

29
2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSTGRADO DEL C.C.H.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

ESTUDIO DE LA REGULACION DE LA EXPRESION DEL GENE glnF
DE Escherichia coli UTILIZANDO FUSIONES DE SU PROMOTOR
CON LOS GENES ESTRUCTURALES DEL OPERON lac

tesis que para obtener el título

LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

presenta

IRENE BEATRIZ CASTAÑO NAVARRO

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

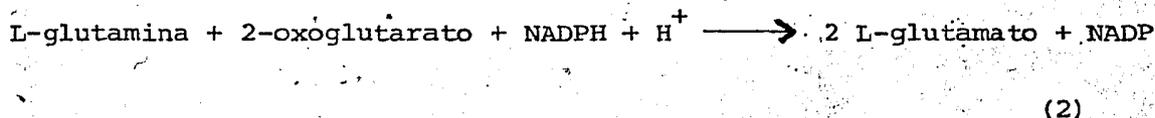
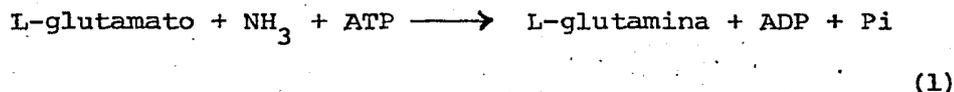
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

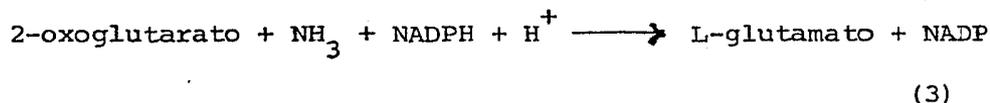
INTRODUCCION

Todos los organismos vivos necesitan incorporar nitrógeno en macromoléculas para crecer; para ello tienen mecanismos de asimilación de compuestos nitrogenados presentes en el medio, y vías biosintéticas que producen moléculas nitrogenadas celulares (1).

La fuente de nitrógeno preferida por E. coli y otras bacterias entéricas es el amonio; el cual, cuando se encuentra en concentraciones bajas (0.5 mM), se asimila principalmente utilizando las enzimas glutamino sintetasa (GS), y glutamato sintasa (GOGAT) consumiéndose una molécula de ATP, como se indica en las siguientes reacciones:



En condiciones de exceso de NH_4^+ (15 mM), éste se asimila a través de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH), cuya afinidad por NH_4^+ es baja, sin ocasionar gasto adicional de ATP (2):



En el glutamato y glutamina son compuestos muy importantes para las células, ya que virtualmente en todas ellas, son los donadores de nitrógeno para reacciones biosintéticas (1). Así el glutamato es el principal donador del grupo amino para la síntesis de algunos aminoáci-

dos, y la glutamina cede su grupo amido para la producción de purinas y pirimidinas, algunos otros aminoácidos y otros compuestos celulares importantes (1).

Así pues, cuando los microorganismos utilizan otras fuentes de nitrógeno tales como ciertos aminoácidos, también sintetizan glutamato y glutamina, ya sea por degradación de la fuente de nitrógeno correspondiente para dar amonio libre y posteriormente asimilarlo a través de GS y GOGAT, o por transaminación con 2-oxoglutarato, o bien utilización tanto del nitrógeno como del esqueleto de carbono de estos otros aminoácidos, para dar glutamato (2). En la Figura 1 se muestra esquemáticamente las vías para obtener L-glutamato y glutamina a partir de diferentes compuestos nitrogenados.

La única vía para sintetizar glutamina, es a través de la enzima GS, la cual está codificada por el gene glnA que en E. coli se encuentra situado en el minuto 86 del mapa cromosómico (3). La GS de E. coli, es un multímero de 600 000 daltones de peso molecular; compuesto por 12 subunidades iguales de aproximadamente 50 000 daltones cada una (4).

La actividad enzimática de la GS está regulada de varias formas:

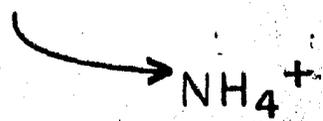
- a) uno de los mecanismos consiste en inhibición por retroalimentación negativa de algunos de los productos finales del metabolismo de glutamina como son CTP, AMP, histidina, triptofano, alanina, glicina serina, etc.
- b) interconversión de una forma activa (taut) a una inactiva (relajada) que depende de la concentración de cationes divalentes; en presencia de

OBTENCION DE AMONIO

Compuestos que cuando se desgradan dan amonio:

glucosamina

serina



GLUTAMINA

+

2.- oxoglutarato

OBTENCION DE GLUTAMATO

Compuestos cuyo esqueleto de carbono se utiliza para obtener glutamato.

histidina

prolina

arginina

L-GLUTAMATO

2.- oxoglutarato

+

alanina, leucina, aspartato, glutamina etc.

TRANSAMINACION
Aminoácidos que transaminan con 2-oxo glutarato para producir glutamato.

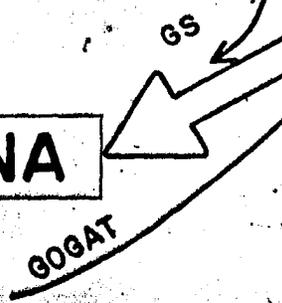


Fig. 1. Esquema de las vías metabólicas para obtener glutamato y glutamina a partir de diferentes compuestos nitrogenados.

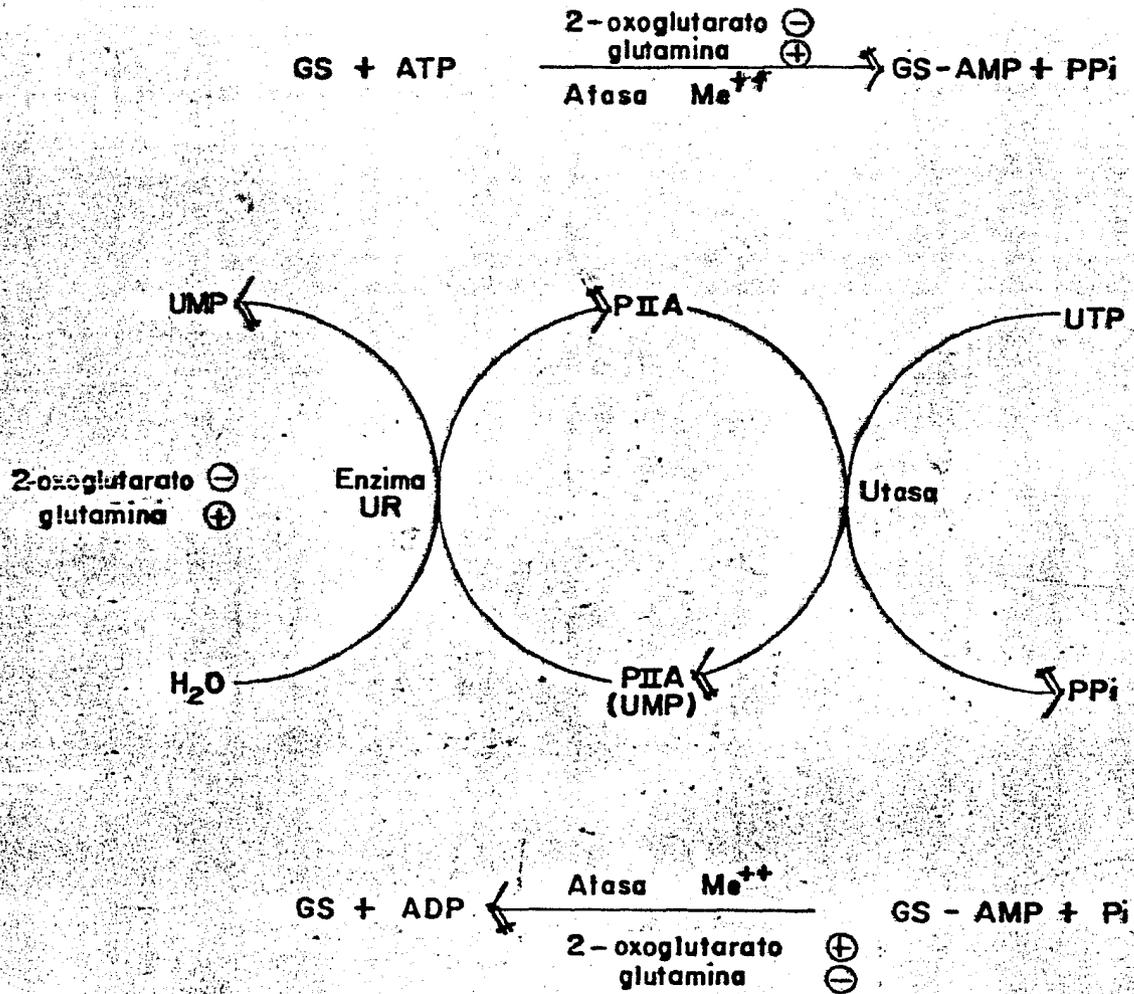
metabolitos quelantes se estimula la formación de GS relajada. c) Modificación covalente reversible por adenilación de un residuo tirosilo de cada subunidad. La mayor actividad enzimática se obtiene cuando la GS está totalmente desadenilada y va disminuyendo progresivamente a medida que aumenta el grado de adenilación (1,4).

