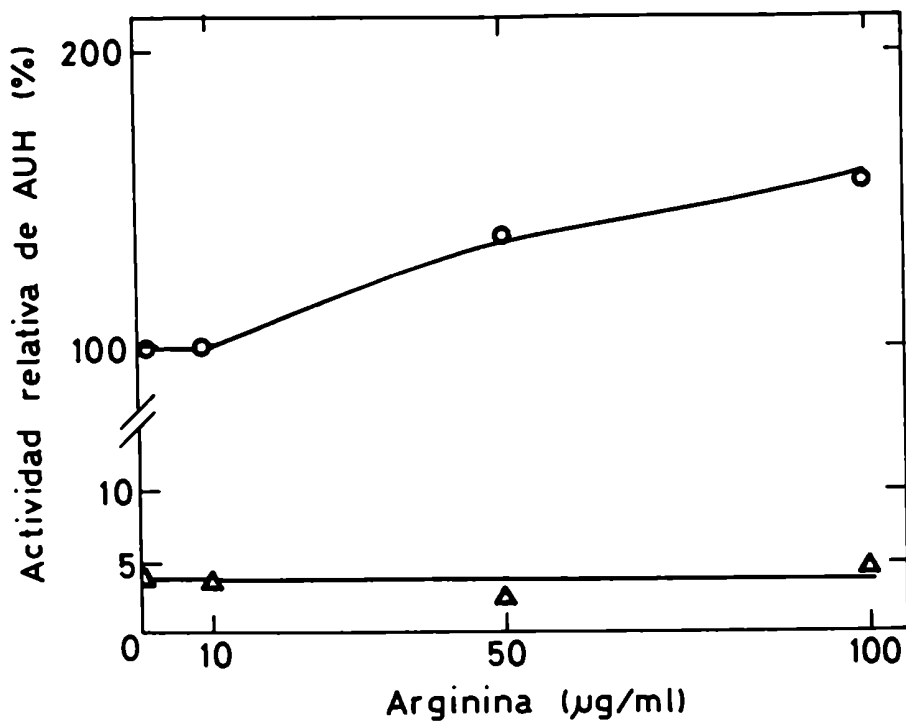


Figura 27: Actividad de agmatinasa en extractos celulares de *E. coli*, MRE 600 (○) y EGA8 (△) en función de la concentración de arginina

Los valores de actividad de agmatinasa en extractos celulares de *E. coli* MRE600 y EGA8 cultivados sin poliaminas se expresaron como porcentaje de la actividad enzimática en el extracto de *E. coli* MRE600 cultivada en ausencia de arginina.

cepa E. coli BGA8 cultivada con arginina no puede explicar su velocidad de crecimiento, ya que dicho nivel es similar al de la bacteria no suplementada (medio MM).

3.2. Medición de las enzimas arginina decarboxilasa (ADc) y agmatinasa (AUH)

Para confirmar el resultado anterior se determinaron las actividades de las enzimas del camino biosintético de putrescina a partir de arginina. Como ya se sabía, la cepa BGA8 tiene niveles normales de ADc y sólo actividad residual de agmatinasa (ver Tabla IV).

Dado que ambas enzimas fueron medidas en extractos de bacterias cultivadas en medio mínimo, también se dosó la actividad de agmatinasa en bacterias cultivadas con diferentes cantidades de arginina. En la Figura 27 se observa que la cepa BGA8 contiene muy baja actividad de agmatinasa a todas las concentraciones estudiadas de arginina. Por su parte E. coli MRE600 muestra una leve inducción de agmatinasa a 100 ug de arginina por ml de medio de cultivo.

No se pudo realizar un experimento similar empleando agmatina, dado que la preparación comercial de esta sustancia está contaminada con putrescina.

En otro experimento se determinó la actividad de agmatinasa de los extractos bacterianos agregando cantidades crecientes de agmatina a la mezcla de reacción. En ninguna de estas condiciones se pudo observar cantidades significativas de actividad de agmatinasa en los extractos de E. coli BGA8.

Los resultados descriptos indican que no se pudo detectar actividad de

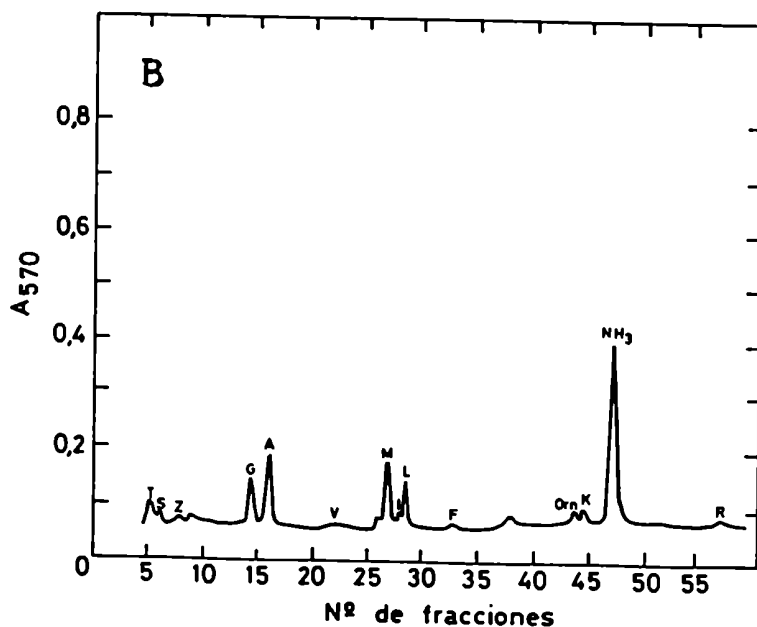
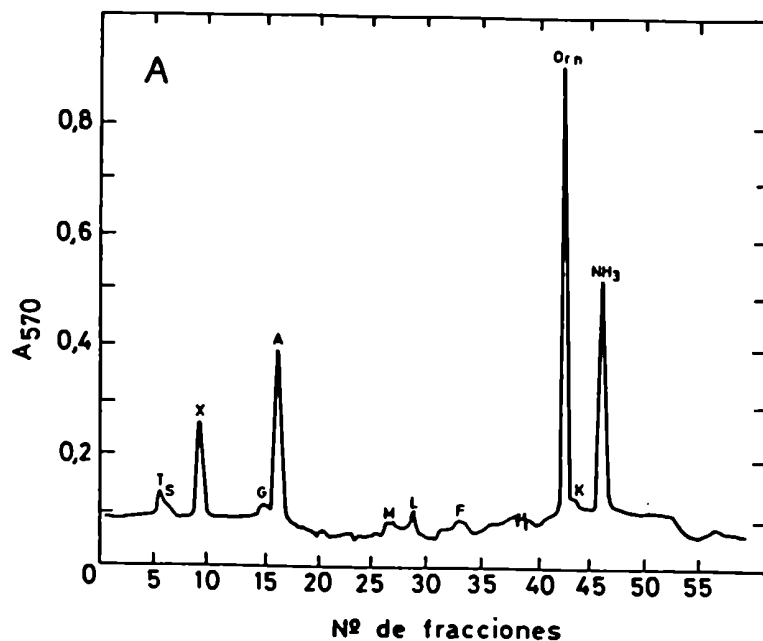


Figura 28: Análisis del contenido endógeno de aminoácidos en *E. coli* BGA8

Los extractos perclóricos de bacterias *E. coli* BGA8 cultivadas sin (A) y con (B) putrescina se neutralizaron con KOH y se midió el contenido de aminoácidos mediante un analizador automático que los separa por cromatografía en columnas de intercambio iónico y los dosa por coloración con ninhidrina.

Tabla XVII: Contenido endógeno de aminoácidos básicos en E. coli BGA8

aminoácido	(nmol/A490.ml)	
	-P	+P
lisina	0,18	0,32
arginina	nd	0,30
ornitina	15,6	0,35
histidina	nd	nd

Los valores se calcularon a partir de los picos de la Figura 28 y están normalizados para 1 ml de cultivo con una absorbancia de 1 a 490 nm.

agmatinasa en la cepa BGA8 en ninguna de las condiciones estudiadas.

3.3. Contenido endógeno de aminoácidos básicos

El dosaje de aminoácidos básicos en extractos ácidos bacterianos mediante la utilización de un analizador automático de aminoácidos permitió comprobar que el nivel endógeno de ornitina en la cepa BGA8 cultivada en medio mínimo es 50 veces mayor que el correspondiente a la bacteria cultivada en el mismo medio con agregado de putrescina (Fig. 28 y Tabla XVII). Cuando E. coli BGA8 se cultiva en presencia de arginina aparecen niveles reducidos de ornitina. La cepa salvaje MRE600 tiene bajas concentraciones intracelulares de este aminoácido.

Los datos mencionados indican que la bacteria E. coli BGA8 cultivada sin putrescina contiene una cantidad excepcionalmente alta de ornitina. Este resultado se pudo confirmar analizando los aminoácidos básicos por electroforesis en papel, como se detalla en "Materiales y Métodos". Esta técnica se empleó en los estudios posteriores para investigar el efecto de diversos compuestos sobre el contenido endógeno de ornitina de la cepa BGA8.

