PAPER DELS NUCLEÒTIDS MONOFOSFAT CÍCLICS EN LA REGULACIÓ DEL METABOLISME DELS BACTERIS

Article basat en la comunicació presentada a la Sessió Ordinària del 20 de novembre de 1980.

per

RICARD GUERRERO, JORDI BARBÉ i JOAN-ALBERT VERICAT

Departament de Microbiologia i Institut de Biologia Fonamental. Universitat Autònoma de Barcelona

SUMMARY

Cyclic nucleotides, particularly adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) and guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) are found in all eucaryotic organisms and in a great number of procaryotic cells. It is very important to know how cyclic nucleotides act controlling the different cellular responses. Some aspects are so understood, but others are still obscure. The molecular mechanisms involved and some of the physiological consequences of changes in levels of cAMP and cGMP are difficult to understand, and, even in the well known bacterium Escherichia coli, *some of them are not very clear.*

In this review we survey the present knowledge of the best known metabolic and physiological responses coordinated by cAMP in procaryotes. The first one is catabolite repression, where the role played by cAMP is well known. Two less understood phenomena related to catabolite repression are inducer exclusion and regulation of transcription. We also review the different hypothesis about how cAMP cellular levels are regulated, namely the effect of cAMP synthesis and degradation, in the light of recent experiments. In addition, other functions regulated by cAMP are discussed, whose mechanisms are still obscure both in Escherichia coli *and in other microorganisms. Finally, a possible role of cGMP and other cyclic nucleotides in microorganisms which lack cAMP is proposed.*

En aquest treball hom presenta una revisió sobre els coneixements que fins ara s'han aconseguit sobre el paper dels nucleòtids monofosfat

cíclics en la regulació del metabolisme bacterià, principalment l'AMP cíclic (AMPc). Es passarà revista a la major part de les activitats biològiques on participa l'AMPc. També serà comentada la funció biològica d'altres molècules, com ara el GMP cíclic o el ppGpp, ja que existeixen dades experimentals que indiquen que, en ocasions, poden participar juntament amb l'AMPc en la regulació de diferents activitats metabòliques. Veurem, al llarg de la revisió, que tota la fisiologia cel·lular bacteriana gira al voltant d'aquesta petita molècula efectora.

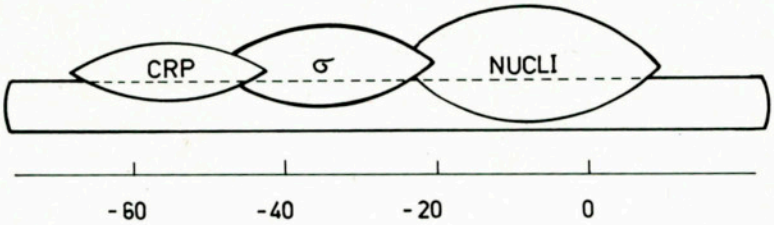
El coneixement de l'acció de l'AMPc és de gran importància per a resoldre els problemes que presenta la biologia actual; malauradament, si bé se sap que els nucleòtids cíclics (en especial l'AMPc) són substàncies fonamentals per a la regulació de un gran nombre de funcions biològiques i que es troben en la major part d'espècies procariòtiques, i en la totalitat de cèl·lules eucariotes, poc se sap, en profunditat, sobre llur acció molecular, àdhuc en un bacteri tan ben conegut com *Escherichia coli*. En altres procariotes, com a molt, solament s'ha detectat la seva presència o absència i la resposta fisiològica obtinguda en afegir-les al medi de cultiu.

Mecanisme d'acció de l'AMP cíclic

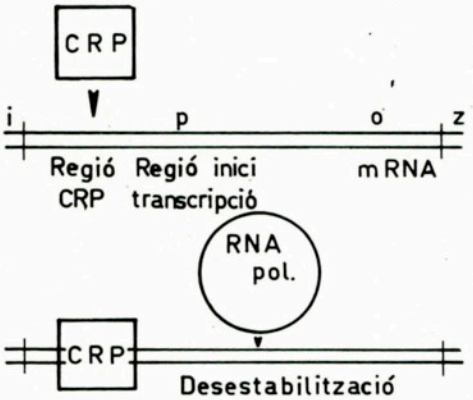
El model d'acció de l'AMPc a *E. coli* s'ha desenvolupat, principalment, amb l'estudi de l'operó de la lactosa. En forma resumida, i necessàriament esquemàtica, pot dir-se que l'AMPc actua mitjançant una proteïna receptora o acceptora d'ell mateix (CRP o CAP: de l'anglès, proteïna receptora o acceptora de l'AMPc). Aquesta proteïna té dos llocs o centres de reconeixement diferents, l'un per a l'AMPc i l'altre per l'ADN. Reforça aquesta hipòtesi l'existència de mutants d'*E. coli* resistents a l'acció de la proteïna CRP que tenen transicions de bases (AT per GC, o viceversa) en una regió de l'operó de la lactosa situada a uns seixanta parells de bases de distància del lloc d'inici de la transcripció (Gilbert *et al.*, 1976).

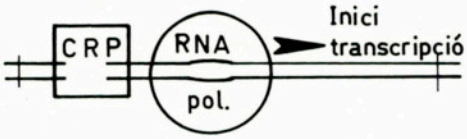
En presècia de l'AMPc, la proteïna CRP s'activa i tendeix a unir-se a seqüències específiques de l'ADN, permetent la unió de l'ARN polimerasa a l'ADN i la posterior transcripció de l'ADN en una regió situada entre 30 i 50 nucleòtids més enllà del lloc d'unió de la proteïna CRP activa a l'ADN (fig. 1A).

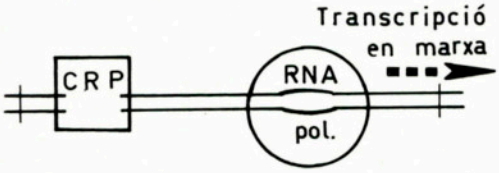
La proteïna CRP es troba lliure en el citoplasma cel·lular i tendeix a unir-se amb una certa freqüència i de forma inespecífica a l'ADN. Només quan interacciona amb l'AMPc s'incrementa l'afinitat per zones específiques del mateix ADN, per a permetre la transcripció, tal com s'ha comentat abans (fig. 1B).



1A







1B

FIG. 1. — *Seqüència nucleotídica de la regió reguladora d'un operó catabòlic.* A. El lloc de reconeixement de l'ARN polimerasa es troba situat després i al costat del lloc de reconeixement de la proteïna CRP, la qual és activada mitjançant l'AMPc. B. Seqüència d'esdeveniments que comporten la transcripció d'un operó catabòlic. En primer lloc, la proteïna CRP activada per l'AMPc ha d'unir-se a la regió CRP del gen promotor de l'operó. D'aquesta forma és permesa la unió de l'ARN polimerasa i la posterior desestabilització de la doble cadena d'ADN, de forma que s'inicia la transcripció.

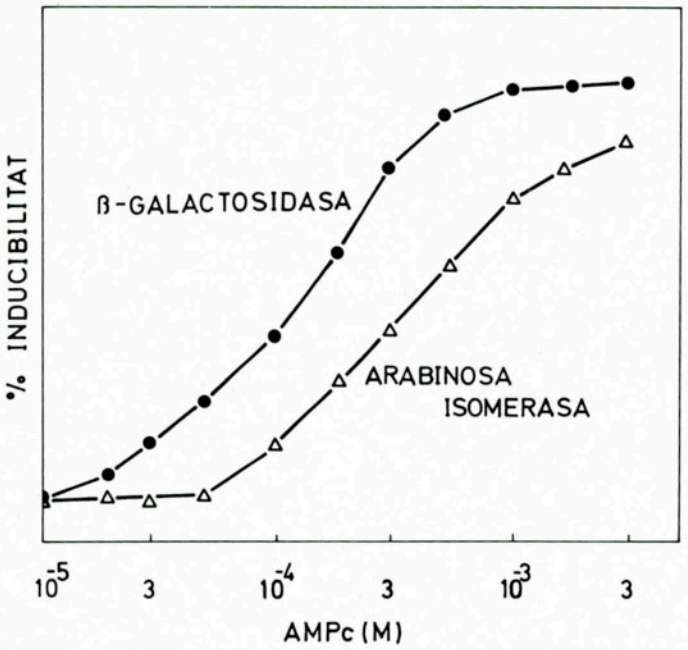


FIG. 2. — *Efecte de la concentració d'AMPc sobre l'activitat de dos enzims catabòlics.* Es representen les activitats de dos enzims (β-galactosidasa i arabinosa isomerasa) en funció de diferents dosis d'AMPc. Hom pot veure que l'enzim β-galactosidasa (●) respon a concentracions d'AMPc inferiors a les necessàries per a activar la síntesi de l'enzim arabinosa isomerasa (△).