El sistema de adenilación-desadenilación, es un complejo sistema de cascada que involucra tres proteínas: una adeniltransferasa (Atasa), la proteína P₁₁ y una uridiltransferasa (Utasa).

Para la adenilación de la GS, se requiere de la actividad de la Atasa, y de la proteína P₁₁ en su forma P_{11A}. Para la reacción inversa se necesita que la proteína P₁₁ esté uridilada (forma P_{11D}) para que estimule a la Atasa a catalizar la desadenilación de la GS. A su vez la uridilación de P₁₁ depende de las concentraciones relativas intracelulares de 2-oxoglutarato y glutamina. Cuando ésta relación es elevada, la P₁₁ se encuentra desuridilada; si por el contrario, ésta relación es baja, se tiene entonces la uridilación de P₁₁ a través de la uridiltransferasa Ver Fig. 2.

Además de la regulación a la que está sujeta la actividad enzimática de la GS, la síntesis de la propia molécula, se encuentra rigurosamente controlada. Primeramente, se sabe que la síntesis de GS se reprime cuando las células están creciendo en condiciones de exceso de nitrógeno; en cambio, cuando la concentración de éste resulta limitante por crecimiento en bajas concentraciones de amonio o un aminoácido como fuente de nitrógeno, se sintetiza aproximadamente diez veces más cantidad de és

FIGURA 2: Sistema de adenilación-desadenilación de la GS y su regulación por la concentración de ciertos metabolitos.



ta enzima (1).

Por otro lado, estudios genéticos llevados a cabo en K. aerogenes (6) condujeron a la obtención de cepas mutantes que producían la GS constitutivamente, es decir, no se reprimía su síntesis por altas concentraciones de amonio en el medio de cultivo. Estas mutaciones parecían localizarse dentro del gene estructural (glnA) lo que llevó a Magasanik y colaboradores (6,7) a proponer un modelo de regulación autógena donde la GS desadenilada inducía su propia síntesis y la adenilada la reprimía.

Esta hipótesis parecía estar apoyada también por mutantes lesionadas en el sistema de adenilación-desadenilación: como por ejemplo células que contienen mutaciones en glnB (gene que codifica para la proteína P₁₁), que resultan en una P₁₁ alterada de tal manera que no puede uridilarse, o en glnD (gene para la uridiltransferasa) y que por lo tanto tienen la GS muy adenilada; también la cantidad de ésta enzima es baja en cualquier condición de crecimiento (7). En cambio cepas con mutaciones en glnE (gene que codifica para la adeniltransferasa), y por lo tanto son incapaces de adenilar la GS, la producen en altas concentraciones (7,8).

Sin embargo, recientemente, se han descrito mutaciones en otros genes que también afectan la síntesis de GS. En Salmonella typhimurium se encontraron mutaciones en un gene alejado de glnA llamado glnF, el cual cotransduce aproximadamente el 15% con el gene argE por transducción mediada por P22. Estas cepas glnF son auxótrofas de glutamina (fenotipo Gln⁻) y tienen menos del 10% de la actividad normal de GS o de antígeno en condiciones de represión, son incapaces de desreprimir la síntesis de

la enzima en respuesta a limitación de nitrógeno (9). Es importante hacer notar que estas auxótrofas tienen actividades normales de todas las enzimas del sistema de adénilación-desadenilación. Otra característica de estas mutaciones, es que, al igual que las que se encuentran dentro del gene estructural de la GS, son incapaces de utilizar otros aminoácidos como única fuente de nitrógeno (tales como arginina, prolina, serina, γ -aminobutírico, ornitina, etc.) a lo que se llama fenotipo Reg⁻ (14).

También se han encontrado mutaciones en glnF en glnF en K. aerogenes (10) donde igualmente son auxótrofas de glutamina y presentan una frecuencia de cotransducción con el gene argG de aproximadamente 50% con P1 (lo que significa que se encuentran separados por 1 min. del mapa aproximadamente); también en este microorganismo las cepas glnF⁻ -- tienen normal el sistema de adénilación-desadenilación. Así mismo en E. coli se han descrito mutaciones en el gene glnF (11), cuyo fenotipo es semejante al descrito para una cepa glnF en las otras enterobacterias. En este caso, este gene, se encuentra en el minuto 69 del mapa cromosómico y cercano al gene argG (3). De acuerdo con estos datos se ha propues que el producto del gene glnF es esencial para la activación de la síntesis de glnA, por lo que en ausencia de aquel, la síntesis de GS se encuentra totalmente reprimida (9,10).

Inmediatamente después se encontraron mutaciones que suprimían la auxotrofia por glutamina que confieren las mutaciones en glnF, -- las cuales se localizan en un locus muy cercano a glnA que se le denominó glnR en S. typhimurium (12) y glnG en K. pneumoniae (13) y en E. coli (14). Las cepas glnG⁻ sintetizan cantidades bajas constitutivas de GS --

en todas las condiciones de crecimiento (alto y bajo amonio) independientemente de si tienen o no funcional el gene glnF. Además las mutaciones en glnG le confieren a la célula el fenotipo Reg^- , es decir, se vuelven incapaces de usar otros compuestos como únicas fuentes de nitrógeno (como arginina, prolina, γ -aminobutírico, etc.). Posteriormente McFarland y sus colaboradores describen que tanto en S. typhimurium como en E. coli, glnR está compuesto por dos genes independientes (15) a los cuales denominaron ntrB y ntrC (que en E. coli son glnL y glnG respectivamente) siendo ntrB el más cercano a glnA. Los productos de estos genes se identificaron en un sistema acoplado de transcripción-traducción in vitro, y se encontró que el producto de glnL (ntrB) es una proteína de 36 000 daltones de peso molecular, en tanto que el de glnG (ntr C) tiene un peso molecular de 54 000 daltones. Mutaciones en cualquiera de éstos dos genes -- suprimen el fenotipo Gln^- de las cepas glnF^-; una cepa glnL^- tiene actividades altas de GS aún en exceso de amonio, mientras que una doble glnF^- glnL^- las tiene bajas constitutivas (15).