Para conocer si el alto nivel de ornitina se debía a la falta de poliaminas o a un efecto secundario producido por el crecimiento lento de la bacteria sometida al ayuno de poliaminas, se cultivó E. coli BGA8 en un medio con putrescina, pero utilizando acetato en lugar de glucosa como fuente de carbono. En estas condiciones la cepa BGA8 crece lentamente pese a que el medio contiene poliaminas y se observó que el nivel intracelular de ornitina

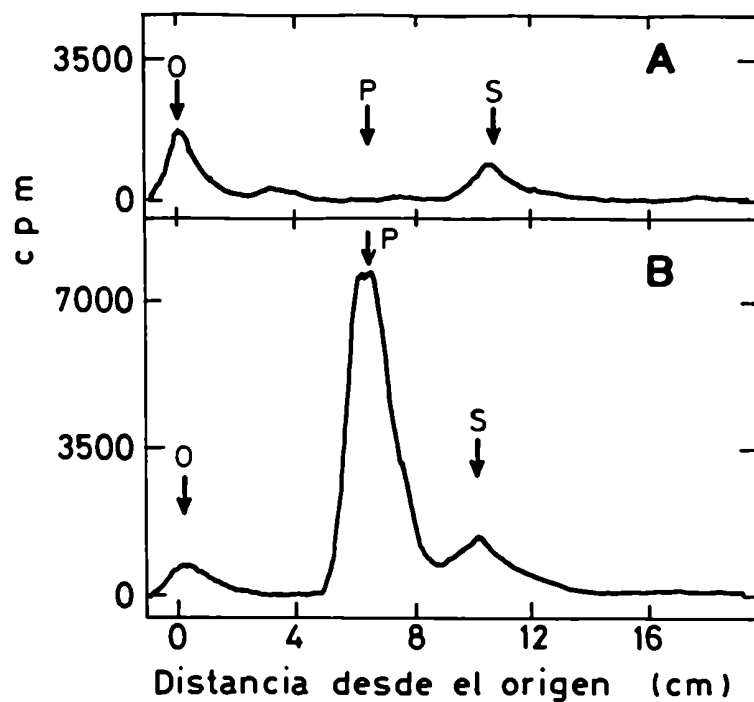


Figura 29: TLC de los extractos dansilados obtenidos de bacterias *E. coli* EGA8 (A) y MRE600 (B) incubadas con ^{14}C -arginina

Los cultivos se efectuaron en medios sin poliaminas y con 40 ug/ml de arginina. Luego de agregar ^{14}C -arginina durante 1 h, los extractos celulares se trataron y analizaron por TLC como se describe en "Materiales y Métodos".

Tabla XVIII: Conversión de ^{14}C -arginina en poliaminas en E. coli BGA8 y MRE600 cultivadas en presencia de altas concentraciones de arginina

Bacteria	Putrescina		Espermidina	
	cpm/A490.ml	%	cpm/A490.ml	%
E. coli MRE600	8292	100	765	100
E. coli BGA8	25	0,3	217	28

Cultivos de E. coli BGA8 y MRE600 en medios con 40 ug/ml de arginina se incubaron con ^{14}C -arginina durante 4 hs. Posteriormente los extractos perclóricos obtenidos se dansilaron, analizaron por TLC y la radioactividad en putrescina y espermidina se determinó como se describe en "Materiales y Métodos". Los valores están normalizados para 1 ml de cultivo con una absorbancia de 1 a 490 nm.

era nuevamente reducido.

De esta manera se pudo concluir que la concentración muy alta de ornitina en E. coli BGA8 cultivada sin poliaminas se debe específicamente a la falta de estas sustancias. La acumulación de ornitina no sucede en presencia de putrescina, espermidina o arginina.

3.4. Conversión de arginina en putrescina

Para investigar la formación de putrescina a partir de arginina se agregó este aminoácido radioactivo a cultivos de E. coli BGA8 sin poliaminas y de E. coli MRE600. Ambas cepas fueron cultivadas por 4 horas en un medio con 40 ug/ml de arginina, se recogieron las células y posteriormente se dansilaron los extractos ácidos. Las dansil poliaminas resultantes se separaron por T.L.C. La Figura 29 muestra el radiocromatograma obtenido y en la Tabla XVIII se dan los resultados normalizados para un número igual de células.

Se pudo comprobar que mientras en la cepa salvaje hay transformación de arginina en putrescina esto no ocurre en BGA8; en cambio no se obtuvo un resultado tan claro en el caso de la espermidina. La radioactividad en el origen del cromatograma puede atribuirse a agmatina que se acumula en E. coli BGA8 por la ausencia de agmatinasa. Los resultados fueron similares cuando las bacterias se cultivaron en un medio sin arginina.

Tabla XIX: Actividad específica de ornitina transcarbamilasa en E. coli BGA8

Medio de cultivo	Ornitina transcarbamilasa (OTC) (unidades/mg proteína)
MM	3,40
MMP	2,07
MMA	0,32

E. coli BGA8 se cultivó en medio mínimo (MM), con 100 ug/ml de putrescina (MMP) o con 100 ug/ml de arginina (MMA); se prepararon extractos celulares y se midió la actividad de ornitina transcarbamilasa como se describe en "Materiales y Métodos".

Tabla XX: Contenido endógeno de carbamil fosfato en E. coli BGA8

Medio de cultivo	Carbamil fosfato (pico moles/A490.ml)
MM	230
MMP	130

E. coli BGA8 se cultivó en medio mínimo (MM) y en medio mínimo con 100 ug/ml de putrescina; se prepararon los extractos celulares y se determinó el contenido endógeno de carbamil fosfato como se describe en "Materiales y Métodos". Los valores están normalizados para 1 ml de cultivo con una absorbancia de 1 a 490 nm.

3.5. Medición de ornitina transcarbamilasa (OTC)

El alto contenido en ornitina de la bacteria BGA8 cultivada sin poliaminas puede deberse a una deficiencia en la conversión de ornitina en citrulina o a un aumento considerable de la formación de ornitina. Para investigar estas posibilidades se midió la actividad de la enzima OTC en los extractos bacterianos usando el procedimiento descrito en Materiales y Métodos. Los resultados se dan en la Tabla XIX.

Se observa que -contrariamente a lo esperado- la actividad OTC es mayor en la bacteria cultivada sin poliaminas. Dicha diferencia se mantuvo a pH 7,0 pese a que ambas actividades disminuyeron diez veces. Los dosajes realizados correspondían a una auténtica actividad OTC, pues se aisló uno de los productos (citrulina) por electroforesis en papel. En este caso la arginina también reprime la actividad OTC como ocurre con todas las enzimas del camino de biosíntesis de arginina (143).

3.6. Contenido endógeno de carbamil fosfato

Como una manera de dilucidar la aparente paradoja entre la acumulación de ornitina (que es sustrato de la enzima OTC) en la cepa BGA8 cultivada sin poliaminas y la actividad relativamente alta de esta enzima medida "in vitro", se estudió la concentración intracelular del otro sustrato, carbamil fosfato que podría estar marcadamente disminuido.

Para medir el contenido endógeno de carbamil fosfato se usó la enzima

Tabla XXI: Conversión de ^{14}C -ornitina en arginina en *E. coli* BGA8

Aminoácido	Insoluble en PCA		Soluble en PCA	
	cpm/A490.ml		cpm/A490.ml	
	-P	+P	-P	+P
arginina	5059	120809	6545	6204

Cultivos de *E. coli* BGA8 en medios con y sin putrescina se incubaron durante 1 h con ^{14}C -ornitina. Luego se trataron las bacterias con PCA y se obtuvo una fracción soluble y otra insoluble. Esta última fracción se sometió a hidrólisis en ClH 10 N a 111°C durante 16 hs y el hidrolizado fue neutralizado por evaporación. Los compuestos radioactivos presentes en ambas fracciones se analizaron por electroforesis en papel como se describe en "Materiales y Métodos". Los valores están normalizados para 1 ml de cultivo a una absorbancia de 1 a 490 nm.

carbarnato quinasa como se describe en Materiales y Métodos. La Tabla XX muestra el resultado obtenido.

La concentración endógena de carbamil fosfato en bacterias cultivadas sin poliaminas resultó ser mayor que la correspondiente a bacterias suplementadas con putrescina. Teniendo en cuenta estos resultados no se puede explicar la acumulación de ornitina en condiciones de ayuno de poliaminas por la falta de ningún sustrato de la enzima ornitina carbamil transferasa.

3.7. Conversión de ornitina en arginina en bacterias con y sin poliaminas

En este experimento se estudió la conversión de ornitina en arginina mediante el agregado de ^{14}C -ornitina a cultivos de E. coli BGA8 realizados en ausencia y presencia de poliaminas. Se utilizaron extractos ácidos de ambos tipos de bacterias para separar los distintos aminoácidos básicos mediante electroforesis en papel. En la Tabla XXI se presentan los resultados obtenidos normalizados para un número constante de células.

En ambos casos la radioactividad en arginina soluble es muy baja, pero si se considera la radioactividad en arginina total (soluble e incorporada a proteínas) se comprueba que es del orden de 10 veces menor en las bacterias cultivadas sin putrescina. Este resultado se puede explicar por una fuerte dilución isotópica de la ornitina radioactiva por el "pool" endógeno muy aumentado de este aminoácido en las bacterias sin poliaminas (ver Tabla XVII).