L'afinitat que presenta la proteïna CRP activa és diferent per a cada tipus d'operó (fig. 2). Aquest fenomen suggereix que, donat que la proteïna CRP és única (no s'han trobat proteïnes receptores del catabolit diferents per a operons diferents), els complexos AMPc-CRP sempre estaran en equilibri amb llurs constituents, amb independència de les condicions de creixement. Donat que la proteïna CRP es troba en excés, en augmentar la concentració d'AMPc l'equilibri es desplaçarà cap a la formació del complex AMPc-CRP, permetent l'expressió d'operons que presenten més dificultat per a interaccionar amb la proteïna CRP activa. Queda clar, doncs, que el funcionament de la proteïna CRP té una gran importància per a la cèl·lula, ja que els mutants que són incapaços de sintetitzar-la o que la sintetitzen de forma inactiva o errònia creixen de forma defectuosa, fins i tot en medis molt rics (De Robertis *et al.*, 1973).

Repressió per catabolit

La repressió per catabolit és un fenomen que es dóna quan es fa crèixer un cultiu d'*E. coli* ensems amb glucosa i una font de carboni més pobra; és evident que en aquest moment està present la molècula inductora (la lactosa en el cas de la inducció de la β-galactosidasa) però el sistema no serà induït, ja que existeix prou concentració de glucosa per a ésser catabolitzada per a l'obtenció d'energia. És ben conegut que la concentració d'AMPc es troba en funció de la concentració de la font de carboni a disposició de la cèl·lula (Epstein *et al.*, 1975). En qualsevol cas, el sistema de regulació és molt més complex i es van trobant dades experimentals que indiquen l'existència de més factors, a part del complex AMPc-CRP, responsables en conjunt de la repressió per catabolit.

Travers (1975) va demostrar que la subunitat sigma de l'ARN polimerasa és important en la repressió per catabolit en mutants *cya* (incapaços de formar l'AMPc per absència de l'enzim adenilat ciclasa).

Així mateix, s'ha detectat l'existència d'un factor modulador del catabolit (CMF) (Dessein *et al.*, 1978), el qual desencadena la repressió per catabolit en bacteris amb delecions en *cya* i amb mutacions en *crp* (que donen una proteïna CRP sense afinitat pel seu substracte, l'AMPc). Aquest factor modulador del catabolit actuaria sobre la proteïna CRP impedint la seva interacció amb les regions promotores específiques de l'ADN i inhibint, per tant, la transcripció posterior. Així, segons aquests mateixos autors, l'acció de l'AMPc i del CMF sobre la dita proteïna serien independents entre si, i d'efecte contrari, i permetrien una regulació molt més fina de l'expressió de les funcions sotmeses a repressió per catabolit.

Aquesta darrera idea es veu reforçada pels treballs de Fraser i Yamazaki (1979), que han trobat que si bé existeix una relació directa entre la producció de β-galactosidasa i la concentració intracel·lular d'AMPc, és possible d'obtenir en una mateixa soca bacteriana, en condicions diferents de cultiu, nivells d'aquests enzims molt diferents per a concentracions similars d'AMPc intern. Aquest fet suggereix que l'AMPc pot no ser l'únic regulador en la producció de β-galactosidasa. Per tant, és evident la necessitat d'una millor caracterització del factor modulador del catabolit.

Juntament amb l'AMPc existeixen altres factors que poden interaccionar amb la proteïna CRP: l'àcid indol-acètic i l'àcid imidazol-acètic poden substituir l'AMPc per a l'expressió de l'operó de l'arabinosa (Kline *et al.*, 1980). En l'expressió de la β-galactosidasa es troben situacions similars. Per tant, s'ha suggerit que la repressió per catabolit és una conseqüència, en part, de les relacions existents entre les capacitats catabòliques i anabòliques de la cèl·lula en un moment donat del cicle

TAULA 1. — Efecte de diferents fonts de carboni sobre la velocitat de síntesi de β-galactosidasa, nivell d'AMPc i activitat adenilat ciclasa.

Font de Carboni	β-galactosidasa U/mg	Conc. Total AMPc pmol/mg pes sec F. Expon.	F. Estac.	Activitat adenilat ciclasa pmol/min/mg prot.
Glucosa 6P	2000	130	2500	46
Glucosa	2500	160	1900	51
Glicerol	6200	1200	1900	25
Succinat	7500	1680	2800	21

L'enzim β-galactosidasa va ésser induït amb isopropil-tiogalactòsid (IPTG) 1 mM, que és un anàleg no metabolitzable de la lactosa; l'AMPc fou determinat amb la tècnica habitual de ràdio-imunoassaig i les activitats ciclasa ho han estat segons la tècnica de Harwood i Peterkofsky (1975).

cel·lular. Així doncs, és clara l'existència d'altres elements de control, a part del complex format per l'AMPc i la proteïna CRP, que controlarien uns operons però no altres: una comparació de l'efecte de l'AMPc sobre la inducció de la triptofanasa i la β-galactosidasa en *E. coli* mostra que diferents combinacions en la font de carboni inhibeixen la síntesi del primer enzim mentre que estimulen la inducció de la β-galactosidasa en nivells diferents (Botsford, 1975). Un resum d'aquests resultats s'indica en la taula 1, on es mostra l'activitat de la β-galactosidasa en relació amb el nivell d'AMPc, tant en la fase de creixement exponencial com en la fase estacionària, mesurat segons la tècnica habitual del ràdio-immunoassaig.

EXCLUSIÓ DE L'INDUCTOR

La inhibició de la inducció d'un enzim per una segona font de carboni pot ésser una conseqüència de la inhibició en el transport de la molècula inductora. Així, la glucosa inhibeix el transport de la maltosa, galactosa, manosa, xilosa, arabinosa, i glicerol (McGinnis i Paigen, 1973). No es coneix amb precisió la forma en què es dóna aquesta exclusió però s'hi troba afectada la síntesi de l'AMPc. Sembla que en tenir lloc el transport actiu d'un sucre de primer ordre com la glucosa, aquesta és fosforilada a costa del fosfat ric en energia del fosfoenolpiruvat (PEP), de manera que en aquesta situació l'adenilat ciclasa no és activa i en conseqüència el nivell d'AMPc en l'interior de la cèl·lula disminueix, pel qual s'atura la transcripció de certs operons. Aquesta hipòtesi sobre la formació de l'AMPc serà descrita amb més detall en l'apartat corresponent.

Paper de l'AMP cíclic en la regulació de la terminació de la transcripció

En els operons fins ara coneguts, les proteïnes individuals codificades en l'ADN són transcrites a un ARN missatger policistrònic, expressant-se de forma coordinada. Jacob i Monod (1961) varen definir la polaritat com el fenomen en el qual els gens proximals amb respecte a l'origen de lectura s'expresaven amb més intensitat que els distals. S'ha suggerit que aquest fenomen està relacionat amb l'existència de senyals de terminació de la transcripció avançades en la seqüència de l'ADN. Sembla que el complex AMPc-CRP impideix la terminació prematura de la transcripció estabilitzant l'ARN polimerasa; aquest fet ve suportat per dades experimentals que indiquen que es troben zones de reconeixement del complex AMPc-CRP en els operons policistrònics. Per altra banda, també s'ha descrit que el complex AMPc-CRP inhibeix, directament o indirectament, l'expressió o l'activitat de la subunitat rho de l'ARN-polimerasa, que intervé directament en la terminació de la transcripció.