Todos estos datos llevaron a estos autores (15) a proponer un modelo para la regulación de la expresión del gene glnA que hasta ahora se ha visto apoyado, al menos en parte, por evidencia experimental proveniente de varios laboratorios: el producto de glnG puede ser un activador de la síntesis de GS si se encuentra con el producto de glnF (o bien alguna molécula derivada de él); si por el contrario, la proteína de glnG se encuentra asociada con el producto de glnL, entonces se vuelve un represor de la síntesis de glnA. Ahora bien, el sistema de regulación de la transcripción de glnA, parece ser un sistema general para la utilización del nitrógeno celular, dado que mutaciones en los genes reguladores

de la síntesis de GS (como son glnL, glnG o glnF), afectan la transcripción de los operones catabólicos encargados de metabolizar las otras -- fuentes de nitrógeno (10,12,13,15).

Magasanik por su parte, propone que además de la regulación por estos genes, la proteína reguladora P₁₁ tiene un papel importante en la síntesis de GS, independientemente del sistema de adenilación-desadenilación (16,17). Se ha visto que mutaciones en el gene glnB que resultan en una P₁₁ alterada de tal forma que no puede uridilarse, se obtiene una cepa incapaz de desreprimir su GS, adicionalmente, pérdida total del gene glnB por una inserción, resulta en la síntesis constitutiva de ésta enzima. Con base en estos datos, lo que se propone es que la P₁₁ sea, o bien un represor de la síntesis de GS, o bien un antiactivador, es decir que funcionara evitando que se forme el complejo necesario para la transcripción de glnA.

En nuestro laboratorio hemos estado estudiando los mecanismos de regulación a los cuales responde este complejo sistema, para esto se han aislado diferentes tipos de mutaciones en los genes glnA, glnL, glnG y glnF, así por ejemplo, se tienen mutaciones por inserción de Tn5 en cada uno de ellos, deleciones de la región de glnA y mutaciones puntuales en glnA, glnL y glnG (A. Osorio, S. Brom, L. Servin, L. Segovia y J.C. Urbina). El estudio minucioso del comportamiento de las cepas que contienen estas mutaciones, ha ayudado a dilucidar algunos aspectos de la regulación de este sistema.

Para proponer un modelo detallado de la regulación de dicho sistema, incluyendo también los operones catabólicos, es decir, de la asimilación de nitrógeno en general, es necesario conocer además de los genes involucrados en la regulación del sistema, los niveles de los productos de los mismos y la regulación a la que está sometida su actividad.

Se sabe por una parte que los productos de los genes reguladores de muchos operones biosintéticos como son arg, trp, ilv, his y catabólicos como lac, mal etc. (37), se sintetizan constitutivamente, y su actividad se regula por la presencia de un correpresor (como suele ser el caso de los operones biosintéticos), o bien por un inductor generalmente en los operones catabólicos.

También se conocen ejemplos de genes reguladores cuyos productos no se sintetizan de manera constitutiva, sino que están sometidos a alguna regulación, así, por ejemplo, en K. aerogenes, el represor del operón divergente hut (cuyo gene estructural forma parte del operón) se

autorreprime (38); en E. coli, el regulador del operón ara, también se reprime por su propio producto (39), el gene putA de S. typhimurium se autorreprime y reprime al gene putP (40); el gene glnG de E. coli aparentemente también se autorreprime (25).

En el fago λ , el represor cI está sujeto a diversos tipos de regulación, así como el represor Cro, que se reprime por cI. (41); en el bacteriófago Mu la síntesis del represor c, está regulada positiva y negativamente, y también se regula por su propio producto (42). -- Finalmente, en el elemento transponible Tn3, el gene represor de la -- transposasa, se autorreprime (43).

Esta claro, pues, que no todos los genes reguladores se sintetizan constitutivamente, y que, en el caso del sistema de GS y Aut, - es importante conocer los niveles de los productos de los genes reguladores y, si fuera posible; también saber la regulación de la actividad de los reguladores ya sintetizados, para poder ir esclareciendo los mecanismos de control de dicho sistema.

En éste trabajo nos propusimos estudiar la expresión del -- gene glnF de E. coli para investigar, por un lado, si su transcripción está sujeta a algún tipo de regulación (ya sea por autorregulación, por otros genes reguladores, o por la accesibilidad de nitrógeno a través - de alguna proteína regulatoria) y también para conocer aproximadamente los niveles del transcrito de glnF que, si no está sometido a regulación postranscripcional, reflejaría los niveles del producto de glnF en las diferentes condiciones de crecimiento probadas.

El enfoque experimental para estudiar la expresión de glnF, fue fusionar la región de control de éste gene con los genes estructurales del operón de lactosa ya que el producto del gene lacZ (β -galactosidasa) es una enzima muy bien estudiada cuya actividad puede medirse fácilmente, de ésta manera, se espera que al poner lacZ bajo el control de la región regulatoria de glnF, la actividad de β -galactosidasa, medida en diferentes condiciones de crecimiento, sea un reflejo de la expresión de glnF.

MATERIAL Y METODOS

1. Cepas Bacterianas

Todas las cepas bacterianas son derivadas de Escherichia coli K-12 y se encuentran descritas en la Tabla I.

2. Condiciones de Cultivo

Para hacer los experimentos las células se pusieron a crecer en los siguientes medios de cultivo:

Luria (19) que contiene bacto-triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y cloruro de sodio 1%. Para cepas auxótrofas de glutamina se le -- adiciona éste aminoácido a una concentración final de 1 mg/ml esterilizado por filtración.

Medio mínimo NN. (20) que contiene fosfato monobásico de potasio -- 13.6 g/lit, sulfato de potasio 2.61 g/lit, sulfato de magnesio heptahidratado 0.2 g/lit, cloruro de calcio 0.01 g/lit, sulfato ferroso -- heptahidratado 0.0005 g/lit. A este medio se le agrega glucosa al -- 0.2% (o lactosa al 0.2%) como fuente de carbono, cloruro de amonio 15 mM (amonio alto) ó 0.5 mM (amonio bajo), o glutamina 1 mg/ml o -- arginina o prolina al 0.2% como fuentes de nitrógeno. Todo esto se esteriliza independientemente por filtración. Otros requerimientos como aminoácidos y vitaminas se añadieron también esterilizados por filtración a las concentraciones óptimas previamente determinadas.