Cuando se realizó un experimento similar pero usando ^{14}C -citrulina, la

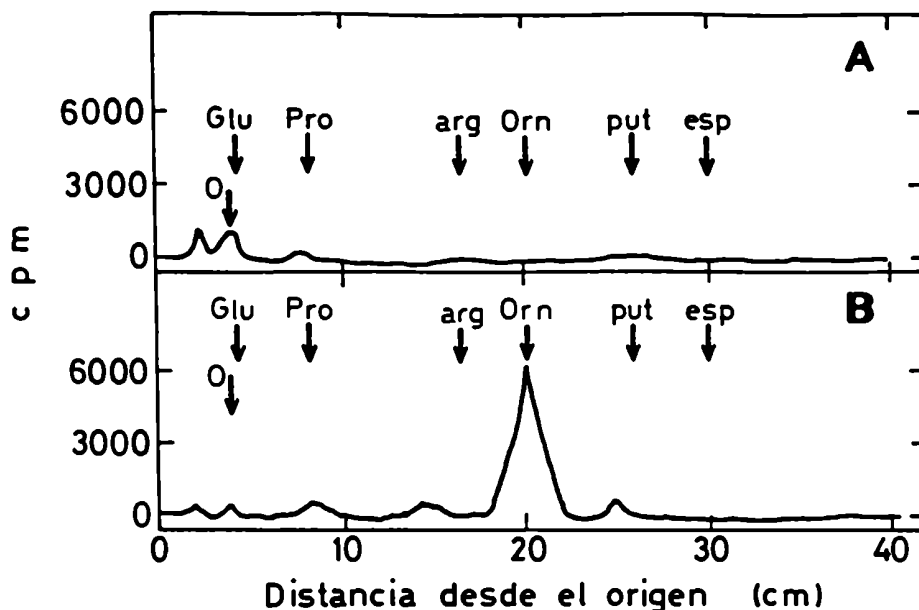


Figura 30: Electroforesis en papel de extractos obtenidos de bacterias *E. coli* BGA8 incubadas con ^{14}C -ácido glutámico

Cultivos con (A) y sin (B) poliaminas de *E. coli* BGA8 se incubaron ^{14}C -ácido glutámico durante 1 h; luego se prepararon extractos perclóricos que se neutralizaron y sometieron a electroforesis en papel Whatman 3 MM con ácido sulfosalicílico 50 mM pH 3,2 durante 3 hs a 600 V. Los picos radioactivos se localizaron empleando un radiocromatógrafo. Se muestra la distribución de radioactividad en los cromatogramas y las posiciones del origen de siembra (O), ácido glutámico (glu), prolina (pro), arginina (arg), ornitina (orn), putrescina (put) y espermidina (esp).

Tabla XXII: Conversión de ^{14}C -ácido glutámico en ornitina en *E. coli* BGA8

Tiempo de incubación (min)	Ornitina (cpm/A490.ml)	
	-P	+P
10	11030	282
30	15230	783
60	12569	839

Cultivos de *E. coli* BGA8 con y sin putrescina se incubaron con ^{14}C -ácido glutámico y se tomaron muestras a los tiempos indicados. Los picos radioactivos de ornitina correspondientes a los cromatogramas en capa delgada (TLC) (Fig. 30) se detectaron y eluyeron midiendo su radioactividad como se describe en "Materiales y Métodos". Los valores están normalizados para 1 ml de cultivo con una absorbancia de 1 a 490 nm.

radioactividad en arginina de proteínas es solo tres veces mayor en bacterias cultivadas con poliaminas.

La diferencia observada con citrulina radioactiva en los precipitados ácidos correspondientes a ambos tipos de cultivos puede explicarse por la mayor síntesis proteica que ocurre en E. coli BGA8 suplementada con putrescina (101).

3.8. Síntesis de ornitina a partir de ácido glutámico

Como ya se ha mencionado, la síntesis aumentada de ornitina en las bacterias sin poliaminas podría explicar los datos obtenidos. Para estudiar la síntesis de ornitina se incubaron cultivos de E. coli BGA8 con ^{14}C -ácido glutámico en medios con y sin poliaminas. Los diferentes compuestos marcados se separaron mediante electroforesis en papel. Los resultados normalizados para igual número de células se dan en la Tabla XXII y la Figura 30 muestra uno de los radiocromatogramas obtenidos.

La radioactividad encontrada en ornitina fue 20 veces mayor en las bacterias cultivadas sin poliaminas. Este resultado indica una síntesis aumentada de ornitina en las bacterias carentes de poliaminas. En el precipitado de proteínas se encontró, en cambio, una radioactividad 2 veces superior en las bacterias que se cultivaron en presencia de poliaminas. En otro experimento en que se bloqueó la síntesis de proteínas con cloramfenicol también se detectó una síntesis muy aumentada de ornitina en las bacterias sometidas al ayuno de poliaminas.

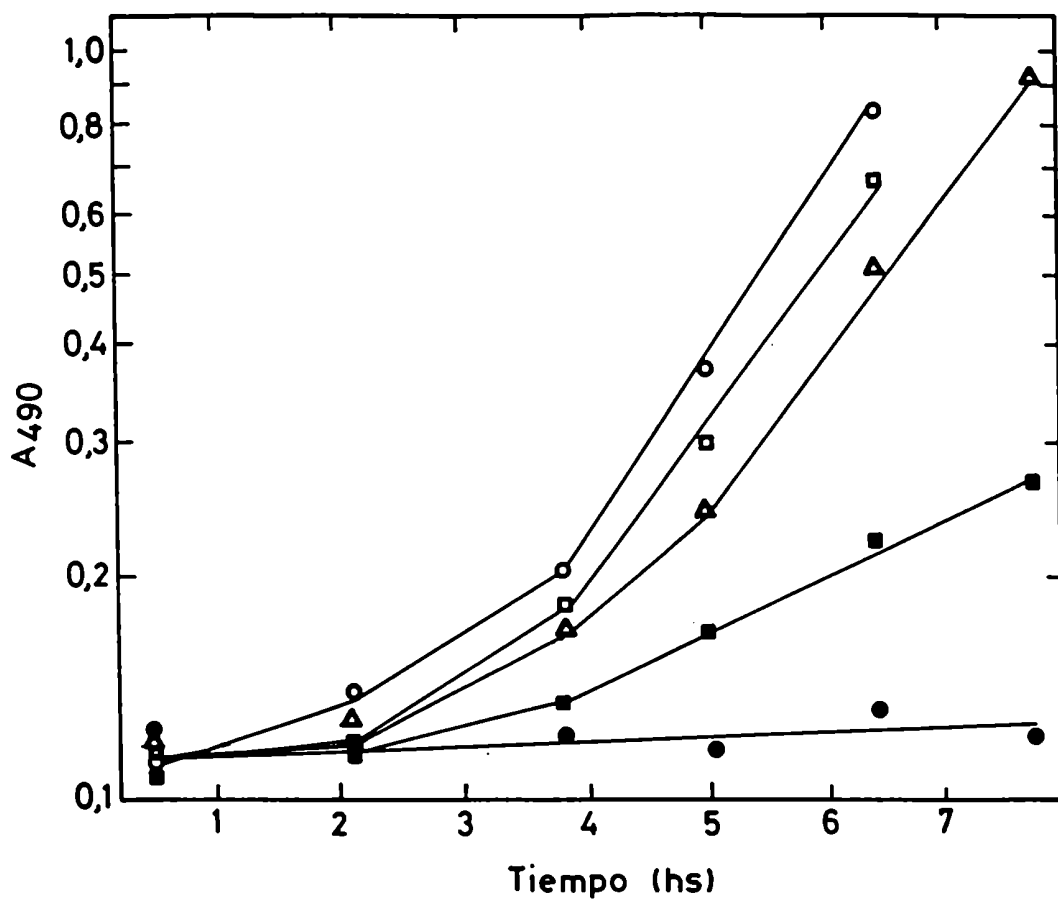


Figura 31: Crecimiento de la cepa E. coli BGA8 en función de la concentración de ornitina en el medio de cultivo

E. coli BGA8 se cultivó en presencia de putrescina y diferentes concentraciones de ornitina (○, 0; □, 0,2; △, 1,0; ■, 3,0 y ●, 5,0 mg/ml).

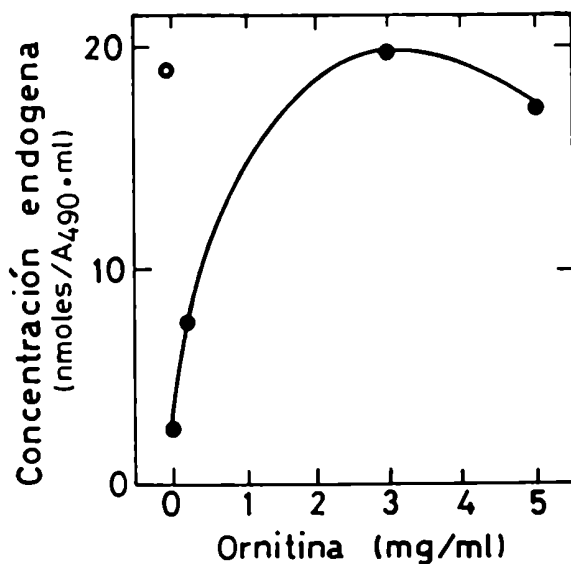


Figura 32: Contenido endógeno de ornitina en E. coli BGA8 cultivada con distintas concentraciones de ornitina exógena

Se prepararon extractos perclóricos de E. coli BGA8 cultivada con diferentes cantidades de ornitina mediante electroforesis en papel como se describe en "Materiales y Métodos". También se dosó el contenido endógeno de ornitina en E. coli BGA8 cultivada en ausencia de putrescina y ornitina (○). Los valores están normalizados para 1 ml de cultivo con una absorbancia de 1 a 490 nm.

3.9. Toxicidad por ornitina

Teniendo en cuenta los resultados descriptos podría explicarse el comportamiento de la cepa E. coli BGA8, si una concentración endógena alta de ornitina fuera tóxica para las células bacterianas. Cuando se agrega poliaminas o arginina al medio de cultivo disminuye la síntesis de ornitina y la célula podría adquirir un estado fisiológico normal, con el consiguiente aumento de la velocidad de crecimiento. Para comprobar esta hipótesis se cultivó E. coli BGA8 en un medio mínimo con 100 µg/ml de putrescina y con cantidades crecientes de ornitina (Figura 31). A bajas concentraciones de ornitina no se observó ningún efecto, pero a partir de 0,5 mg/ml de ornitina el crecimiento comenzó a hacerse más lento y llegó a detenerse entre 4 y 6 mg/ml de ornitina. Se pudo comprobar que este efecto no se debía a una interferencia con la entrada de putrescina a la célula, porque el crecimiento de una cepa salvaje también se inhibió de igual manera por la presencia de ornitina. Posteriormente se determinó que cuando se alcanza una concentración externa de ornitina entre 3 y 4 mg/ml de cultivo, el nivel interno del aminoácido es similar al que se encuentra en las células cultivadas sin poliaminas (Fig. 32). Esto permite explicar el crecimiento lento de los cultivos de E. coli BGA8 en ausencia de poliaminas.