Evidentment, el sistema regulador de la transcripció és encara molt més complicat, ja que està ben demostrat que els productes de l'acció metabòlica dels enzims catabòlics actuen també en la regulació de l'acció i/o expressió de la subunitat rho. D'aquesta forma s'aconsegueix un sistema que pot respondre a un gran nombre de petites variacions en les condicions del medi.

Regulació dels nivells d'AMP cíclic en *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium*

Els nivells d'AMPc intracel·lular poden estar regulats per tres sistemes diferents: excreció de l'AMPc, degradació del nucleòtid fosforilat per l'enzim AMP cíclic fosfodiesterasa i, en tercer lloc, l'activació (o inhibició) de l'activitat adenilat ciclasa. És evident que totes elles actuen ensems en funció de l'estat fisiològic de la cèl·lula.

Un primer factor que participa en el manteniment del nivell intracel·lular d'AMPc és el transport actiu del nucleòtid cap a l'exterior. En la figura 3 es pot veure que el nucleòtid no és excretat al medi fins que el bacteri no es troba en plena fase exponencial de creixement, quan es cultiva en un medi ric com és el medi LB. Durant la fase inicial del creixement s'acumula l'AMPc, per baixar després, possiblement per esgotament de nutrients, el qual faria que no fossin necessaris els enzims regulats per certs operons. Pot veure's que la taxa d'alliberament de l'AMPc és constant i que segueix una cinètica equivalent a la de la corba de creixement; també es pot veure que, contràriament al que hom po-

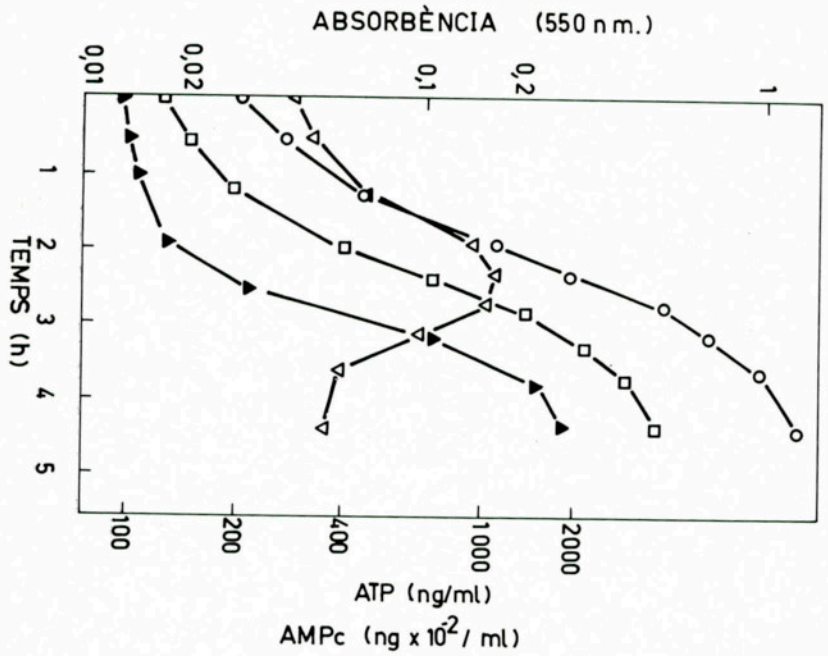


FIG. 3. — *Nivells d'ATP, d'AMPc intracel·lular i d'AMPc extracel·lular segons la fase de creixement.* Es representa la cinètica de creixement d'*Escherichia coli* en medi ric. La síntesi d'ATP (□) intracel·lular està expresada en ng ml^{-1} de cultiu, mentre que els nivells d'AMPc intracel·lar (▽) i extracel·lular (△) estan expressats en ng ml^{-1} (x 10^{-2}). La corba (○) mostra la cinètica de creixement del cultiu mesurada en forma de densitat òptica.

dria esperar si l'ATP participés en la regulació de la transcripció com a senyal de manca o presència d'energia, el nivell d'ATP segueix la cinètica de creixement cel·lular. Així, és clar que en un creixement a expenses d'un sucre i quan el cultiu es troba en fase exponencial de creixement, els nivells de l'AMPc venen determinats per la velocitat de síntesi del mateix nucleòtid o de l'activitat adenilat ciclasa. No creiem que la taxa d'alliberament de l'AMPc es modifiqui en funció del sucre que s'utilitzi per a fer crèixer els cultius puix la funció del nucleòtid és prou ràpida com per a què no sigui necessari el seu alliberament en forma activa per a anul·lar el seu efecte.

L'AMPc pot ésser degradat per l'enzim AMP cíclic fosfodiesterasa.

Aquest enzim s'ha trobat a *Serratia marcescens* i *E. coli*, i s'ha detectat la seva activitat a *Klebsiella pneumoniae* i *K. aerogenes*. És un enzim que no presenta notables diferències filogenètiques i que no es veu afectat per les condicions de cultiu. Botsford (1981) ha indicat que la concentració d'AMPc és perfectament comparable en soques salvatges i en els mutants *cpd* (incapaços de degradar l'AMPc per absència de l'AMPc fosfodiesterasa) en cultius de *Salmonella typhimurium*, mentre que en aquests mateixos mutants d'*E. coli* s'acumula fins a concentracions realment elevades (Alper i Ames, 1973). De tot això tant sols es pot deduir que la importància de la degradació de l'AMPc és encara poc coneguda i queda molt per fer; no existeixen proves experimentals clares que expliquin les diferències dels nivells intracel·lulars d'AMPc quan el bacteri creix amb fonts de carboni diferents.

El tercer punt on es pot trobar el nus principal de la regulació del nivell d'AMPc en la cèl·lula és l'estudi de l'activitat adenilciclasa. L'estructura d'aquest enzim és poc coneguda, a l'igual que la del seu homònim eucariòtic. En experiments portats a terme per Tao i Lipmann (1969) es va suggerir que aquest enzim estava associat a la membrana citoplasmàtica, però Yang i col·laboradors (1979) han purificat la adenilat ciclasa d'*E. coli* de la fracció soluble d'homogeneïtzats cel·lulars. No es coneix la seva estructura terciària però està demostrat que el seu substracte és l'ATP; en aquest moment està en discussió si el GTP també pot ésser substracte de l'enzim (Shibuya *et al.*, 1977).

Sembla que existeix una regulació depenent de la proteïna CRP sobre la funció adenilciclasa (Majerfeld *et al.*, 1981) a nivell de l'expressió gènica i, indirectament, mitjançant l'activitat enzimàtica. Existeixen evidències experimentals que indiquen que aquesta regulació, en part, es porta a terme en la transcripció o traducció de la mateixa adenilciclasa o, de ser un polímer, en alguna de les subunitats reguladores. Aquests mateixos autors han suggerit que la proteïna CRP podria actuar com a repressor de *cya*. En aquest sentit s'ha aïllat un mutant de regulació de l'adenilciclasa, *cyaR1*; aquesta mutació és recessiva i resulta eliminada per mutacions existents en el gen *crp*. A més, aquesta darrera mutació permet la no repressió d'operons en soques on s'ha delecionat el gen *cya*. Aquests resultats estarien d'acord amb un sistema regulador realment complicat on podria existir, per exemple, una subunitat reguladora (activadora) de l'adenilciclasa que estaria controlada per la proteïna CRP. També és possible que la proteïna CRP pugui formar per si mateixa part d'un complex regulador que afectaria directament l'activitat de la ciclasa, així com que exerciria un control negatiu sobre l'expressió de l'enzim.