TABLA 1. CEPAS BACTERIANAS Y GENOTIPO RELEVANTE

Cepa	Genotipo relevante	Fuente
MAL 103	Doble lis6gena: Mu <u>cts62</u> Mud1 Delección de <u>lac</u>	M. Casadaban (18)
MX30	Silvestre para los genes de glutamina. <u>argG</u> ⁻	F. Bastarrachea (19)
MX614	Silvestre para los genes de glutamina. Delección de <u>pro-lac</u>	Bastarrachea <u>et al.</u> (35)
MX727	<u>glnA71</u> :: Tn <u>5</u>	"
MX902	<u>glnG74</u> :: Tn <u>5</u>	Osorio et al. (1983)
MX848	<u>glnF73</u> :: Tn <u>5</u>	"
MX960	<u>glnL82</u> :: Tn <u>5</u>	U. C. Urbina
MX971	Derivada <u>argG</u> ⁻ de MX614	Este trabajo
MX972	Derivada de MX614 Gln ⁻ Aut ⁻ Lac ⁺ Ap ^R por infección de Mud1	"
MX973	Igual que MX972. Aislado independiente	"
MX974	Derivada de MX971. <u>glnF80</u> :: Mud1 <u>argG</u> ⁺ . Delección de <u>lac</u>	"
MX974-A	Derivada de MX971 <u>glnF81</u> :: Mud1 <u>argG</u> ⁺ . Delección de <u>lac</u>	"
MX974-B	Igual que MX974, aislado independiente	"
MX983	Derivada de MX971. <u>glnF80</u> :: Mud1 <u>argG</u>	"
MX1005	Igual que MX971 pero lis6gena para Mu <u>cts62</u>	"
MX1008	F' <u>glnF</u> ⁺ / <u>glnF80</u> :: Mud1 <u>reca</u> ⁻ (KLF41/MX974)	"
MX1010	F' <u>glnF</u> ⁺ / <u>glnF80</u> :: Mud1 (KLF41/MX983)	"

TABLA 1. (continuación)

Cepa	Genotipo relevante	Fuente
MX1021	<u>glnF80</u> :: Mud1 <u>glnA74</u> :: Tn <u>5</u>	Este trabajo
MX1022	<u>glnF80</u> :: Mud1 <u>glnG74</u> :: Tn <u>5</u>	"
MX1023	<u>glnF80</u> :: Mud1 <u>glnL82</u> :: Tn <u>5</u>	"
MX1025	F' <u>glnF</u> ⁺ / <u>glnF80</u> :: Mud1 <u>glnA</u> :: Tn <u>5</u> (KLF41/MX1021)	"
MX1026	F' <u>glnF</u> ⁺ / <u>glnF80</u> :: Mud1 <u>glnG74</u> :: Tn <u>5</u> (KLF41/MX10-2)	"
MX1027	F' <u>glnF</u> ⁺ / <u>glnF80</u> :: Mud1 <u>glnL82</u> :: Tn <u>5</u> (KLF41/MX1023)	"

En los casos necesarios se agregó ampicilina a una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$, y kanamicina a 30 $\mu\text{g/ml}$.

3. Bacteriófagos

Para las transducciones se utilizó Pl virA. Para las fusiones los genes estructurales de lac se utilizó el fago Mud1 (con un fago ayudador que es el Mu cts62) descrito por Casadaban (18).

4. Obtención de lisados de Mud1

Para obtener los lisados de Mud1 se parte de la cepa MAL103 (18) que es una doble lisógena para Mu cts62 y Mud1 ya que Mud1 necesita de un fago ayudador para encapsidarse. Se creció la cepa MAL103 en medio Luria a 30°C hasta fase exponencial (aproximadamente 40 unidades Klett), se incubó por 20 minutos a 42°C para inactivar el represor termosensible de Mu cts62, y después se incubó con agitación a 37°C hasta que se observó lisis celular. Posteriormente se le agregó 1/100 de volumen de cloroformo y, después de agitar, se centrifugó para quitar los restos celulares. Los lisados deben usarse el mismo día ya que pierden la infectividad muy rápidamente. El título obtenido es de aproximadamente 10^{10} unidades formadoras de placa (ufp)/ml, para Mu cts62, y de 10^7 fagos Mud1/ml, (18).

5. Preparación de Lisados de Pl

Para la propagación de Pl cepa donadora se creció en medio Luria hasta fase exponencial. Se tomaron 0.5 ml. de éste último y se mezclaron con 0.1 ml. de Pl diluído a 1×10^7 ufp/ml. en NN estéril, y la --

mezcla se transfirió a tubitos con 3 ml. de Luria + CaCl_2 (25 mM) con agar al 0.75% a 42°C para mantenerlo líquido. La mezcla con agar suave se vació en cjas de Petri con medio Luria sólido adicionado con CaCl_2 (25 mM), timina (25 ug/ml.) y glucosa (0.2%): cajas de LCTG. Las cajas se incubaron a 30°C ó a 37°C, según si la cepa donadora era o no termosensible (por ser lisógenas de Mu cts62 o de Mud1), por aproximadamente 12 hrs. Posteriormente se raspó el agar suave, se transfirió a tubos y se le agregó 5% de cloroformo y se centrifugó para quitar los restos celulares y el agar; al sobrenadante se le añadió a nuevamente cloroformo y después de centrifugar para sedimentarlo, se guardó a 4°C (21).

6. Titulación de lisados de P1

Para titular los lisados mencionados anteriormente, se utilizó la cepa sensible a P1 AB1157. Esta cepa se cultivó en medio rico hasta fase exponencial. Se centrifugó y la pastilla celular se resuspendió en la mitad de volumen de solución de adsorción que contiene 0.01 M de Mg SO_4 y 0.005 M de CaCl_2 . Posteriormente se hicieron diluciones del lisado a titular desde 10^0 hasta 10^{-6} en MN y se tomaron 0.1 ml. de cada una de las diluciones a partir de 10^{-4} a 10^{-6} y se mezclaron con 0.1 ml. de bacterias en solución de adsorción. Las mezclas se incubaron 20 min. a 37°C sin agitación y posteriormente se vaciaron sobre cajas con medio LCTG utilizando para ello tubitos de agar suave con medio Luria y CaCl_2 . Se incubaron a 37°C durante aproximadamente 12 hrs. y después se contó el número de placas de cada dilución.

7. Obtención de lisógenas de Mud1

Una vez preparado el lisado de Mu cts62 y Mud1 como se descri-
be anteriormente, se creció la cepa receptora en medio Luria más glutami-
na hasta 40 unidades klett. Se centrifugó y se resuspendió en la décima
parte de volumen de Luria con glutamina adicionada de Mg SO₄ 0.01 M y --
CaCl₂ 0.005 M. Posteriormente se tomó 0.1 ml. de ésta suspensión de bacte-
rias más 0.1 ml. del lisado de Mud1 de manera que la multiplicidad de in-
fección fuera de 10 (es decir 10 fagos líticos por bacterias), y se incu-
bó por 20 min. a 30°C sin agitación. Posteriormente se diluyó 5 veces --
con Luria + glutamina y se dejó agitando a 30°C durante 2 Hrs. para permi-
tir que el gene de resistencia a ampicilina se expresara.

Inmediatamente después se volvió a diluir 10 veces con Luria
+ glutamina y se agregó ampicilina a una concentración final de 25 µg/ml.

Este cultivo se dejó creciendo aproximadamente 12 hrs. al fi-
nal de las cuales se observaba crecimiento. También se incluyó un con-
trol en el que las células concentradas llevando ya Mg SO₄ y CaCl₂ se mez-
claron con 0.1 ml. de Luria en vez de la suspensión de fagors. Por lo --
demás este control se trato de manera idéntica al experimento. Al final
de la incubación con ampicilina, el matraz control estaba transparente, -
es decir, no hubo crecimiento ya que la cepa silvestre de E. coli usada -
en el laboratorio es sensible a ampicilina (Ap).