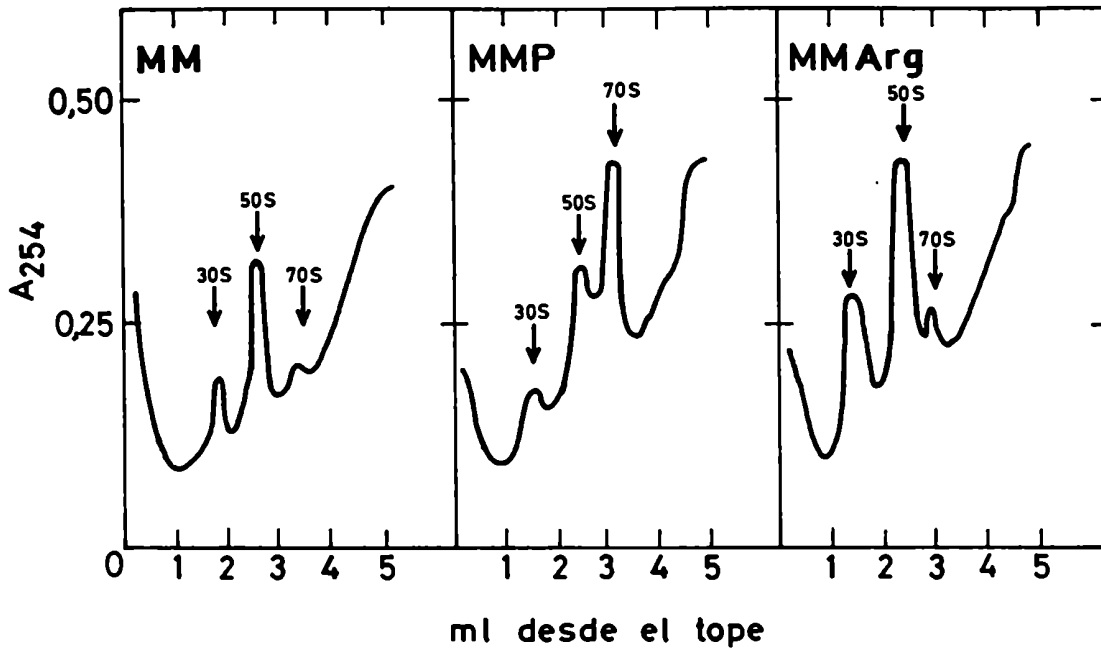


Figura 33: Análisis en gradientes de sacarosa de los perfiles ribosomales de E. coli BGA8 cultivada en presencia de arginina

Los extractos celulares provenientes de bacterias cultivadas en medio mínimo (MM), medio mínimo con putrescina (MMP) y medio mínimo con arginina (MMArg) se prepararon y analizaron por centrifugación en gradientes de sacarosa (15%-45%), como se describe en "Materiales y Métodos". Se indican las posiciones de las partículas 30s, 50s y 70s en los gradientes.

3.10. Análisis de la distribución ribosomal

En anteriores trabajos de Algranati y col. (113) se demostró que el equilibrio entre las partículas ribosomales varía en la cepa BGA8 dependiendo de la presencia o ausencia de poliaminas en el medio de cultivo. Dicho equilibrio se desplaza hacia las subunidades en bacterias sometidas a un ayuno en poliaminas. En cambio, cuando se agrega putrescina al medio aumenta la proporción de monómeros y la velocidad de crecimiento.

El perfil ribosomal en E. coli BGA8 desarrollada en un medio con arginina es muy similar al de las bacterias cultivadas sin putrescina. Este resultado indica que la arginina no puede reemplazar a la putrescina en la normalización del equilibrio entre las partículas ribosomales pero en cambio puede sustituirla parcialmente en el aumento de la velocidad de crecimiento (Figura 33).

DISCUSION

Las poliaminas desempeñan roles esenciales en la síntesis de DNA, RNA y proteínas como así también en la proliferación de células procariontes y eucariontes. Teniendo en cuenta la importancia de las múltiples funciones mencionadas, se decidió investigar distintos aspectos aún no aclarados de la biosíntesis de poliaminas y de su regulación. Con este propósito se utilizó la bacteria E. coli, que es un microorganismo de fácil obtención en el cual se ha logrado acumular un gran conocimiento bioquímico y genético. El aislamiento de cepas bacterianas mutantes incapaces de sintetizar poliaminas permitió regular a voluntad el nivel endógeno de estas sustancias e investigar en detalle los efectos producidos en diferentes condiciones.

En la primera parte del presente trabajo se estudió el mecanismo de aparición de bacterias que no requieren poliaminas en cultivos de E. coli BGA8, que es una cepa mutante que no sintetiza estas sustancias y necesita del agregado de las mismas al medio para su crecimiento óptimo.

En la segunda parte se investigó el rol de las poliaminas en la regulación de la biosíntesis de arginina.

En estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio se había observado repetidamente que los cultivos de la cepa E. coli BGA8 luego de varios períodos consecutivos y prolongados de crecimiento lento en medios que no contenían poliaminas, comenzaban a crecer rápidamente. La velocidad de proliferación de estos cultivos que habían perdido su auxotrofía para poliaminas era similar a la de la cepa BGA8 desarrollada en presencia de

poliaminas. E. coli MA255, otra cepa auxótrofa para poliaminas, mostró un comportamiento análogo.

Como primer paso para conocer el mecanismo de esta reversión fenotípica, se estudió el contenido endógeno de poliaminas en estas bacterias que designamos con la abreviatura bp (por "by pass").

Se pudo comprobar que las células bp tienen concentraciones de putrescina y espermidina parecidas a la de la cepa salvaje MRE600 (Tabla III). Si bien no se efectuó un análisis químico estructural de las poliaminas encontradas en las bacterias bp, el hecho de que se comporten en varios sistemas cromatográficos como putrescina y espermidina sugiere firmemente que se trata de estas sustancias.

Los hechos descritos permiten concluir que las células bp recuperaron la capacidad de sintetizar poliaminas y se desarrollan normalmente sin necesidad del agregado de estas sustancias. Estos cultivos bp son diferentes a los descritos por Tabor y col. para otra cepa auxótrofa para poliaminas (E. coli EWH319) que también deja de requerir los poliaminas y crece a velocidad normal en condiciones en que no contiene putrescina ni espermidina endógenas.

Los experimentos descritos en el presente trabajo se realizaron con cultivos preparados a partir de una colonia aislada que llamamos E. coli BGA8bp.

En nuestros estudios no siempre se pudo utilizar como control la cepa salvaje MA17, ya que ésta mostró un crecimiento defectuoso. Esto se debe posiblemente a alguna mutación adicional de la cepa disponible en el laboratorio.

La recuperación de la síntesis de putrescina en la cepa BGA8bp se puede explicar por la aparición de una vía metabólica desconocida o por una reversión genética en alguno de los genes mutados de las enzimas ornitina decarboxilasa (ODc) o agmatinasa (AUH). Esta última posibilidad también debe considerarse debido a que las mutaciones en los genes mencionados de la cepa E. coli BGA8 posiblemente son puntuales, ya que se obtuvieron con mutágenos químicos (47).

La medida de las actividades de ambas enzimas permitió establecer que E. coli BGA8bp no es una cepa revertante pues tiene niveles muy reducidos de las enzimas ODc y AUH, tan bajas como los de la cepa BGA8.

Tampoco se pudo detectar actividad de ornitina decarboxilasa inducible en la cepa BGA8bp, ni en ninguna de las cepas usadas, lo que confirma que E. coli K12 y las bacterias derivadas de ella no poseen esta forma enzimática.

Es interesante señalar que aunque la cepa BGA8bp no resultó ser una revertante de BGA8, sí lo eran otras de las colonias aisladas de cultivos que habían perdido el requerimiento de poliaminas, ya que mostraron haber recuperado la actividad ornitina decarboxilasa o de agmatinasa. Pese a que no se efectuó un estudio estadístico se puede afirmar que la reversión fue el evento más frecuente en la aparición de cultivos independientes de la presencia de poliaminas. Sin embargo debe tenerse en cuenta que basta que revierta uno solo de los genes mutados de cualquiera de las dos enzimas para que se recupere la capacidad de sintetizar putrescina.

Para confirmar los resultados anteriores se estudió si las bacterias E. coli BGA8bp pueden sintetizar putrescina "in vivo" a partir de ornitina o

arginina y se observó que en esta cepa ninguno de los dos compuestos son utilizados para sintetizar putrescina (Tablas VI y VII). Este resultado no se puede atribuir a una captación disminuída de los aminoácidos, ni a un incremento en el contenido endógeno de los mismos (2.4.4. y Fig. 12) que podría diluir los compuestos radioactivos. Estudios preliminares demostraron que en la cepa BGA8bp tampoco hay una excreción aumentada de poliaminas al medio de cultivo.

Aunque los experimentos con ^{14}C -ornitina son algo menos concluyentes, todos los datos obtenidos sugieren que la arginina y la ornitina no pueden ser precursores de la putrescina en la cepa BGA8bp. La citrulina que se forma a partir de ornitina tampoco puede dar origen a la putrescina detectada en estas bacterias.