Amb tot això veiem que cap dels mecanismes proposats pot explicar per si mateix la regulació del nivell d'AMPc intracel·lular. L'activitat fos-

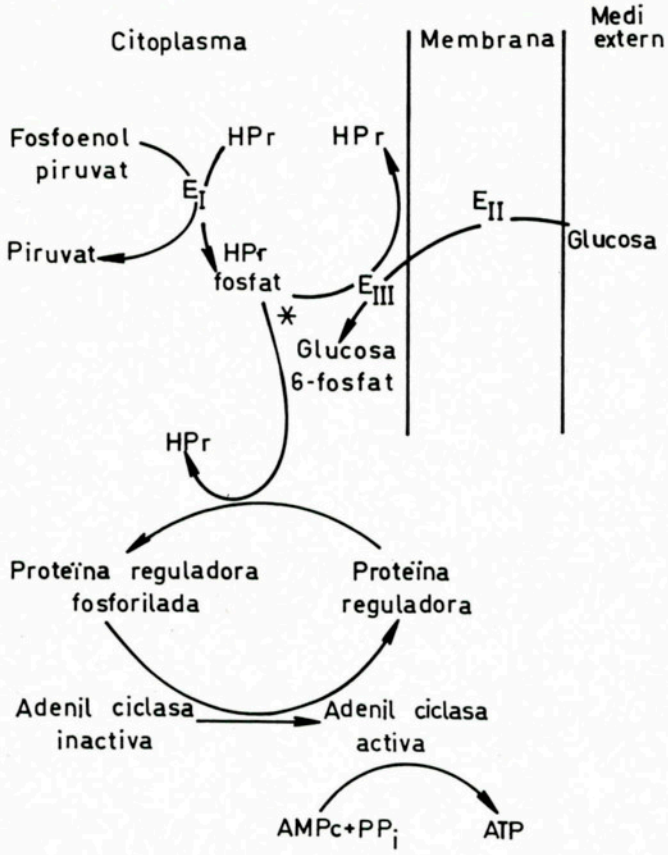


FIG. 4. — *Model per a la regulació de la síntesi d'AMPc via la regulació de l'activitat adenil ciclasa.* En el punt (*) existeix una competència entre la glucosa i la proteïna reguladora pel grup fosfat de la proteïna HPr-fosfat. Així, en presència de glucosa en el medi de cultiu, les molècules de HPr-fosfat es dedicaran a fosforilar la glucosa per acció de l'enzima EIII, per tal d'introduir el sucre en el citoplasma en forma fosforilada, resultant disminuït el nombre de molècules de proteïna reguladora fosforilada, de forma que no es pot activar l'adenilat ciclasa i no hi ha síntesi d'AMPc.

fodiesterasa no és massa important «in vitro» a *E. coli;* al mateix temps, sembla que l'excreció no varia de forma important segons la font de carboni (Dills *et al.*, 1980). Per conseqüent, l'única possibilitat que queda és la modulació de l'activitat adenilat ciclasa en funció de la font de carboni. Sembla que aquesta regulació està relacionada amb el sistema de transport actiu i participa en el sistema d'exclusió de l'inductor.

La major part de productes energètics són transportats a l'interior de la cèl·lula en forma de derivats fosforilats a expenses del fosfoenolpiruvat (PEP) (fig. 4). Aquesta fosforilació dels sucres ve produïda per una

cadena de reaccions fosforilatives. Així, el PEP fosforila una proteïna citoplasmàtica, l'enzim I, el qual fosforilarà després un residu histidina d'una proteïna estable a la calor i de baix pes molecular (Hpr); aquestes dues etapes no són específiques per a cap tipus de substracte. L'enzim I i la proteïna Hpr estan codificats pels gens *ptsI* i *ptsH*, que formen l'operó *ptsHI*. Aquest operó depèn per a la seva correcta expressió del complex AMPc-CRP (Rephaeli i Saier, 1976). El que la cèl·lula sigui permeable a un sucre específic requereix també la presència d'una o vàries proteïnes de membrana que actuïn com a transportadors (l'enzim II i, en certes condicions, l'enzim III). La síntesi de l'enzim II es troba sota un control positiu per part del complex AMPc-CRP (Jacobson *et al.*, 1979). Així, en el cas de la glucosa, manosa i fructosa, participen dos components de la membrana: un enzim II específic per a cada sucre i l'enzim III. Aquest darrer enzim és fosforilat per la proteïna Hpr amb un fosfat en forma d'enllaç ric en energia, i així pot realitzar la fosforilació del sucre portat per l'enzim II. Sembla que l'enzim III per a la glucosa (III^{glu}) participa en el control de l'adenilat ciclasa. Peterkofsky i col·laboradors (1978) varen postular que l'enzim I actuaria directament sobre l'adenilat ciclasa. Sembla que aquesta hipòtesi no és del tot correcta, ja que mutants termosensibles de l'enzim I no mostren canvis en el nivell d'AMPc segons la temperatura (Dahl *et al.*, 1974). És més, poden trobar-se canvis en els nivells d'AMPc en soques que presenten delecions en el gen estructural que codifica l'enzim I (Yang *et al.*, 1979). Amb tot això, Saier (1977) va postular que l'adenilat ciclasa seria activada per un factor hipotètic, Rpr, que resultava fosforilat pel sistema PTS-HI. Però sembla difícil acoblar totes aquestes hipòtesis amb les observacions de Postma i col·laboradors (1981) que han suggerit que, de fet, l'enzim III^{glu} no fosforilat podria actuar com a un inhibidor de l'activitat ciclasa. Així, es pensa que aquest enzim, en situació no fosforilada, inhibiria una sèrie de transports no-PTS com són els de la maltosa, glicerol i melibiosa (Saier i Roseman, 1976) però no els intermediaris dels cicles de l'àcid tricarboxílic o de les pentoses.

Un sistema regulador com aquest, amb un control positiu i negatiu de l'activitat ciclasa (portat a terme per l'enzim III^{glu}-P i III^{glu}) i que és formalment equivalent al de Peterkofsky (1981) (que implica la intervenció de l'enzim I en forma fosforilada o no), pot semblar acceptable en un principi. Per desgràcia, encara queden moltes qüestions per resoldre; en aquest sentit, Shulgina i col·laboradors (1979) han demostrat que mutacions específiques en el gen de l'enzim II^{glu} deixen de manifestar l'efecte glucosa i presenten concentracions d'AMPc entre 3 i 5 cops més elevades que el control.

És per tant indispensable fer molts més experiments amb soques comparables, ja que, al tractar-se d'un sistema de regulació global del

metabolisme, les diferències concretes entre les soques poden tenir molta importància a l'hora de fer comparables els resultats.

Des que es va descobrir l'adenilat ciclasa no s'han pogut realitzar molts experiments bioquímics; malauradament, l'enzim semipurificat és molt làbil, de forma que presenta unes activitats molt minvades amb comparació amb els experiments «in vivo» (Majerfeld *et al.*, 1981). El millor sistema es basa en la utilització de cèl·lules toluenitzades (Harwood i Peterkofsky, 1975): les cèl·lules així tractades mantenen la sensibilitat a l'inhibició causada per l'efecte glucosa, el qual constitueix una bona base per a estudiar els nivells cel·lulars d'adenilat ciclasa. És evident que les cèl·lules toluenitzades donaran resultats diferents als reals car presenten modificacions estructurals en l'envolta bacteriana. Els resultats dels nivells d'AMPc varien molt segons si són cèl·lules permeabilitzades o no (per un factor de 10 o 100).

Anteriorment hem descrit que tant la proteïna CRP com la PTS poden participar en la regulació de l'adenilat ciclasa, però les observacions realitzades en cèl·lules toluenitzades indiquen que la membrana ha d'estar en perfectes condicions per a portar a bon terme una regulació «correcta». Aquest fenomen pot estar relacionat amb el potencial electroquímic d'una membrana completa (Peterkofsky i Gazdar, 1979). És a dir, que si bé l'adenilat ciclasa sembla no estar relacionada directament amb la membrana, formaria part d'un complex regulador altament sensible a la situació energètica de la membrana, així com les altres molècules reguladores (CRP, ppGpp, GTP, etc.).

Finalment, la síntesi de la(les) subunitat(s) de l'adenilat ciclasa pot ésser sensible a un fenomen de repressió que pot sobreposar-se a les nombroses regulacions parcials de la seva activitat.

Relacions entre el tetrafosfat de guanosina i l'AMP cíclic

L'AMPc i el 3',5'-bis-pirofosfat de guanosina (ppGpp) són dos nucleòtids que resulten difícils de trobar junts en els estudis sobre processos de regulació. Ambdós nucleòtids acostumen a presentar una relació de proporcionalitat inversa a la velocitat de creixement. Tots dos incrementen llur concentració cel·lular quan o bé s'esgota la glucosa del medi d'un cultiu que s'està fent crèixer amb aquesta font de carboni o bé les cèl·lules són transferides a un medi amb una font de carboni més pobra.