Una vez obtenidas las lisógenas de Mud1 (resistentes a ampici-
lina Ap^R), para obtener aquellas que fueran auxótrofas de glutamina, --
(Gln⁻) y Reg⁻ se sometieron las lisógenas a dos ciclos de enriquecimiento

con estreptomicina a 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (aparentemente la estreptomicina sólo entra en las células que tienen un sistema de transporte activo) utilizando medio mínimo con arginina y prolina al 0.2% cada una, como fuentes de nitrógeno.

Posteriormente se recuperaron en medio Luria con glutamina a 30°C. Se seleccionaron a aquellas que fueron Aut^- y Ap^R .

8. Transducción con P1

Una vez propagado y titulado el P1 en la cepa donadora, se creció la receptora en medio Luria hasta 40 unidades klett, se centrifugó y se concentró 10 veces en bacto-triptona al 1%. Posteriormente se separó en dos tubos cada uno conteniendo 0.5 ml. de la suspensión, más 0.5 ml. de una solución estéril que contiene CaCl_2 0.05 M y MgSO_4 0.03 M; al tubo experimental se le adicionó 0.5 ml. de P1 propagado en la donadora adecuada diluido a 5×10^7 ufp/ml. y al control se le agregó 0.5 ml. de Luria exclusivamente.

Después de 20 min. de incubación para que los fagos se adsorbieran, se centrifugó y se lavó dos veces con NN estéril. Una vez lavadas las células se resuspendieron en 0.1 ml. de NN estéril y se vaciaron con agar suave sobre cajas con el medio selectivo donde se dejaron incubando unas 48 hrs.

9. Conjugaciones

Para realizar las conjugaciones se siguió el siguiente procedimiento: se pusieron a crecer tanto las bacterias donadoras como las --

receptoras en medio Luria hasta fase exponencial. Después se mezclaron - 0.5 ml de bacterias donadoras y 4.5 ml. de las receptoras. Además se incubaron 3 ml. de células donadoras y otro con 3 ml. de las receptoras como controles. Las células se incubaron sin agitación durante el tiempo necesario para cada caso. Después se lavaron dos veces con NN la mezcla y los controles y finalmente se resuspendieron en el mismo volumen y se vaciaron sobre cajas de Petri con el medio selectivo. Se incubaron aproximadamente 48 hrs.

10. Obtención de Derivadas $recA^-$

Para construir las cepas conteniendo mutaciones en $recA$, se hicieron primero derivadas $thyA^-$ de las cepas de interés, por el método de trimetropim (34) que, brevemente, consiste en inocular a partir de un cultivo en fase estacionaria diluido 100 veces, un tubo con 5 ml. de medio mínimo adicionado de timina 75 μ g/ml. y trimetropim 10 μ g/ml. Posteriormente se hacen diluciones y se obtienen colonias en placas con timina; de ahí se selecciona una cepa $thyA^-$ es decir, que no crezca en ausencia de éste metabolito. Una vez que se tiene esta cepa; se hace una conjugación usando como donadora, la cepa Hfr JC5088 que es $thyA^+$ $recA^-$ y que dona estos genes como marcadores tempranos. Después de la conjugación, se selecciona para las que crecen en ausencia de timina, y la mayoría de éstas también adquieren el gene $recA^-$; el cual se prueba por hipersensibilidad de la cepa a ciertos mutágenos (en este caso se utilizó nitrofurontofina a 5 μ g/ml).

11. Determinación de Actividades Enzimáticas

A) Medición de actividad enzimática de GS: se midió utilizando el ensayo de γ -glutamyl transferasa que se basa en la transferencia del grupo glutamil de la glutamina a la hidroxilamina formando γ -glutamylhidroxamato que con Fe^{3+} da un compuesto colorido que puede medirse coloriméticamente a una longitud de onda de 540 nm.

La actividad enzimática se midió utilizando el método de Bender y colaboradores (22) con algunas modificaciones (20).

B) Medición de actividad enzimática de β -galactosidasa: se basa en la degradación de un compuesto incoloro, (o-nitrofenil- β -D-galactósido: ONPG, obteniéndose galactosa más o-nitrofenol el cual es amarillo y absorbe a 420 nm. Se siguió el método de Miller (19), excepto que las células se crecieron hasta 100 unidades klett ya que la actividad de GS se mide en éste momento y de esta manera se tienen las mismas condiciones para la determinación de ambas actividades.

C) Medición de actividad enzimática de GOGAT: para medir ésta enzima se utilizó el método reportado por Meers y colaboradores (36).

12. Cuantificación de proteína

Para determinar la cantidad de proteína se utilizó el método descrito por Lowry (23).

13. Cálculo de la frecuencia de reversión

La frecuencia con que las cepas glnF⁻ que tienen fenotipo -- Gln⁻ revierten al fenotipo Gln⁺, se hizo de la siguiente forma: se obtuvieron colonias aisladas de la cepa en medio no selectivo (Luria + glutamina), se tomó una colonia y se resuspendió en 1 ml. de NN estéril, se hicieron diluciones y de la dilución 10⁻⁵ se tomaron 0.1 ml. con el fin de inocular con unas 50 bacterias a 4.9 ml. de medio rico con glutamina. Se incubó con agitación y a las 16 hrs. aproximadamente, cuando estaba turbio, se hicieron diluciones y se plaquearon en medio no selectivo para hacer cuentas viables. Las diluciones más bajas se plaquearon en medio selectivo para contar las revertantes. Se contaron las colonias que aparecieron después de unas 48 hrs. de incubación y la frecuencia de reversión se expresó como el número de revertantes por ml. sobre el de células totales por ml.

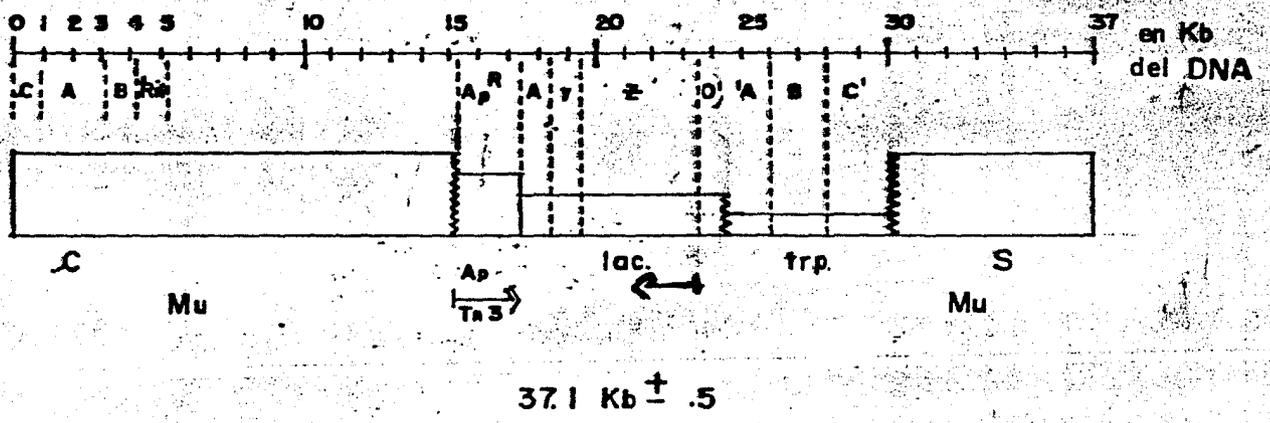
RESULTADOS

Dado que no se conoce el producto del gene glnF, en enfoque utilizado para hacer un estudio de la expresión de éste gene, ha sido -- buscar fusiones de su promotor con los genes estructurales del operón -- lac; para ello se utilizó un fago Mu transductante especializado denominado Mud1 (18) cuya estructura se muestra en la Figura 3. Como se observa en la figura, éste fago conserva los extremos "c y S" del bacteriófago silvestre Mu cts62 del cual proviene (18); aparentemente estos genes en el Mud1, le son suficientes para integrarse y, al igual que el fago silvestre lo hace también al azar; de ésta manera, se pueden obtener inserciones de Mud1 en cualquier sitio del cromosoma.