Cuando los experimentos "in vivo" se realizaron con glucosa o ácido glutámico radioactivos se demostró que estos compuestos son precursores de la putrescina tanto en E. coli BGA8bp como en la cepa salvaje MRE600. La ornitina no parece ser un intermediario en estas conversiones en bacterias BGA8bp ya que el agregado de un exceso de esta sustancia no provocó una caída drástica en la radioactividad de la putrescina, como ocurrió en la cepa salvaje MRE600. Sin embargo, la radioactividad en la putrescina de la cepa BGA8bp debería permanecer constante luego de agregar un exceso de ornitina, y en realidad este valor disminuyó a un 50% (Tabla VIII), posiblemente debido a que gran parte del exceso de ornitina se convierte en arginina y ésta a su vez podría inhibir la síntesis de putrescina.

Cuando se usó un exceso de arginina en experimentos análogos a los

anteriores, la radioactividad en putrescina prácticamente desapareció, tanto en la cepa BGA8bp como en la cepa MRE600. Estos resultados se pueden explicar suponiendo que la arginina también reprime la síntesis de putrescina en la cepa BGA8bp, como ya se sabe que ocurre en una cepa salvaje (74). En consecuencia, el camino metabólico de síntesis de poliaminas a partir de ácido glutámico en las bacterias BGA8bp podría ser una vía enteramente distinta a las conocidas, pero con enzimas también reprimibles o inhibibles por arginina.

De todos los datos mencionados se concluye que la cepa BGA8bp sintetiza putrescina pese a que no posee las enzimas agmatinasa y ornitina decarboxilasa. Dicha síntesis se lleva a cabo a partir de ácido glutámico sin involucrar ornitina ni arginina como intermediarios.

La cinética de aparición de radioactividad en putrescina a partir de ^{14}C -glucosa también fue diferente en E. coli BGA8bp y MRE600 (Fig. 14).

Una característica peculiar de la cepa BGA8bp es la fase lenta de crecimiento que aparece antes de alcanzar la velocidad máxima de desarrollo durante la fase logarítmica. Este período de multiplicación lenta se debe a que las bacterias pierden gran parte de las poliaminas al llegar a la fase estacionaria, y son bacterias de esta fase las utilizadas como inóculo.

Al estudiar distintas propiedades de la cepa E. coli BGA8bp se observó que a medida que aumenta la temperatura de cultivo la fase de crecimiento lenta se hace más corta, desapareciendo a 42°C . De esta manera la fase de crecimiento exponencial sólo apareció netamente en el rango de 37° a 42°C . Este resultado se puede deber a que las enzimas que sintetizan putrescina en

E. coli BGA8bp podrían inducirse más eficazmente a esas temperaturas; por esta razón, sería importante medir el contenido endógeno de poliaminas a diferentes temperaturas de cultivo.

Por otro lado se observó que existía una relación inversa entre el grado de aereación de los cultivos y la duración de la fase de crecimiento lenta. Además cuando se usó manosa como fuente de carbono en lugar de glucosa los cultivos de la cepa BGA8bp se desarrollaron rápidamente desde el comienzo sin atravesar la fase lenta de crecimiento.

Otros experimentos mostraron que de acuerdo a algunos parámetros experimentales el aparato de síntesis proteica de E. coli BGA8bp es más parecido al de la cepa BGA8 cultivada con poliaminas que al correspondiente a bacterias sometidas a un ayuno de dichas sustancias, como se podía esperar ya que E. coli BGA8bp tiene un contenido endógeno normal de poliaminas. Así, por ejemplo, la velocidad de síntesis de proteínas "in vivo" fue superior en la cepa BGA8bp que en E. coli BGA8 cultivada sin poliaminas. También dicha síntesis mostró una sensibilidad a estreptomycinina característica de las bacterias con niveles intracelulares normales de putrescina (Figs. 20 y 21). En cambio la cepa BGA8 desarrollada sin poliaminas fue menos sensible, coincidiendo con resultados anteriores que mostraron que el antibiótico mencionado sólo ejerce su efecto máximo en presencia de poliaminas. El estudio de los perfiles ribosomales en gradientes de sacarosa indicó que en E. coli BGA8bp el equilibrio entre subunidades y monómeros 70s se encuentra desplazado hacia las partículas 70s, como ocurre en la cepa BGA8 cultivada con poliaminas (Fig. 22). Todos estos resultados demuestran que según diferentes

criterios E. coli BGA8bp se comporta como una cepa con niveles normales de poliaminas.

¿Cuáles pueden ser los compuestos intermediarios entre el ácido glutámico y la putrescina en la cepa BGA8bp? En E. coli, el ácido glutámico es precursor de arginina, prolina (144) y ácido γ -aminobutírico (GABA) (145). Sin embargo, hasta el presente no se ha descrito que estos dos últimos compuestos puedan convertirse en putrescina en E. coli y datos preliminares de nuestros experimentos también sugieren que en las cepas BGA8bp y MRE600 la prolina no es un precursor de putrescina. Los intermediarios de la vía biosintética de esta poliamina en E. coli BGA8bp podrían ser compuestos distintos a los mencionados más arriba.

También se investigó si la espermidina puede convertirse en putrescina, y se pudo descartar tal posibilidad en todas las cepas estudiadas (Fig. 16), coincidiéndose con resultados de otros autores.

Con el propósito de profundizar nuestros estudios se obtuvo una bacteria mutante derivada de la cepa BGA8bp que carece de la enzima N-acetilglutámico sintetasa que cataliza la primera reacción en la biosíntesis de arginina (Fig. 3). Esta cepa auxótrofa para arginina (BGA8bp argA-1) que sólo crece en presencia de este aminoácido o alguno de sus precursores se utilizó para conocer si la enzima mencionada interviene en la síntesis de putrescina en la cepa BGA8bp. Cuando las bacterias E. coli BGA8bp y BGA8bp argA-1 se cultivaron en un medio con arginina desapareció la putrescina endógena; en cambio, cuando los cultivos se realizaron en un medio con ornitina, las bacterias contenían nuevamente una cantidad normal de putrescina. Esto podría deberse a

que la arginina reprime la síntesis de putrescina y la ornitina no ejerce este efecto. La cepa BGA8 bp argA-1 sintetizó "in vivo" putrescina radioactiva a partir de ^{14}C -ácido glutámico cuando el cultivo se efectuó en presencia de ornitina en lugar de arginina. Este resultado parece indicar que en estas bacterias la putrescina se forma sin la intervención de N-acetil glutámico sintetasa. Sin embargo, no se puede descartar totalmente que la mutación de dicha enzima no sea completa, permitiendo la síntesis reducida de putrescina. Debido a la inestabilidad de la N-acetil glutámico sintetasa no fue posible dosarla, pero se pudo comprobar que la cepa BGA8bp argA-1 no se desarrolla en medio mínimo con ácido glutámico lo que sugiere que el nivel de la enzima debe ser prácticamente nulo.

Con el fin de establecer si la transformación de E. coli BGA8 en bacterias que no requieren poliaminas involucraba un cambio fenotípico o eventos mutacionales que otorgan a estos organismos un carácter genéticamente estable, se cultivó E. coli BGA8bp durante varias generaciones en un medio con putrescina o en un medio rico. Luego se sometió las bacterias a un nuevo ayuno de poliaminas y se demostró que mantenían su crecimiento normal en ausencia de estas sustancias. Este resultado permitiría calificar a E. coli BGA8bp como una cepa nueva.

¿Cuáles pueden ser los eventos moleculares que provocan la aparición de una nueva vía de síntesis de poliaminas en la cepa BGA8bp? Una de las posibilidades es que existan genes de enzimas biosintéticas de poliaminas diferentes a las enzimas ya conocidas cuya expresión en una cepa salvaje esté reprimida permanentemente. Estos genes silenciosos o crípticos sólo se expre-

sarían en condiciones de ayuno de poliaminas. Es interesante señalar que se han descrito genes superreprimidos en E. coli para varias funciones metabólicas distintas a la síntesis de poliaminas (146). Si en el caso de E. coli BGA8 el corepresor fuera putrescina o espermidina, al suplementar la cepa BGA8bp con poliaminas y luego someterla a un nuevo ayuno de estas sustancias, el cultivo debería crecer lentamente en una primera etapa a causa de la represión ejercida por las poliaminas remanentes sobre su propia síntesis, como eventualmente podría suceder en E. coli BGA8. Sin embargo como ya se mencionó, la síntesis de putrescina en E. coli BGA8bp no se detuvo luego de un ciclo de suplementación y ayuno de poliaminas, indicando que esta síntesis posiblemente no se produce por la inducción de un gen superreprimido.

También se podría pensar que los genes silenciosos sólo se activan si ocurre un cambio mutacional en el material genético. Entre los eventos a nivel del DNA que podrían activar estos genes se pueden mencionar mutaciones que den origen a un promotor en la región 5' de un gen u operón carentes de una zona promotora, o la inserción de un transposón portador de una región promotora. También podría existir una enzima capaz de catalizar una escasa conversión en putrescina de algún sustrato diferente a ornitina o arginina. En este caso las condiciones de ayuno prolongado de poliaminas seleccionarían las células capaces de sobreproducir dicha enzima; esta misma presión selectiva llevaría a la selección de células en las cuales alguna enzima hubiera sufrido sucesivos cambios mutacionales hasta poder catalizar la síntesis de putrescina. Cada una de las posibilidades mencionadas corresponden a casos ya descritos para otros procesos metabólicos (146-148).

La segunda parte del presente trabajo abarca distintos aspectos del rol de las poliaminas en la regulación de la síntesis de arginina en *E. coli*.