L'eliminació de qualsevol tipus de catabolit origina un increment en la concentració cel·lular d'AMPc i ppGpp. Tot i això, l'absència d'algun aminoàcid en el medi de creixement determina que només s'incrementi

el nivell de ppGpp i que el de l'AMPc es mantingui normal, mentre existeixi prou carboni en el medi.

Tal com l'AMPc, el ppGpp també afecta la transcripció. L'addició d'ambdós nucleòtids a cèl·lules permeabilitzades estimula, per exemple, la inducció de β-galactosidasa i triptofanasa (el ppGpp pot ésser substituït per ppApp o pppGpp). L'addició de ppGpp o ppApp no compensa l'efecte de la mutació en *cya*, indicant que l'efecte de qualsevol bis-pirofostat de purina és independent de la funció de l'AMPc. No es coneix si el ppGpp actua mitjançant una proteïna receptora que interaccionaria o bé amb l'ADN o bé directament sobre l'ARN polimerasa.

L'acumulació de ppGpp es veu afectada en soques que tenen la mutació *relA*, donat que ha estat descrit que aquesta mutació també afecta el nivell d'AMPc (Braedt i Gallant, 1976); no obstant això, el nivell relatiu causa-efecte és superior sobre el ppGpp que sobre l'AMPc, el qual pot ésser una resposta colateral. En aquestes soques *relA*, l'addició d'AMPc pot fer recuperar al sistema regulador, apareixent així el resultat contradictori que l'AMPc podria substituir l'activitat del ppGpp.

Altres funcions regulades per l'AMP cíclic

A part del paper ben conegut de l'AMPc i de la proteïna CRP en la iniciació de la transcripció d'operons catabòlics, sembla que el complex AMPc-CRP participa en la regulació d'un gran nombre de funcions cel·lulars (taules 2 i 3).

Cal fer especial esment del paral·lelisme existent entre la cinètica de creixement i la inducció de profags a *S. typhimurium*. Aquesta relació pot ésser explicada en funció de l'evolució de la concentració intracel·lular d'AMPc i de la funcionalitat de la maquinària de biosíntesi de la cèl·lula i del bacteriòfag al llarg del cicle cel·lular. Així, s'ha vist que els mutants *cya* o *crp* de *S. typhimurium* mostren una resposta preferentment lítica en front de la infecció de bacteriòfags atenuats (Hong *et al.*, 1971; Rao i Sundar Raj, 1973); aquest fenomen també es produeix a *E. coli* amb el bacteriòfag Lambda.

Globalment, i en forma necessàriament resumida, podríem dir que la regulació del sistema bacteri-bacteriòfag atenuat s'inicia immediatament després de la injecció de l'ADN fàgic, moment en el que comença la síntesi de la proteïna repressora del cicle lític (producte del gen *cI*) així com del producte del gen *cro*, que té per funció impedir la síntesi del dit repressor portant la infecció cap al cicle lític. És evident, per tant, que la producció o no d'un cicle lític dependrà del nivell intracel·lular de les proteïnes Cro i cI (realment, en lloc de la proteïna cI, qui participa en l'equilibri decisiu amb la proteïna Cro és la proteïna N, que

TAULA 2. — Enzims que tenen l'expressió regulada per l'AMPc en coliforms.[a]

Enzim	Referència
Adenosina trifosfatasa	Dills i Dobrogosz, 1977
Dehidrogenasa fòrmica	Patrick i Dobrogosz, 1973
Citocroms	Broman *et al.*, 1974
Isocitrat liasa	Takahashi, 1975
Succinat deshidrogenasa	Dills i Dobrogosz, 1977
Timidina fosforilasa	De Crombugghe *et al.*, 1970
NAD transhidrogenasa	Dills i Dobrogosz, 1977

a No s'indiquen les proteïnes codificades pels operons catabòlics, donat que totes elles venen regulades per l'AMPc (operons lactosa, galactosa, arabinosa, etc.).

TAULA 3. — Funcions cel·lulars regulades per l'AMPc en coliforms.

Regulació de la peroxidasa i catalasa.
Quimiorecepció.
Quimiotaxi.
Degradació d'àcids grassos.
Inhibició de la respiració depenent del gen *recA*.
Fluidesa de la membrana
Catabolisme de les pirimidines.
Composició proteica de la membrana.
Regulació del sistema histidasa.
Biodegradación de la treonina.
Regulació de l'activitat GMP reductasa.
Sistema luciferasa.
Síntesi de glucogen.
Excreció de glutamat.
Utilització de manitol.
Síntesi del repressor fàgic en cèl·lules lisogèniques.
Fosforilació oxidativa.
Activitat de l'enzim ADN girasa.
Sensibilitat als detergents.
Sensibilitat als antibiòtics: cloramfenicol, ampicil·lina, fosfomicina, estreptomicina i penicil·lina.
Replicació d'alguns plasmidis.

és responsable de l'activació de la transcripció del gen cIII, el qual producte activa la síntesi del repressor cI).

Donat que en els mutants *cya* i *crp* existeix una entrada en cicle lític superior a la que existeix en els caràcters salvatges, és evident que la síntesi de cI ha de dependre del nivell del complex AMPc-CRP i que la inducció de profags es donarà en aquelles cèl·lules on s'hagi produït un

descens important en la concentració interna de repressors (Melechen *et al.*, 1978).

També és important indicar que els mutants *cya* o *crp* presenten una àmplia distorsió en diferents funcions metabòliques per les quals són necessàries les activitats per ells coordinades. Així, molts mutants *crp* d'*E. coli* presenten morfologies ovalades o en forma de coc, fet que pot atribuir-se a la imposibilitat que tenen moltes d'aquestes soques per a sintetitzar proteïnes associades a la membrana externa i al glucopèptid, o bé proteïnes transportadores de diferents substractes metabolitzables, el qual genera una alteració en la paret cel·lular. Treballs portats a terme en el nostre laboratori mostren que mutants Mal⁻ (incapaços de metabolitzar la maltosa), presenten una morfologia ovalada i un volum cel·lular prop del doble de la soca salvatge, car aquesta proteïna és necessària per al manteniment de la morfologia cel·lular. Així, en els mutants *crp* no és possible l'existència de la proteïna transportadora de la maltosa, degut al fet que la síntesi d'eixa proteïna està controllada pel nivell d'AMPc i necessita de la intervenció del complex AMPc-CRP, la qual cosa determinarà evidentment un canvi permanent en la morfologia dels dits mutants, que serà responsable de la major sensibilitat d'aquests mutants als detergents; d'aquesta mateixa forma pot explicar-se la resistència a alguns bacteriòfags o colicines, ja que els bacteris no tindrien els receptors necessaris (Kumar, 1976), donat que aquests receptors no són sintetitzats en una cèl·lula que no sigui capaç de superar aquesta repressió.

El complex AMPc-CRP participa en la regulació de l'expressió d'algunes funcions del sistema de reparació d'emergència o sistema de reparació SOS (Swenson *et al.*, 1978). Aquest sistema s'expressa quan es tracten cultius d'*E. coli* per agents físics o productes químics (radiació ultraviolada, mitomicina C, bleomicina, carència de timina, etc.) que alteren l'estructura normal de l'ADN i que originen l'aturament de la replicació de l'ADN. Aquest sistema comprèn una sèrie de fenòmens: inhibició de la divisió cel·lular, inducció de profags, inhibició de la respiració, inducció de la síntesi de la proteïna RecA i activació d'una sèrie de mecanismes de reparació del propi ADN (Witkin, 1976) així com d'ADN extern lesionat que sigui introduït dins el bacteri; també s'indueixen fenòmens de mutagènesi lligats als sistemes de reparació. Totes aquestes funcions depenen de la normal expressió dels gens *recA* i *lexA*, de forma que els mutants en algun d'aquests dos gens, juntament amb una elevada sensibilitat als agents mutagènics, no experimenten les respostes suara esmentades. A més, els mutants RecA⁻ pateixen d'una disminució dràstica de llur capacitat recombinatòria, on juga un paper molt important aquesta proteïna. Ha estat indicat que per a una normal expressió de la inhibició de la respiració després d'irradiació amb llum

ultraviolada, és necessària l'acció del complex AMPc-CRP (Swenson *et al.*, 1977). Tanmateix treballs realitzats en el nostre laboratori han mostrat disminucions en el nivell d'ATP després de la irradiació i, per tant, és difícil afirmar categòricament si l'expressió de les funcions SOS depèn directament del nivell d'AMPc o bé de la disminució del nivell d'ATP, substracte sobre el que actuarà l'adenilat ciclasa per a donar lloc a l'AMPc.