Cuando se infecta a una cepa que sea incapaz de utilizar lactosa como fuente de carbono (debido a una mutación o delección del operón lac) con un lisado de fagos Mud1, estos se pueden insertar dentro de -- cualquier gene, y si lo hacen en la orientación adecuada con respecto al promotor de éste, los genes del operón lac que lleva Mud1, se expresan y se regulan igual que el gene donde se insertó, reflejando la regulación a la que está sometida la expresión del gene de interés; con esto se tiene un método de ensayo para estudiar la expresión de un gene cuyo producto -- no se conoce o es difícil de medir.

El fago Mud1 tienen además el gene que le confiere resistencia a ampicilina el cual tiene su propio promotor de manera que si después de una infección con Mud1 se selecciona resistencia a ampicilina exclusi-

FIGURA 3: Estructura del fago Mud1 : tiene los extremos λ y ϕ del fago Mu-
 cts 62. En el centro contiene la β -lactamasa de Tn. 3 con su
 propio promotor, y a continuacion los genes del operon lac sin
 promotor, y un fragmento del operon trp. Las flechas indican el
 sentido de la transcripcion. El signo prima junto a una letra indica
 discontinuidad de ese gene del lado donde esta el signo.



vamente, se pueden obtener inserciones en ambas orientaciones, y sólo una de las cuales permitirá la expresión del gene LacZ.

Otra característica del fago Mud1, es que posee un represor termosensible de las funciones vegetativas cuyo gene proviene del fago Mu cts62 y, aunque Mud1 es un fago incompleto incapaz de lisar, contiene el gene kil de Mu (Fig. 3) el cual al inducirse por inactivación del represor, provoca la muerte de la célula huésped por ésta razón todos los cultivos de lisógenas para Mud1 se incuban a 30°C.

A) Obtención de cepas glnF⁻ por inserción de Mud1

Con el fin de obtener inserciones del fago Mud1 en glnF, primeramente se obtuvo un lisado de Mud1 por termoinducción a partir de la cepa MAL103 (18), tal como se describe en Material y Métodos. Este lisado se utilizó para infectar a una cepa que contiene una delección del operón lac llamada MX614, (Tabla 1) y que es silvestre para todos los genes involucrados con la síntesis de glutamina. Después de la infección se recuperaron las células en medio Luria con ampicilina a 25 µg/ml. y glutamina, ya que las células que llevan Mud1 insertado, deberán ser resistentes a este antibiótico y, si la inserción del fago ocurrió en glnF en alguna célula, ésta deberá ser auxótrofa de glutamina. En éste cultivo se observó crecimiento al cabo de 12 hrs. de incubación a 30°C, en tanto que el control, el cual carecía de fago, no desarrolló crecimiento después de 12 hrs.

Las células conteniendo Mud1 se sometieron posteriormente a dos ciclos de enriquecimiento con estreptomycin (200 µg/ml) utilizando --

como fuentes de nitrógeno prolina y arginina ya que como se mencionó anteriormente, las células glnF⁻ (así como las glnA⁻, glnG⁻) son incapaces de utilizar arginina o prolina como únicas fuentes de nitrógeno (fenotipo Aut⁻ o Put⁻ respectivamente).

Después del enriquecimiento las células se plaquearon en medio mínimo con glutamina y Ap. De ahí se tomaron colonias aisladas que posteriormente se transfirieron a cajas con arginina como fuente de nitrógeno.

De aproximadamente 500 colonias probadas, se obtuvieron dos colonias que claramente eran Aut⁻ y Ap^R. Se incubaron éstas dos en medio indicador McConkey-lactosa donde crecían de color rojo, lo cual indicaba la utilización de esta fuente de carbono; también se probó que no crecieron en amonio (fenotipo gln⁻), característica que también cumplían. A estas cepas se les trató de manera independiente y se les denominó MX972 y MX973 (Tabla 1).

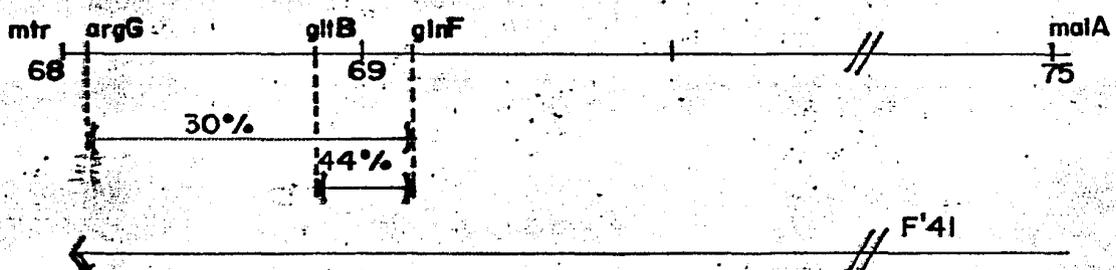
B) Caracterización genética de las inserciones de MudI

Como mutaciones en varios genes diferentes (glnA, glnG, glnF) pueden dar el fenotipo Aut⁻, se hicieron varios experimentos para localizar la inserción. Inicialmente se hicieron experimentos de cotransducción de la inserción con el gene argG que en E. coli cotransduce con glnF, a través de Pl, aproximadamente un 35% (11), en K. aerogenes, también utilizando Pl, están ligados en un 56% (10) y en S. typhimurium aproximadamente un 1% (24) (Fig. 4).

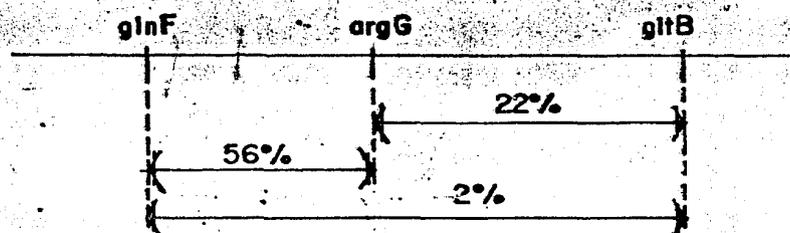
FIGURA 4: Mapa genético de diferentes microorganismos de la región de glnF:
 Los números en porcentaje indican la frecuencia de cotransducción entre los marcadores señalados, utilizando P1.

A) Mapa de E. coli que va del minuto 68 al 75 del cromosoma.

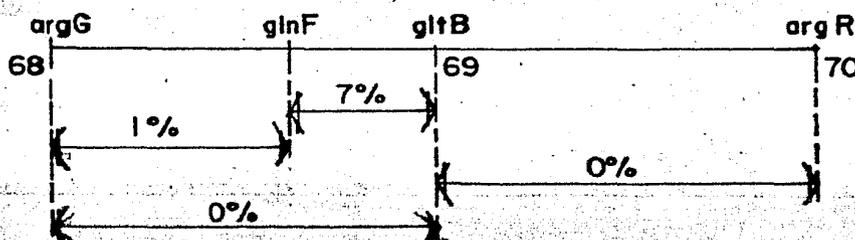
Los datos de cotransducción están tomados de las refs. (11 y 28). También se muestra el episoma F'41 (KLF41) que cubre toda esta región.