Al investigar el efecto del agregado de diferentes aminoácidos básicos a cultivos en medio mínimo sin poliaminas de la cepa BGA8 se observó que mientras arginina y citrulina estimulaban la velocidad de crecimiento, la ornitina producía el efecto opuesto. El ácido arginino-succínico también mostró una acción estimuladora aunque menor que la observada con arginina. Es interesante destacar que el efecto de la arginina no se observó en células suplementadas con putrescina. El análisis del contenido endógeno de poliaminas en *E. coli* BGA8 cultivada en medio mínimo con arginina indicó que dicha concentración era tan baja como en las bacterias sometidas al ayuno de poliaminas; por lo tanto el crecimiento acelerado parecía no deberse a la presencia de poliaminas. Para corroborar esta hipótesis se intentó detectar actividad de agmatinasa en extractos celulares de la cepa BGA8 cultivada en presencia de varias concentraciones de arginina, teniendo en cuenta que podría inducirse dicha enzima por la presencia del aminoácido (Fig. 27). Los resultados fueron negativos confirmando los hallazgos de Boyle (58), quien describió la existencia de una sola forma de agmatinasa codificada por el gen *speB*, que se encuentra mutado en la cepa *E. coli* BGA8.

Los ensayos de incubación "in vivo" con ^{14}C -arginina demostraron que este compuesto no se convierte en putrescina (Tabla XVIII).

Estos experimentos en conjunto permiten afirmar que el efecto de la arginina sobre el crecimiento de la cepa BGA8 no se debe a que este aminoácido básico se transforme en putrescina.

El hecho de que la ornitina disminuye la velocidad de crecimiento de E. coli BGA8 mientras la citrulina y la arginina la aumentan parecía indicar que existía un bloqueo metabólico entre ornitina y citrulina. Por ello se midieron las concentraciones intracelulares de estos aminoácidos y se encontró que en cultivos sin poliaminas de la cepa BGA8 los niveles de ornitina eran aproximadamente 50 veces mayores que los de las bacterias cultivadas en presencia de poliaminas, y estos últimos a su vez eran similares a los de una cepa salvaje (Tabla XVII). Ya existían evidencias anteriores del incremento del contenido intracelular de ornitina en bacterias E. coli BGA8 sometidas a ayuno de poliaminas (76). Al agregar arginina al medio de cultivo el nivel de ornitina endógena disminuye, presumiblemente por la acción reguladora del producto final sobre las enzimas de este camino metabólico (74,143).

Se pudo establecer que el incremento extraordinario del nivel de ornitina en la cepa BGA8 se debe específicamente a la ausencia de poliaminas y no a un efecto secundario debido al crecimiento lento, ya que bacterias cultivadas en presencia de putrescina, pero que crecen lentamente por utilizar acetato como fuente de carbono, contienen cantidades normales de ornitina (3.3.).

Es interesante destacar que los niveles endógenos de arginina hallados en los diferentes cultivos apenas superaron el nivel de detección del método empleado, indicando que la concentración del aminoácido libre es muy reducida.

Cuando se determinó el nivel de la enzima ornitina transcarbamilasa (OTC), que cataliza la transformación de ornitina en citrulina, se pudo

comprobar que, contrariamente a lo esperado, la actividad "in vitro" de esta enzima era mayor en los cultivos sometidos a ayuno de poliaminas. Varios criterios indicaron que se estaba midiendo una actividad OTC auténtica, ya que era reprimible por arginina e inhibible por fosfato y ornitina, siendo estas conocidas propiedades de la enzima (136); también se aisló citrulina, que es uno de los productos de reacción. En ensayos enzimáticos en los que se mezclaron extractos de bacterias cultivadas en presencia y ausencia de poliaminas o se intercambiaron sobrenadantes de lisados celulares calentados a 100°C, no se pudieron detectar factores activadores o inhibitorios de la actividad de OTC.

En otra serie de experimentos, se midió el contenido intracelular de carbamil fosfato, pues una disminución de este sustrato de la enzima OTC, podría explicar la aparente contradicción entre los resultados que indicaban la gran acumulación de ornitina y la actividad relativamente alta de ornitina carbamil transferasa en la cepa EGA8 cultivada sin poliaminas. En este caso, también contrariamente a lo esperado, el contenido de carbamil fosfato fue mayor en las bacterias sometidas al ayuno de poliaminas que en las desarrolladas en presencia de putrescina. En consecuencia, los resultados sugieren firmemente que la acumulación de ornitina en cultivos carentes de poliaminas no se debe a un bloqueo metabólico de la enzima OTC, sino posiblemente a una síntesis aumentada de ornitina. Por esta razón se estudió la síntesis de ornitina a partir de ^{14}C -ácido glutámico en cultivos con y sin poliaminas de la cepa EGA8. La ornitina radioactiva formada en bacterias sometidas al ayuno de poliaminas fue muy superior a la encontrada en bac-

terias cultivadas en presencia de putrescina (Tabla XXII). La diferencia no se puede atribuir a que en los cultivos suplementados la mayor síntesis proteica incrementa la conversión de ornitina en arginina, ya que con bacterias en presencia de cloranfenicol se obtuvo un resultado similar. Se puede concluir entonces, que la ausencia de poliaminas provoca una sobreproducción de ornitina.

En otro experimento se agregó ^{14}C -ornitina a cultivos con y sin poliaminas de la cepa EGA8 y sólo se detectó una pequeña cantidad de arginina radioactiva libre; sumando a estos niveles la arginina marcada incorporada en cada caso a proteínas, se observó que en las bacterias cultivadas con putrescina la radioactividad total en arginina era muy superior a la de las bacterias sometidas a ayuno de poliaminas. Ya que en estas bacterias no existe un bloqueo entre ornitina y citrulina, el resultado anterior se puede explicar por la dilución isotópica que sufre la ornitina radioactiva en el "pool" endógeno muy aumentado de este aminoácido en las bacterias sin poliaminas. Cuando el precursor radioactivo utilizado fue citrulina, cuyo nivel endógeno es similar en ambos tipos de bacterias, la radioactividad encontrada en arginina fue sólo tres veces superior en las bacterias cultivadas en presencia de putrescina, como se podía esperar por la mayor síntesis de proteínas que ocurre en estas bacterias (100,101).

Para investigar si el contenido aumentado de ornitina puede tener un efecto "per se" sobre el desarrollo celular, se agregaron cantidades crecientes de ornitina a cultivos con poliaminas de la cepa EGA8. Se pudo observar que la ornitina a concentraciones del orden de 4 mg/ml es tóxica para las

células, causando el cese del crecimiento. Este aminoácido a las concentraciones mencionadas también resultó tóxico para la cepa salvaje MRE600. Es preciso destacar que con una concentración externa de ornitina de 3 a 5 mg/ml se alcanzan niveles intracelulares similares a los encontrados en E. coli BGA8 sometida a un ayuno de poliaminas (Fig. 32). Esto puede indicar que el contenido anormalmente elevado de ornitina que posee la cepa BGA8 en cultivos carentes de poliaminas resulta tóxico para el desarrollo celular. El agregado de putrescina o espermidina como también de citrulina o arginina, impide la acumulación de ornitina y por ende acelera el crecimiento. El tiempo de duplicación de las bacterias cultivadas con arginina (95 min) es mayor al que se logra con poliaminas (75 min). Esta diferencia probablemente se deba a que la arginina sea capaz de reemplazar a las poliaminas sólo en el control del nivel de ornitina, pero no en otras funciones, como lo sugiere el hecho de que el agregado de arginina a los cultivos no produce un desplazamiento del equilibrio existente entre partículas ribosomales hacia los monómeros 70s como ocurre en bacterias suplementadas con poliaminas (Fig. 33).

Queda por dilucidar cuál es el paso metabólico que las poliaminas controlan para regular la concentración endógena de ornitina. Las enzimas ornitina transcarbamilasa (OTC) y ornitina decarboxilasa (ODc) convierten la ornitina en citrulina y putrescina, respectivamente. Como ya se mencionó anteriormente, los resultados obtenidos demuestran que la enzima OTC no es regulada por poliaminas, además en nuestro caso la actividad de ODc no existe por mutación del gen correspondiente en la cepa E. coli BGA8.

La síntesis de arginina y por lo tanto de sus precursores, entre los que se cuenta la ornitina, está regulada principalmente por la primera enzima de la vía metabólica, que es la N-acetilglutámico sintetasa. En E. coli esta enzima es inhibida por arginina que es el producto final del camino metabólico (149). A su vez todos los genes correspondientes a esta vía biosintética pueden ser reprimidos por un complejo formado por el producto proteico del gen argR y el correpresor, que es la arginina (143,150).

Pese a que en E. coli se ha descrito que contrariamente a lo que ocurre en Pseudomonas aeruginosa (151) las poliaminas no inhiben la N-acetilglutámico sintetasa (149), hemos intentado dosar esta enzima en extractos celulares de la cepa BGA8 cultivada con y sin poliaminas, para investigar si en nuestro caso estas sustancias podrían inhibir o reprimir la enzima. Sin embargo no se tuvo éxito debido posiblemente a la gran inestabilidad de esta enzima, que sólo pudo ser purificada cuando se extrajo de una cepa superproductora (149). Tampoco se pudo identificar el producto de la reacción (ácido N-acetilglutámico) luego de efectuar incubaciones "in vivo" con ^{14}C -ácido glutámico.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En este trabajo se describe una serie de experimentos que permiten postular un nuevo camino de biosíntesis de putrescina que involucra ácido glutámico pero que no tendría como intermediarios ornitina ni arginina como sucede en los procesos biosintéticos conocidos. Esta nueva vía metabólica se ha detectado en una cepa doble mutante auxótrofa para poliaminas (E. coli BGA8) que se vuelve independiente de este requerimiento después de ser sometida a repetidos períodos de ayuno de putrescina (cepa E. coli BGA8bp). Aunque hasta el presente no se ha podido detectar los intermediarios de este camino biosintético al incubar bacterias E. coli BGA8bp con ácido glutámico radioactivo, esto se podría lograr utilizando el aminoácido marcado con ^{13}C y analizando las células "in vivo" por resonancia magnética nuclear.