Altres nucleòtids cíclics

El GMP cíclic (GMPc) es troba també en cèl·lules de mamífer i participa en moltes funcions reguladores. Pot competir amb l'AMPc per l'enzim fosfocíclic diesterasa, i l'addició de GMPc incrementa el nivell d'AMPc intracel·lular, però no es coneix si és per competència amb l'enzim abans citat o és degut a un altre motiu de tipus regulatori. La concentració interna de GMPc és molt més petita que la que presenta el nucleòtid cíclic d'adenosina; en certes condicions, les concentracions intracel·lulars de GMPc poden variar, però el significat d'aquests canvis roman desconegut.

González i Peterkovsky (1975), amb mètodes immunoenzimàtics, varen comparar els nivells d'AMPc i GMPc a *E. coli*, i no varen trobar cap tipus de relació entre les concentracions d'ambdós nucleòtids cíclics.

La concentració de GMPc a *E. coli* és molt petita: 1,8 molècules per cèl·lula (Cook *et al.*, 1980); així, s'ha arribat a suggerir que tant sols es tracta d'un artefacte experimental (Shibuya *et al.*, 1977). El GMPc pot ésser format també per l'adenilat ciclasa, i les mateixes mutacions en *cya* i en *crp* poden afectar la síntesi de GMPc. Tot i això, Macchia i col·laboradors (1975) han aconseguit purificar l'enzim guanilat ciclasa d'*E. coli*. Aquest enzim no és actiu sobre l'ATP per a donar AMPc i es troba en la fracció soluble de la cèl·lula. S'ha descrit que els bacteris, en trobar-se en contacte amb un quimioatraient, augmenten en un 75 % llur contingut en GMPc (Black *et al.*, 1980). Aquests autors han suggerit que el GMPc podria servir de missatger químic entre els components cel·lulars sensibles als atraients (o als repel·lents) i el mecanisme responsable del moviment flagel·lar. D'aquesta forma pretenen explicar les concentracions tan baixes de GMPc, el qual es trobaria tan sols en la zona d'inserció dels flagels a l'envolta bacteriana. Un cop s'hauria donat la resposta quimiotàctica (o bé mentre es dóna la resposta), s'excretaria el GMPc al medi, de forma que la cèl·lula quedaria preparada per a una nova resposta quimiotàctica.

A part del GMPc, també s'ha trobat UMP cíclic (UMPc) i CMP cíclic (CMPc) en cultius de *Corynebacterium murisepticum* i *Micrococcus* spp.

(Ishiyama, 1975; 1976). Tot i això, no es coneixen les seves funcions i, en tots els casos, existeixen concentracions molt més elevades d'AMPc.

L'AMP CÍCLIC EN ALTRES BACTERIS DIFERENTS DELS ENTEROBACTERIS

És clar que no tant sols s'ha investigat l'AMPc com a molècula reguladora a *E. coli* i *S. typhimurium* sinó també a moltes d'altres espècies. S'ha estudiat «per se» o bé s'ha analitzat el seu efecte sobre l'expressió de diferents funcions metabòliques. Hom coneix en algunes espècies la seva presència o absència, en alguns casos es coneix la seva concentració, i en molt poques ocasions el seu efecte fisiològic. En alguns organismes s'ha estudiat l'activitat adenilat ciclasa i AMPc fosfodiesterasa. En la taula 4 es mostren uns exemples de diferents microorganismes amb les funcions fisiològiques que semblen ésser regulades pel nucleòtid.

Arthrobacter crystallopoietes creix en forma de cocobacil quan es troba en fase exponencial, prenent forma de coc en entrar en fase estacionària. Quan creix amb glucosa com a font de carboni ho fa lentament i en forma cocal; en afegir-hi succinat o algun aminoàcid concret, es converteix ràpidament en un cocobacil i augmenta la seva velocitat de creixement. Un cop s'esgota la font de carboni reprèn la forma esfèrica. L'acció de l'AMPc inhibeix eixa transició (Hamilton *et al.*, 1977), demostrant també que els mutants incapaços de formar cocobacils presenten nivells molt baixos d'AMPc.

Així mateix, s'ha analitzat la presència d'AMPc a *Bacillus*, però no s'ha trobat en cap espècie de les estudiades: *B. megaterium*, *B. licheni-*

TAULA 4. — Processos independents de l'expressió d'operons catabòlics regulats per l'AMP cíclic.

Bacteri	Efectes
Arthrobacter crystallopoietes	Modificacions de la forma.
Cdulobacter crescentus	Divisió.
Streptomyces hygroscopicus	Esporulació, síntesi d'antibiòtics.
Neocardia spp.	Metabolisme d'acetat.
Rhodopseudomonas capsulata	Creixement en aerobiosi.
Escherichia coli	Assimilació de l'amoni.
Azotobacter vinelandii	Modificacions morfològiques en la fixació de nitrogen (sistema nitrogenasa).
Rhizobium japonicum	Sistema nitrogenasa.
Alcaligenes eutrophicus	Sistema hidrogenasa.
Benekea harveyi	Sistema luminiscent.
Bordetella pertussis	Sistema calmodulina.
Erwinia carotovora	Enzim degradador de pectines.
Mycoplasma spp.	Transport d'hexoses.
Vibrio cholerae	Moviment.

formis i *B. brevis*. Precisament, i en concordància amb això, hem demostrat en el nostre laboratori que *B. subtilis* no presenta AMPc per sobre del nivell de detecció (2,5 nM), encara que el seu metabolisme està subjecte a repressió per catabolit. Pot ésser que en aquesta espècie les funcions metabòliques vinguin regulades pel nivell de GMPc intracel·lular. En aquest sentit, s'ha analitzat l'efecte del GMPc en els processos d'esporulació a *B. megaterium* (Saier *et al.*, 1978); la concentració de GMPc s'incrementa a mida que germinen les espores, i disminueix en la darrera part de la fase estacionària. Ara bé, no és coneix si la variació de GMPc és conseqüència d'aquests processos o bé és el senyal inductor. És clar que el baix nombre de molècules de GMPc per cèl·lula fa difícil estudiar aquests processos.

Caulobacter crescentus és un bacteri pedunculat que es divideix per fissió binària diferencial: dóna una cèl·lula lliure flagel·lada i una de fixa pedunculada. En aquesta espècie s'ha aïllat AMPc i GMPc; mentre l'addició del segon impideix la formació de la cèl·lula filla flagel·lada, la posterior addició d'AMPc restaura aquest procés a la normalitat. S'ha suggerit que l'acció és indirecta, ja que el nivell d'AMPc no varia més del 25 % durant aquestes modificacions (Kurn *et al.*, 1977; 1978).

En els mixobacteris, especialment a *Myxococcus xanthus*, s'ha vist que tant l'AMPc com l'AMP estimulen la formació de cossos fructífers, mentre que l'addició de GMPc produeix l'efecte contrari (Campos i Zusman, 1975).

A *Streptomyces hygroscopicus* els nivells d'AMPc s'incrementen en unes 100 vegades a mida que les espores germinen (Gersch *et al.*, 1978). Així mateix inhibeix la síntesi d'antibiòtics, mentre que el GMPc actua de forma contrària.

Les espècies del gènere *Nocardia* són similars als estreptomicets en alguns aspectes, però no formen espores. El fumarat afegit al medi inhibeix la inducció de la isocitrat liasa quan es fa crèixer el bacteri amb acetat com a font de carboni; aquest efecte del fumarat és contrarestat per l'addició d'AMPc (Westwood i Higgins, 1976).