B) Mapa de K. aerogenes tomado de la ref. (10).



C) Mapa de S. Typhimurium tomado de la ref. (24). La región ilustrada va de 68 a 70 unidades del cromosoma.



Como se muestra en la Tabla 2, se utilizaron como donadoras para la propagación de P1, las cepas aisladas originalmente: Mx972 y MX973, y estos lisados se usaron para transducir a una cepa auxótrofa de arginina (por una mutación en el gene argG), a independencia por éste aminoácido, en presencia de glutamina, entre éstas transductantes argG⁺ se buscaron -- resistentes a ampicilina; se encontró que la frecuencia era más baja de lo esperado (Tabla 2). Esto podía deberse por un lado, al tamaño de la inserción ya que Mud1 mide 37.1 Kb., por lo que cabe menos DNA bacteriano en la cabeza del fago y los marcadores se alejan; y, por el otro, posiblemente a inducción zigótica ya que la cepa receptora no tiene el represor de Mu (14). Así pues se hicieron las mismas cruzas con la misma receptora pero ahora lisógena de Mu cts62; en el caso de las transductantes argG⁺ que venían de la MX972, el 8% fueron también Ap^R y las de la MX973, lo fueron el 20%, por lo que la baja en la cotransducción entre glnF y argG se debe, al menos en parte, a inducción zigótica. En cuanto a este punto, Pahel y colaboradores (14) encuentran que la cotransducción entre un Tn10 cercano a glnA y una inserción de Mu en éste gene, baja del 75% al 10% cuando la receptora no tiene el represor de Mu. También Magasanik (25) reporta un fenómeno de inducción zigótica cuando transduce una inserción de Mud1 en -- glnG a una cepa silvestre.

De las transducciones anteriores se aislaron 3 cepas resistentes a ampicilina, las cuales crecían en lactosa como única fuente de carbono, indicando que la inserción de Mud1 estaba en la orientación adecuada con respecto al promotor de glnF y se estaban transcribiendo los genes del operón lac.

TABLA 2. TRANSDUCCIONES PARA LOCALIZAR LA INSERCIÓN DE Mud1

Donadora	Receptora	Selección	Cotransducción % de Ap ^R	# Colonia aislada
MX972 Cln ⁻ Lac ⁺ Ap ^R	MX971 <u>argG</u> ⁻	Arg ⁺	1	MX974-A (Gln ⁻ Ap ^R Lac ⁺)
MX973 Gln ⁻ Lac ⁺ Ap ^R	MX971 <u>argG</u> ⁻	Arg ⁺	2	MX974 MX974-B (Gln ⁻ Ap ^R Lac ⁺)
MX972 Cln ⁻ Lac ⁺ Ap ^R	MX1005 <u>argG</u> ⁻ Lisogena Mu <u>cts62</u>	Arg ⁺	8	--
MX973	MX1005	Arg ⁺	20	--
MX974-B <u>glnF80</u> :: Mud1	MX971	Ap ^R Lac ⁺	% de <u>argG</u> ⁻ 4/14	MX983: <u>argG</u> ⁻ <u>glnF80</u> :: Mud1
MX30 <u>argG</u> ⁻	MX974 <u>glnF80</u> :: Mud1	Aut ⁺	Cotransducción % Arg ⁻ 22 % Lac ⁻ 100 % Ap ^R 95	
MX30 <u>argG</u> ⁻	MX974-A <u>glnF81</u> :: Mud1		% Arg ⁺ 33 % Lac ⁻ 97 % Ap ^R 3	

Por otro lado se hizo también la cruce inversa usando como donadora la cepa argG⁻ y como receptora la MX974, que, como se ve en la Tabla, es una de las colonias aisladas de las transducciones anteriores (argG⁺ glnF80 :: Mud1); y se seleccionó para Aut⁺, para lo cual es necesario tener intacto el gene glnF. De las transductantes Aut⁺, el 22% son argG⁻; y el 100% resultaron Lac⁻, por lo que al restituir el gene glnF por transducción, se pierde ahora la habilidad de utilizar lactosa como fuente de carbono. Todos estos datos indican que la inserción de Mud1 está en glnF. Un dato curioso es que el 95% de las cepas Aut⁺ obtenidas en la transducción, que ahora son Lac⁻, son Ap^R (en el caso de las que vienen de la MX974: glnF80 :: Mud1), ésto aparentemente se debe a "transposición" de fagos Mud1 aberrantes que no llevan los genes de lactosa, lo que ocurre con relativamente alta frecuencia (aproximadamente del 4%), tal como lo reporta McSharry (26) y Magasanik (25), donde transducen a Ap^R una cepa silvestre con un fago propagado en una cepa glnG :: Mud1, y sólo el 15% de las Ap^R son Reg⁻. Cuando se hizo la transducción a Aut⁺ descrita en la Tabla 2, usando como receptora la MX974-A (glnF81 :: Mud1), el porcentaje de argG⁻ entre las Aut⁺ fue del 33% y sólo el 3% fueron Ap^R.

Con el objeto de tener un marcador adicional para seleccionar la presencia del episoma con la región de glnF, se construyó una cepa con los dos marcadores glnF :: Mdl y argG⁻, se hizo la transducción que se muestra en la Tabla 2 en donde la donadora es glnF80 :: Mud1 y la receptora es argG⁻, se seleccionó resistencia a ampicilina y capacidad para usar lactosa. Se obtuvieron 4 colonias, las cuales fueron argG⁻; se purificó una de ellas y se le denominó MX983.

C) Determinación del fenotipo de cepas *glnF* :: *Mud1*

Se sabe que las cepas *Gln*⁻ por mutaciones en *glnF*, revierten al fenotipo *Gln*⁺ por una mutación supresora en *glnG*: este evento ocurre con una frecuencia de aproximadamente 10⁻⁶ en *E. coli*, *K. aerogenes* y *S. typhimurium* (11, 10 y 12). Se verificó esta característica en las cepas aisladas *glnF* :: *Mud1* y se encontró que la frecuencia de reversión al fenotipo *Gln*⁺ en este caso fue de 10⁻⁶ como se muestra en la Tabla 3; así mismo, se muestra la frecuencia con la que revierte la cepa MX848, que contiene una inserción de *Tn5* en *glnF* y que no es termosensible: en este caso se ve que la reversión es de aproximadamente 10⁻⁵ a 37°C, y un poco más baja (3 mas) a 30°C, valor que aún es un poco mayor que la de la *glnF80* :: *Mud1*.

Dado que, por un lado mutaciones que resultan en la pérdida de la enzima GOGAT, confieren también un fenotipo *Reg*⁻, y por otro, el locus *gltB* se encuentra muy cerca de *argG*, pues cotransducen 40%-50% en *E. coli* (11) y 22% en *K. aerogenes* (10): en *S. typhimurium* sin embargo, *gltB* y *argG* no parecen estar ligados por cotransducción con *P1* (24), (Fig. 4). Se midió actividad de la enzima GOGAT de la cepa silvestre, de la inserción de *Mud1* en *glnF* y de una cepa que contiene el episoma F' 41 que cubre la región de *argG* hasta el gene *malA* en el minuto 75 (29) (Fig. 4). La Tabla 4 muestra que tanto la inserción de *Mud1* como el merodiploide para esa región tienen actividad de la enzima, aunque la *glnF*⁻ tiene aproximadamente el 66% de la actividad que tiene la silvestre en las mismas condiciones; similar al dato que reporta S. Kustu para *Salmonella* (9).