Por otra parte se ha podido demostrar que las poliaminas regulan la biosíntesis de ornitina cuyo nivel intracelular aumenta en forma muy considerable en ausencia de putrescina o espermidina. La arginina, que es capaz de reprimir la biosíntesis de ornitina, puede reemplazar (aunque no totalmente) el efecto estimulador de las poliaminas sobre la velocidad de crecimiento.

Para desentrañar el mecanismo de control de las poliaminas sobre la concentración intracelular de ornitina será importante en el futuro dosar la enzima N-acetil glutámico sintetasa y su producto N-acetilglutámico en bacterias E. coli BGA8 cultivadas con y sin poliaminas, como asimismo medir los niveles de ornitina transaminasa en ambos tipos de células. Esta última

enzima también usa ornitina como sustrato y la transforma en ácido 5-pirrolidin carboxílico (5-PCA) (152) como parte de la vía de utilización de ornitina como fuente de carbono en E. coli (137).

Será también importante dilucidar cuál es el proceso metabólico afectado por el exceso de ornitina. Para ello habrá que investigar el efecto de altas concentraciones de esta sustancia sobre las velocidades de síntesis de DNA, RNA y proteínas en cultivos realizados en presencia de poliaminas. El aislamiento de cepas mutantes resistentes a un exceso de ornitina puede constituir una herramienta importante para comprender el mecanismo de su toxicidad.

A handwritten signature consisting of several overlapping, sweeping strokes, possibly representing the initials 'JL'.A handwritten signature in cursive script, which appears to read 'J. Leguamatz'.

BIBLIOGRAFIA

1. Cohen, S.S. (1971) Introduction to the polyamines, Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J.
2. Herbst, E.J. y E.E. Snell (1948) J. Biol. Chem. 176 989-990.
3. Smith, T.A. (1985) Ann. Rev. Plant. Physiol. 36 117-143.
4. Seiler, N. y Deckard, K. (1978) Advances in Polyamine Research (Campbell y col., eds.) vol. 2 pp. 145-150, Raven Press, New York.
5. Jäne, J., Pösö, H. y Raina, A. (1978) Biochim. Biophys. Acta 473 241-293.
6. Heby, O. (1981) Differentiation 19 1-20.
7. Algranati, I.D. y Goldenberg, S.H. (1977) Trends in Biochem. Sci. 2 272-274.
8. Mager, J. (1959) Biochim. Biophys. Acta 36 529-531.
9. Fink, H.L. y Folk, J.E. (1981) Advances in Polyamine Research (Caldarera, C., Zappia V. y Bachrach, U., eds.) pp. 187-196, Raven Press, New York.
10. Kuehn, G.D. y Atmar, V. (1983) Advances in Polyamine Research (Bachrach, U., Kaye, A. y Chayen, R., eds.) vol. 4 pp. 615-629, Raven Press, New York.
11. Jacob, S.T., Rose, K.M. y Canellakis, Z.N. (1983) Advances in Polyamine Research (Bachrach, U., Kaye, A. y Chayen, R., eds.) vol. 4 pp. 631-643, Raven Press, New York.
12. Tabor, H. y Tabor, C.W. (1972) Adv. Enzymol. 36 203-268.

13. Dion, A.S. y Cohen, S.S. (1972) *J. Virol.* 9 423-430.
14. Goldemberg, S.H. (1980) *J. Bacteriol.* 141 1428-1431.
15. Pösö, H., Hannonen, P., Himberg, J.J. y Jäne, J. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68 227-234.
16. Paulin, L., Vehmaanpera, J., Nykänen, I. y Pösö, H. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114 779-784.
17. Oshima, T. (1979) *J. Biol. Chem.* 254 8720-8722.
18. Oshima, T. (1983) *Advances in Polyamine Research* (Bachrach, U., Kaye, A. y Chayen, R., eds.) vol. 4 pp. 479-487, Raven Press, New York.
19. De Rosa, M., De Rosa, S. y Gambacorta, A. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69 253-261.
20. Yamamoto, S., Shinoda, S. y Makita, M. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87 1102-1108.
21. Smith, T.A. (1977) *Phytochemistry* 16 278-279.
22. Hamana, K., Kamekura, M., Onishi, H., Akazawa, T. y Matsuzaki, S. (1985) *J. Biochem.* 97 1653-1658.
23. Hamana, K., Miyagawa, K. y Matsuzaky, S. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112 606-613.
24. Scherer, P. y Kneifel, H. (1983) *J. Bacteriol.* 154 1315-1322.
25. Tobari, J. y Tchen, T.T. (1971) *J. Biol. Chem.* 246 1262-1265.
26. Kuttan, R., Radhakrishnan, A.N., Spande, T. y Witkop, B. (1971) *Biochemistry* 10 361-365.
27. Stillway, L.W. y Walle, T. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77 1103-1107.

28. Hamana, K. y Matsuzaki, S. (1984) *J. Biochem.* 95 1105-1110.
29. Matsuzaki, S., Hamana, K., Imai, K. y Matsuura, K. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107 307-313.
30. Herbst, E.J., Weaver, R.H. y Keister, D.L. (1958) *Arch. Biochem. Biophys.* 75 171-177.
31. Gvozdkak, R.I., Matyshevskaya, M.S., Muras, V.A., Sidorenko, S.S. y Zherebilo, O.E. (1985) *Mikrobiol Zh.* 47 81-82.
32. Abraham, A.K. y Pihl, A. (1981) *Trends. Biochem. Sci.* 6 106-107.
33. Michaels, R. y Tchen, T.T. (1968) *J. Bacteriol.* 95 1966-1967.
34. Frydman, B., Frydman, R., de los Santos, C., Alonso, D., Goldemberg, S.H. y Algranati, I.D. (1984). *Biochim. Biophys. Acta* 805 337-344.
35. Scraba, D.G., Bradley, R.D., Leyritz-Wills, M.B. y Warren, R.A.J. (1983) *Virology* 124 152-160.
36. Kamio, Y., Terawaki, Y. e Izaki, K. (1982) *J. Biol. Chem.* 257 3326-3333.
37. Ritchey, M.B. y Delwiche, E.A. (1975) *J. Bacteriol.* 124 1213-1219.
38. Varon, M., Fine, M. y Stein, A. (1983) *Arch. Microbiol.* 136 158-159.
39. Chen, K.Y. y Martynowickz, H. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124 423-429.
40. Gale, E.F. (1946) *Adv. Enzymol.* 6 1-32.
41. Tabor, C.W. y Tabor, H. (1985) *Microb. Rev.* 49 81-99.
42. Applebaum, D.M., Dunlap, J.C. y Morris, D.R. (1977) *Biochemistry* 16 1580-1584.
43. Applebaum, D.M., Sabo, L., Fischer, E.H. y Morris, D.R. (1975) *Biochemistry* 14 3675-3681.

44. Morris, D.R. y Pardee, A.B. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 20 697-702.
45. Wright, J.M. y Boyle, S.M. (1982) *Mol. Gen. Genet.* 186 482-487.
46. Shaibe, E., Metzger, E. y Halpern, Y.S. (1985) *J. Bacteriol.* 163 938-942.
47. Cunningham-Rundles, S. y Maas, W.K. (1975) *J. Bacteriol.* 124 791-799.
48. Boeker, E.A., Fischer, E.H. y Snell, E.E. (1969) *J. Biol. Chem.* 244 5239-5245.
49. Blethen, S.L., Boeker, S.L. y Snell, E.E. (1968) *J. Biol. Chem.* 243 1671-1677.
50. Morris, D.R. y Pardee, A.B. (1966) *J. Biol. Chem.* 241 3129-3135.
51. Wu, W.H. y Morris, D.R. (1973) *J. Biol. Chem.* 248 1687-1695.
52. Wu, W.H. y Morris, D.R. (1973) *J. Biol. Chem.* 248 1696-1699.
53. Buch, J.K. y Boyle, S.M. (1985) *J. Bacteriol.* 163 522-527.
54. Tabor, H. y Tabor, C.W. (1969) *J. Biol. Chem.* 244 6383-6387.
55. Maas, W.K. (1972) *Mol. Gen. Genet.* 119 1-9.
56. Boyle, S.M. y Adachi, K. (1982) *Can. J. Microbiol.* 28 945-950.
57. Boyle, S.M., Markham, G.D., Hafner, E.W., Wright, J.M., Tabor, H. y Tabor, C.W. (1984) *Gene* 30 129-136.
58. Sathishchandran, C. y Boyle, S.M. (1984) *J. Bacteriol.* 157 552-559.
59. Markham, G.D., Hafner, E.W., Tabor, C.W. and Tabor, H. (1980), *J. Biol. Chem.* 255 9082-9092.
60. Markham, G.D., Tabor, C.W. y Tabor, H. (1983) *Methods. Enzymol.* 94 228-230.
61. Markham, G.D. (1981) *J. Biol. Chem.* 256 1903-1909.