Un fenomen biològic realment interessant és la fotosíntesi bacteriana; està relativament ben coneguda i en el nostre laboratori s'estan estudiant els factors que regulen la síntesi de carotens i bacteriocloro-fil·les. Per tècniques de ràdio-immunoassaig hem demostrat que en *Rhodopseudomonas capsulata* hi ha AMPc quan es cultiva en aerobiosi, però careix del nucleòtid quan es fa crèixer anaeròbicament i en condicions fotosintètiques. Això ens ha portat a analitzar els nivells d'AMPc durant tota la dinàmica de creixement en bacteris fotosintètics estrictes (*Chromatium* i *Thiocapsa*), que són incapaços de crèixer en aerobiosi: en ambdós casos no es detecta AMPc per sobre de 2,5 nM. Tots aquests resultats suggereixen que el metabolisme de sucres en forma heterotròfica

ve regulat per l'AMPc, mentre que el metabolisme autotròfic fotosintètic no utilitza l'AMPc com a rgulador.

La fixació de nitrogen és un procés altament energètic. S'ha demostrat que l'AMPc influencia la síntesi d'alguns enzims relacionats amb l'assimilació de l'amoni a *E. coli* (Prusiner *et al.*, 1972). Molts dels bacteris fixadors de nitrogen són dimòrfics: *Rhizobium* spp. canvia a bacteroids un cop s'ha format el nòdul radical; *Azotobacter* spp. pot formar cists; *Clostridium*, esporula; i els cianobacteris poden presentar moltes variacions morfològiques. Ja s'ha vist que la major part de variacions morfològiques relacionades amb processos catabòlics estan relacionades amb l'AMPc. Així, encara que no s'ha indicat cap efecte sobre la formació de cists a *Azotobacter vinelandii*, ha estat assenyalat que produeix la desrepressió del sistema de la nitrogenasa (Lepo i Wyss, 1974). A *Rhizobium japonicum*, l'AMPc reprimeix la formació de tres enzims relacionats amb la fixació de nitrogen. S'ha proposat que els nivells d'AMPc varien en resposta a la possibilitat d'utilitzar una bona font de carboni. El GMP també participa en la regulació del complex nitrogenasa produint la seva inhibició. Sembla ésser que els nivells de GMPc responen a l'activitat del sistema de transport d'electrons.

Com a cloenda podríem dir que la major part d'espècies bacterianes presenten AMPc, però que no s'ha aconseguit demostrar la seva existència en algunes. Ja hem comentat el problema de les espècies del gènere *Bacillus*. Tampoc s'ha detectat a *Bacteroides fragilis*, que és un anaerobi estricte (Hylemon i Phibbs, 1974). En el cas de *Lactobacillus plantarum*, l'addició del nucleòtid no afecta l'expressió dels operons arabinosa i galactosa. Per una altra part, hem vist que el creixement per metabolisme fotosintètic no usa l'AMPc com a regulador al llarg del cicle cel·lular.

En conseqüència, la importància de l'AMP cíclic per a la regulació de les diferents funcions metabòliques i fisiològiques ha quedat palesa arreu del món bacterià. Evidentment, queden moltes respostes per trobar; fins ara s'han investigat els microorganismes en quant a llurs mecanismes concrets (és a dir, estudiant vies metabòliques determinades), però són molt pocs els estudis portats a terme prenent-los com a un tot, car és evident que els microorganismes no són la suma directa d'una sèrie de vies metabòliques i de respostes fisiològiques sense cap relació entre elles, sinó que constitueixen uns complexos funcionals on es relacionen tot el metabolisme i la fisiologia cel·lulars amb cooperacions sinergístiques i antagonístiques en front de les fluctuacions de l'ambient. Sens dubte, una molècula del tipus de l'AMP cíclic podria ésser el senyal idoni per a coordinar la resposta de «tota» la cèl·lula en front de les variacions del medi extern.

BIBLIOGRAFIA

ALPER, M. D. i B. N. AMES. — *Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate phosphodiesterase mutants of* Salmonella typhimurium. «J. Bacteriol.», *122*, 1081-1090 (1973).

BLACK, R. A., A. C. HOBSON i J. ADLER. — *Involvement of cyclic GMP in intracellular signalling in the chemotactic response of* Escherichia coli. «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», *77*, 4879-3883 (1980).

BOTSFORD, J. L. — *Metabolism of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and induction of tryptophanase in* Escherichia coli. «J. Bacteriol.», *124*, 380-390 (1975).

BOTSFORD, J. L. — *Cyclic nucleotides in procaryotes.* «Microbiol. Rev.», *45*, 620-642 (1981).

BRAEDT, G. i J. GALLANT. — *Role of the* rel *gene product in control of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate accumulation.* «J. Bacteriol.», *129*, 564-566 (1976).

BROMAN, R. L., W. J. DOBROGOSZ i D. C. WHITE. — *Stimulation of cytocrome synthesis in* E. coli *by cyclic AMP.* «Arch. Biochem. Biophys., *162*, 595-604 (1974).

CAMPOS, J. M. i D. R. ZUSMAN. — *Regulation and development in* Myxococcus xanthus: *effect of 3',5'-cyclic AMP, AMP, ADP and nutrition.* «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», *72*, 518-522 (1975).

COOK, W. R., V. F. KALB, A. A. PEACE i R. W. BERNLOHR. — *Is cyclic guanosine 3',5'-monophosphate a cell cycle regulator?* «J. Bacteriol.», *141*, 1450-1453 (1980).

DAHL, R., H. G. MORSE i M. L. MORSE. — *Carbohydrate transport and cyclic 3',5'-adenosine monophosphate (cAMP) levels in a temperature sensitive phosphotransferase mutants of* Escherichia coli. «Molec. Gen. Genet.», *129*, 1-10 (1974).

DE CROMBRUGGHE, B., H. E. VARMUS, R. L. PERLMAN i I. PASTAN. — *Stimulation of* lac *mRNA synthesis by cyclic AMP in cell-free extracts of* Escherichia coli. «Biochem. Biophys. Res. Commun.», *58*, 894-901 (1970).

DE ROBERTIS, E. M., N. D. JUDEWIEZ i H. N. TORRES. — *On the control mechanisms of bacterial growth by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate.* «Biochem. Biophys. Res. Commun.», *55*, 758-764 (1973).

DESSEIN, A., F. TILLIER i A. ULLMANN. — *Catabolite modulator factor: Physiological properties and* in vivo *effects.* «Molec. Gen. Genet.», *162*, 89-94 (1978).

DILLS, S. A., A. APPERSON, M. R. SCHMIDT i M. J. SAIER, Jr. — *Carbohydrate transport in bacteria.* «Microbiol. Rev.», 44, 385-418 (1980).

DILLS, S. S. i W J. DOBROGOSZ. — *Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate regulation of membrane energetics in* Escherichia coli. «J. Bacteriol.», *131*, 854-865 (1977).

EPSTEIN, W. L., L. B. ROTHMAN-DENES i J. HESSE. — *Adenosine 3',5' cyclic monophosphate as mediator of catabolite repression in* E. coli. «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», *72*, 2300-2304 (1975).

FRASER, A. D. E i H. YAMAZAKI. — *Effect of carbon sources on the rates of cyclic AMP synthesis and degradation and the ability to produce β-galactosidase in* Escherichia coli. «Can. J. Biochem.», *57*, 1073-1079 (1979).

GERSCH, D., W. ROMER, H. BOCKER i H. THRUM. — *Variation in cyclic 3',5'-adenosine monophosphate and cyclic 3',5'-guanosine monophosphate in antibiotic producing strains of* Streptomyces hygroscopicus. «FEMS Microbiol. Lett.», *3*, 39-41 (1978).

GILBERT, W., A. MAYAM i A. MIRZABEKOV. — *Contacts between the* lac *repressor and DNA revealed by methylation.* A *Control of ribosome synthesis.* N. KJELDGAARD i O. MAALOE, eds. Munksgaard, pp. 139-144 (1976).

GONZÁLEZ, J. E. i A. PETERKOFSKY. — *Diverse directional changes in cGMP relative to cAMP in* E. coli. «Biochem. Biophys. Res. Commun.» *67*, 190-197 (1975).