62. Pegg, A.E. y Jacobs, G. (1983) *Biochem. J.* 213 495-502.
63. Tabor, C.W., Tabor, H. y Hafner, E.W. (1978) *J. Biol. Chem.* 253 3671-3676.
64. Tabor, S. y Richardson, C.C. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 1074-1098.
65. Bowman, W.H., Tabor, C.W. y Tabor, H. (1973) *J. Biol. Chem.* 248 2480-2486.
66. Tabor, C.W., Tabor, H. y Xie, Q.W. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (in press).
67. Duerre, J.A. (1971) *Methods Enzymol.* 17 411-415.
68. Sabo, D.L., Boeker, E.A., Byers, B., Waron, H. and Fischer, E.H. (1974) *Biochemistry* 13 662-670.
69. Tabor, H., Hafner, E.W. y Tabor, C.W. (1980) *J. Bacteriol.* 144 952-956.
70. Wertheimer, S.J. y Leifer, Z. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114 882-888.
71. Akamatsu, N., Oguchi, M., Yajima, Y. y Ohno, M. (1973) *J. Bacteriol.* 133 409-410.
72. Morris, D.R., Wu, W.H., Applebaum, D. y Koffron, K.L. (1970) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 171 968-976.
73. Tabor, H. y Tabor, C.W. (1969) *J. Biol. Chem.* 244 2286-2292.
74. Morris, D.R. y Koffron, K.L. (1969) *J. Biol. Chem.* 244 6094-6099.
75. Morris, D.R. y Jorstad, C.M. (1970) *J. Bacteriol.* 101 731-737.
76. Goldemberg, S.H. y Algranati, I.D. (1977) *Mol. Cell. Biochem.* 16 71-77.
77. Hólta, E.J., Jänne, J. y Pispá, J. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

47 1165-1171.

78. Cohen, S.S., Hoffner, N., Jansen, M., Moore, M. y Raina, A. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57 721-729.
79. Kyriakidis, D.A., Heller, J.S. y Canellakis, E.S. (1983) Methods Enzymol. 94 193-199.
80. Paragiotidis, C.A. y Canellakis, E.S. (1984) J. Biol. Chem. 259 15025-15027.
81. Munro, G.F., Hercules, K., Morgan, J. y Sauerbier, W. (1972) J. Biol. Chem. 247 1272-1280.
82. Munro, G.F. y Sauerbier, W. (1973) J. Bacteriol. 116 488-490.
83. Wright, J.M. y Boyle, S.M. (1984) J. Bacteriol. 159 1074-1076.
84. Friedrich, B. y Magasanik, B. (1979) J. Bacteriol. 137 1127-1133.
85. Mercenier, A., Simon, J.P., Haas, D. y Stalon, V. (1980) J. Gen. Microbiol. 116 381-389.
86. Rahman, M., Laverack, P.D. y Clarke, P.H. (1980) J. Gen. Microbiol. 116 371-380.
87. Roon, R.J. y Barker, H.A. (1972) J. Bacteriol. 109 44-50.
88. Bitonti, A.J., McCann, P.P. y Sjoerdsma, A. (1982) Biochem. J. 208 435-441.
89. Pualin, L. y Pösö, H. (1983) Biochim. Biophys. Acta 742 197-205.
90. Tait, G.H. (1976) Biochem. Soc. Trans. 4 610-612.
91. Tait, G.H. (1985) Biochem. Soc. Trans. 13 316-318.
92. Srivenugopal, K.S. y Adiga, P.R. (1980) FEBS Lett. 112 260-264.
93. De Rosa, M., De Rosa, S., Gambacorta, A., Carteni-Farina, M. y Zappia,

- V. (1978) *Biochem. J.* 176 1-7.
94. Paulin, L., Ruohola, H., Nykänen, I. y Pösö, H. (1983) *FEMS Microbiol. Lett.* 19 299-302.
95. Hafner, E.W., Tabor, C.W. y Tabor, H. (1979) *J. Biol. Chem.* 254 12419-12426.
96. Markham, G.D., De Parasis, J. y Gatmaitan, J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259 14505-14507.
97. Hirshfield, I.N., Rosenfeld, H.J., Leifer, Z. y Maas, W.K. (1970) *J. Bacteriol.* 101 725-730.
98. Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
99. Young, D.V. y Srinivasan, P.R. (1972) *J. Bacteriol.* 112 30-39.
100. Algranati, I.D., Echandi, G., Goldemberg, S.H., Cunningham-Rundles, S. y Maas, W.K. (1975) *J. Bacteriol.* 124 1122-1127.
101. Goldemberg, S.H. y Algranati, I.D. (1981) *Eur. J. Biochem.* 117 251-255.
102. Echandi, G. y Algranati, I.D. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 62 313-319.
103. Igarashi, K.K., Kashiwagi, K., Kishida, T., Kakegawa, T. y Hirose, S. (1981) *Eur. J. Biochem.* 114 127-131.
104. Mitsui, K., Igarashi, K., Kakegawa, T. y Hirose, S. (1984) *Biochemistry* 23 2679-2683.
105. Goldemberg, S.H., Fernández-Velazco, J.G. y Algranati, I.D. (1982) *FEBS Lett.* 142 275-279.
106. Algranati, I.D. y Lengyel, P. (1966) *J. Biol. Chem.* 241 1778-1783.

107. Takeda, Y. (1969) *J. Biochem.* 66 345-349.
108. Changchien, L. y Aronson, J.N. (1970) *J. Bacteriol.* 103 734-740.
109. Ohno-Iwashita, Y., Oshima, T. e Imahori, K. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 171 490-499.
110. Cohen, S.S. (1970) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 171 869-881.
111. Igarashi, K. y Takeda, Y. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 213 240-243.
112. Silman, N., Artman, M. y Engelberg, H. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 103 231-240.
113. García-Patrone, M., González, N.S. y Algranati, I.D. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 395 373-380.
114. Igarashi, K., Sugawara, K., Izumi, I., Nagayama, C. y Hirose, S. (1974) *Eur. J. Biochem.* 48 495-502.
115. Abraham, A.K., Olsnes, S. y Pihl, A. (1979) *FEBS Lett.* 101 93-96.
116. Igarashi, K., Hashimoto, S., Miyake, A., Kashigaw, K. y Hirose, S. (1982) *J. Biochem.* 128 597-604.
117. Jelenc, P.C. y Kurland, C.G. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 3174-3178.
118. McMurry, L.M. y Algranati, I.D. (1986) *Eur. J. Biochem.* 155 383-390.
119. Tabor, H., Tabor, C.W., Cohn, M.S. y Hafner, E.W. (1981) *J. Bacteriol.* 147 702-704.
120. Tabor, H. y Tabor, C.W. (1983) *Advances in Polyamine Research* (Bacharach, U., Kaye, A. y Chayen, R., eds.) vol. 4 pp. 455-465, Raven Press, New York.
121. Gorini, L. (1969) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 34 101-109.

122. Tabor, T. y Tabor, C.W. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 7087-7091.
123. Abraham, A.K. (1968) Eur. J. Biochem. 5 143-146.
124. Gumpert, R.I. (1970) Ann. N.Y. Acad. Sci. 171 915-938.
125. Morris, D.R. y Hansen, M.T. (1973) J. Bacteriol. 116 588-592.
126. Mitsui, K., Ohnishi, R., Hirose, K. e Igarashi, K. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 123 528-534.
127. Goldenberg, S.H. (1984) Biochem. J. 219 205-210.
128. Kornberg, A. (1974) DNA Synthesis, pp. 399, W.H. Freeman Co., San Francisco.
129. Geiger, L.E. y Morris, D.R. (1978) Nature 272 730-732.
130. Tabor, H. (1960) Biochem. Biophys. Res. Commun. 3 382-385.
131. Davis, B.D. y Mingioli, E.S. (1950) J. Bacteriol. 60 17-28.
132. Dion, A.S. y Herbst, E.J. (1970) Ann. N.Y. Acad. Sci. 171 723-734.
133. Inoue, H. y Mizutani, A. (1973) Anal. Biochem. 56 408-416.
134. Weatherburn, M.W. (1967) Anal. Chem. 39 971-974.
135. Hunninghake, D. y Grisolia, S. (1966) Anal. Biochem. 16 200-205.
136. Legrain, Ch. y Stalon, V. (1976) Eur. J. Biochem. 63 289-301.
137. Wilson, H. y Holden, J.T. (1969) J. Biol. Chem. 244 2737-2742.
138. Algranati, I.D., González, N.S. y Bade, E. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62 574-580.
139. Wanders, R.J.A., Van Roermund, C., Lof, C. y Meijer, A. (1983) Anal. Biochem. 129 80-87.
140. Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

141. Seiler, N. (1971) *J. Chromatog.* 63 97-112.
142. Seiler, N. y Wiechmann, M. (1970) *Progress in Thin Layer Chromatography and Related Methods* (Niederwieser, A. y Pataki, G., eds.) vol. 1, pp. 99-144, Ann. Arbor Publishers, London.
143. Vyas, S. y Maas, W.K. (1963) *Arch. Biochem. Biophys.* 100 542-546.
144. Hayzer, D.J. y Leisinger, T. (1980) *J. Gen. Microbiol.* 118 287-293.
145. Marcus, M. y Halpern, Y.S. (1967) *J. Bacteriol.* 93 1409.
146. Riley, M. y Anllionis, A. (1978) *Ann. Rev. Microbiol.* 32 519-560.
147. Reynolds, A., Felton, J. y Wright, A. (1981) *Nature* 293 625-629.
148. Campbell, J., Lengyel, J. y Langridge, J. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70 1841-1845.
149. Marvil, D. y Leisenger, T. (1977) *J. Biol. Chem.* 252 3295-3303.
150. Kelker, N. y Eckhardt, T. (1977) *J. Bacteriol* 132 67-72.
151. Haas, D. y Leisinger, T. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60 42-47.
152. Shaibe, E., Metzger, E. y Halpern, Y.S. (1985) *J. Bacteriol.* 163 933-937.
153. Miret, J.J., Nainudel, S. y Goldemberg, S.H. (1986) *FEBS Lett.* 200 117-122.