HARWOOD, J. P. i A. PETERKOFSKY. — *Glucose-sensitive adenylate cyclase in toluene-treated cells of* Escherichia coli B. «J. Biol. Chem.», *250*, 4656-4662 (1975).

HONG, J. S., G. R. SMITH i B. N. AMES. — cAMP *concentration in the bacterial host regulates the viral decision between lisogeny and lysis.* «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», *68*, 2258-2262 (1971).

HYLEMON, P. B. i P. V. PHIBBS, Jr. — *Evidence against the presence of cyclic AMP related enzymes in selected strains of* Bacteroides fragilis. «Biochem. Biophys. Res. Commun.», *60*, 88-95 (1974).

ISHIYAMA, J. — *Isolation of cyclyc 3',5'-guanosine monophosphate from bacterial culture fluids.* «Amino Acid Nucleic Acid.», *32*, 87-88 (1975).

ISHIYAMA, J. — *Isolation of 3',5'-pyrimidine mononucleotides from bacterial culture fluids.* «Biochem. Biophys. Res. Commun.», *65*, 286-292 (1976).

JACOB, F. i J. MONOD. — *On the regulation of gene activity.* «Cold Spring Habor Symp. Quant. Biol.», *26*, 193-211 (1961).

JACOBSON, G. R., C. A. LEE i M. H. SAIER, Jr. — *Purification of the mannitol-specific enzyme II of the* Escherichia coli *phosphoenol pyruvate sugar phosphotransferase system.* «J. Biol. Chem.», *254*, 249-252 (1979).

KLINE, E. L., C. S. BROWN, V. BANKAITIS, D. C. MONTEFIORI i K. CRIAG. — *Metabolite gene regulation of the L-arabinose operon in* Escherichia coli *with indoleacetic acid and other indole derivatives.* «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», *77*, 1768-1772 (1980).

KUMAR, S. — *Properties of adenyl cyclase and cyclic 3',5'-monophospate receptor protein-deficent mutants of* E. coli. «J. Bacteriol.», *125*, 545-555 (1976).

KURN, N., I. CONTRERAS i L. SHAPIRO. — *Galactose cutabolism in* Caulobacter crescentus. «J. Bacteriol.», *135*, 517-520 (1978).

KURN, N., L. SHAPIRO i N. AGABIAN. — *Effect of carbon source and the role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate on the* Caulobacter *cell cycle.* «J. Bacteriol.», *131*, 951-959 (1977).

LEPO, J. E. i O. WYSS. — *Derepression of nitrogenase in* Azotobacter. «Biochem. Biophys. Acta.», *60*, 76-80 (1974).

MACCHIA, V., S. VARRONE, H. WEISSBACH, D. L. MILLER i I. PASTAN. — *Guanylate cyclase in* Escherichia coli: *purification and properties.* «J. Biol. Chem.», *250*, 6214-6220 (1975).

MAJERFELD, I. H., D. MILLER, E. SPITZ i H. V. RICKENBERG. — *Regulation of the synthesis of adenylate cyclase in* Escherichia coli *by the cAMP-CAMP receptor protein complex.* «Molec. Gen. Genet.», *181*, 470-475 (1981).

McGINNIS, J. F. i K. PAIGEN. — *Site of catabolite inhibition of carbohidrate metabolism.* «J. Bacterol.», *114*, 885-887 (1973).

MELECHEN, N. E., G. Go i H. A. LOZERON. — *Effect of cI repressor on thymineless and spontaneous induction, specificity of Lambda RNA transcription.* «Molec. Gen. Genet.», *163*, 213-222 (1978).

PATRICK, J. M. i W. J. DOBROGOSZ. — *The effect of cyclic AMP on anaerobic growth of* E. coli. «Biochem Biophys. Res Commun.», *54*, 555-561 (1973).

PETERKOFSKY, A. — Escherichia coli *adenylate cyclase as a sensor of sugar transport function.* A: *Advances in cyclic Nucleotide Research. 14*, P. GREENGARD i G. A. ROBINSON eds. Raven Press, New York, pp. 35-63, (1981).

PETERKOFSKY, A. i C. GAZDAR. — Escherichia coli *adenylate cyclase complex: regulation by the proton electrochemical gradient.* «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», *76*, 1099-1103 (1979).

PETERKOFSKY, A., J. E. GONZÁLEZ i C. GAZDAR. — *The* Escherichia coli *adenylate cyclase complex. Regulation of enzyme I of the phosphoenol pryruvate: sugar phosphotransferase system.* «Arch. Biochem. Biophys.», *188*, 47-55 (1978).

POSTMA, P. W., A. SCHUITEM i C. KWA. — *Regulation of methyl-β-galactoside permease activity in* pts *and* crr *mutants of* Salmonella typhimurium. «Molec. Gen Genet.», *181*, 448-453 (1981).

PRUSINER, S., R. E. MILLER i R. C. VALENTINE. — *Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate control of the enzymes of glutamine metabolism in* Escherichia coli. «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», *69*, 2922-2926 (1972).

RAO, R. N. i C. V. SUNDAR RAJ. — Salmonella typhimurium *mutants affecting establishment of lysogeny.* «Molec. Gen Genet.», *125*, 119-123 (1973).

REPHAELI, A. W. i M. H. SAIER, Jr. — *Effects of* crp *mutations on adenosine 3',5'-monophosphate metabolism in* Salmonella typhimurium «J. Bacteriol.», *127*, 120-127 (1976).

SAIER, M. H. — *Bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase systems: structural, fuctional, and evolutionary interrelationships.* «Bacteriol. Rev.», 41, 856-871 (1977).

SAIER, M. H. i S. ROSEMAN. — *Sugar transport: inducer exclusion and regulation of*

the melibiose, maltose, glycerol, and lactose transport systems by the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. «J. Biol. Chem.», *251*, 6606-6615 (1976).

SAIER, M. H., M. R. SCHMIDT i H. LEIBOWITZ. — *Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate-dependent synthesis of fimbriae in* Salmonella typhimurium: *effect of* cya *and* crp *mutations.* «J. Bacteriol.», *134*, 356-360 (1978).

SHIBUYA, M., Y. TAKEBE i Y. KAZIORO. — *A posible involvement of* cya *gene in the synthesis of cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in* Escherichia coli. «Cell», *12*, 521-528 (1977).

SHULGINA, M. V., I Ya. KALACHEV i G. I. BOURD. — *The a-methylglucoside effect in adenylate cyclase activity and membrane energetization in* Escherichia coli *K-12.* «FEBS Letters», *103*, 238-240 (1979).

SWENSON, P. A., J. G. JOSHI i R. L. SCHENLEY. — *Regulation of cessation of respiration and killing by cyclic 3',5'-adenosine monophosphate and its receptor protein after far-ultraviolet irradiation of* E. coli. «Molec. Gen. Genet.», *159*, 125-130 (1978).

SWENSON. P. A., R. L. SCHENLEY i J. G. JOSHI. — *Role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate on cessation of respiration in UV-irradiated* E. coli. «J. Bacteriol.», *131*, 707-709 (1977).

TAKAHASHI, Y. — *Effect of glucose and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate on the synthesis of succinic dehydrogenase and isocitric lyase in* Escherichia coli. «J. Biochem.», *78*, 1097-1100 (1975).

TAO, M. i F. LIPMAN. — *Isolation of adenyl cyclase from* Escherichia coli. «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», *63*, 86-92 (1969).

TRAVERS, A. — *RNA polymerase specificity and the control of growth.* «Nature», *263*, 641-646 (1976).

WESTWOOD, A. W. i I. S. HIGGINGS. — *Effect of cyclic AMP on catabolite repression of isocitric lyase in* Nocardia salmonicolor. «J. Gen. Microbiol. *97*, 133-136 (1976).

WITKIN, E. M. — *Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repar in* E. coli. «Bacteriol. Rev.», *40*, 869-907 (1976).

YANG, J. K., R. W. BLOOM i W. EPSTEIN. — *Catabolite and transient represion of* Escherichia coli *do not require enzyme I of the phosphotransferase system.* «J. Bacteriol.», *138*, 275-279 (1979).