TABLA 3. FRECUENCIA DE REVERSION DE LAS
CEPAS glnF⁻ A FENOTIPO Gln⁺ POR
MUTACIONES SUPRESORAS EN glnG

Cepa	Frecuencia de reversion A fenotipo Gln ⁺	
	30°C	37°C
MX983 <u>glnF80</u> :: Mud1	1x10 ⁻⁶	--
MX848 <u>glnF73</u> :: Tn5	7x10 ⁻⁶	10x10 ⁻⁶

TABLA 4. ACTIVIDADES ESPECIFICAS DE GOGAT DE 3 CEPAS DIFERENTES CRECIDAS - EN GLUTAMINA MAS AMONIO COMO FUENTES DE NITROGENO A 30°C.

Cepa	Actividad
MX971 (Silvestre)	12
MX983 <u>glnF80</u> :: Mud1	8
MX1010 <u>F'glnF⁺/glnF80</u> :: Mud1	10

Las actividades están expresadas en nmol. de NADPH oxidado por minuto por mg. de proteína.

Se probó además que el merodiploide de la inserción fuera capaz de crecer en amonio o arginina como únicas fuentes de nitrógeno de manera que glnF debe ser un producto difusible pues se complementa en trans, tal como lo reporta S. Kustu para *Salmonella* (9).

D) Regulación de la expresión de β -galactosidasa en cepas glnF :: Mud1 y merodiploides heterocigós

Una vez que se tenía esta caracterización de las inserciones, se les midió actividades enzimáticas de GS y de β -galactosidasa, la cual, siendo el producto de lacZ, y estando dentro de Mud1 (Fig. 2), estaría sometida a la regulación transcripcional del promotor de glnF.

En la Tabla 5 se muestran las actividades de las enzimas de las cepas crecidas en diferentes fuentes de nitrógeno a 30°C.

Como se observa, la cepa MX971, que es silvestre para todos los genes involucrados con glutamina y tiene delección del operón lac, presenta actividades reprimidas en condiciones de exceso de nitrógeno (glutamina más amonio y amonio alto) En cuanto a β -galactosidasa, no tiene actividad detectable, tal como se espera.

Las cepas con inserciones de Mud1 en glnF, tienen una actividad de GS menor de 0.01 que es el límite de sensibilidad del ensayo, lo cual está de acuerdo con lo reportado para otros mutantes en glnF (9,10). Los merodiploides sin embargo, tienen actividades muy similares a las de la silvestre en las mismas condiciones, por lo que el producto de glnF provisto en trans, es capaz de complementar tanto la habilidad para crecer

TABLA 5: Actividades específicas de GS y de β -galactosidasa de cepas con inserciones de Mud1 en glnF y de los merodiploides heterocigos correspondientes.

CEPA	ACTIVIDADES DE GS				ACTIVIDADES DE β -galactosidasa			
	gln ^a	gln+NH ₄ ⁺ ^b	NH ₄ ⁺ ^c	NH ₄ ⁺ ^d	gln	gln+NH ₄ ⁺	NH ₄ ⁺	NH ₄ ⁺
MX971 (silvestre) (pro-lac) Δ	0.46 [±] 0.17	0.13 [±] 0.04	2.0 [±] 0.1	0.26 [±] 0.18	ND ^f	ND	ND	ND
MX974 (glnF80::Mud1)	<0.01	<0.01	NC ^e	NC	340 [±] 123	419 [±] 117	NC	NC
MX974-A (glnF81::Mud1)	<0.01	<0.01	NC	NC	557 [±] 109	524 [±] 93	NC	NC
MX983 (glnF80::Mud1 argG)	<0.01	<0.01	NC	NC	420 [±] 79	455 [±] 99	NC	NC
MX1008 (F'glnF ⁺ /recA ⁻ glnF80::Mud1)	0.27 [±] 0.05	0.12 [±] 0.04	1.97 [±] 0.1	0.29 [±] 0.15	334 [±] 94	391 [±] 197	231 [±] 40	390 [±] 124
MX1010 (F'glnF ⁺ /argG ⁻ glnF80::Mud1)	0.76 [±] 0.03	0.08	1.94 [±] 0.2	0.15 [±] 0.03	390 [±] 75	280 [±] 10	392 [±] 66	303 [±] 101

Las actividades de GS están expresadas en μ mol. de producto formado/min./mg. de proteína. Las de β -galactosidasa en nmol. de producto formado/min./mg. de proteína. Las células se cultivaron en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono a 30°C y con las siguientes fuentes de nitrógeno:

- a) glutamina (1mg./ml.)
- b) glutamina más amonio (15mM)
- c) cloruro de amonio (0.5 mM)
- d) cloruro de amonio (15 mM)
- e) No crece
- f) No presenta actividad detectable

en fuentes pobres de nitrógeno, así como las actividades de GS aún cuando hay más copias del gene por célula cuando este está en el episoma.

Por otro lado, como se puede ver en la Tabla 5, las actividades de β -galactosidasa de las diferentes cepas no varía con la fuente de nitrógeno, es decir, aparentemente no responde a la accesibilidad de nitrógeno intracelular.

La cepa MX974-A siempre presenta mayor actividad enzimática de β -galactosidasa que la MX974 en las mismas condiciones (aproximadamente 40% más alta), y además tuvo un comportamiento diferente en los experimentos de transducción (Tabla 2) por lo que probablemente es una inserción diferente. Esta cepa mostró el mismo nivel de actividad de β -galactosidasa cuando se creció tanto en exceso como en limitación de nitrógeno.

En cuanto a las actividades de β -galactosidasa sintetizadas por cepas merodiplides $F'glnF^+/glnF :: Mud1$, se observa que, a semejanza de las cepas haploides isogénicas, la síntesis de ésta enzima no responde a la cantidad de nitrógeno presente en el medio, por lo que podemos concluir que la expresión de glnF no sólo no responde a la accesibilidad de nitrógeno, sino que tampoco parece regularse por su propio producto.

Para ver el efecto de mutaciones en los otros genes relacionados, se pasaron por transducción las mutaciones siguientes: glnA71 :: Tn5, glnL82 :: Tn5, glnG74 :: Tn5. Las transducciones (Tabla 6), se hicieron seleccionando para resistencia a kanamicina y en presencia de glutamina y lactosa. En el caso de la mutación en glnA, ninguna de las transductantes fue Gln^+ , es decir no crecieron en amonio como única fuente de nitrógeno. En el caso de las mutaciones en glnL y glnG, el 100% de cada una de las --

TABLA 6. TRANSDUCCIONES PARA LA CONSTRUCCION DE CEPAS glnF⁻ CON DIFERENTES MUTACIONES EN LOS GENES RELACIONADOS glnA, glnL o glnG

Donadora	Receptora	Selección	% de Gln ⁺	Colonia
MX727 <u>glnA71</u> :: Tn5	MX983 <u>glnF80</u> :: Mud1	Kan ^R	0	MX1021
MX902 <u>glnF74</u> :: Tn5	MX983 <u>glnF80</u> :: Mud1	Kan ^R	100	MX1022
MX960 <u>glnL82</u> :: Tn5	Mx983 <u>glnF80</u> :: Mud1	Kan ^R	100	MX1023

transductantes fueron Gln^+ por lo que, de acuerdo con lo reportado (12, 14), éstas mutaciones suprimen el fenotipo Gln^- conferido por una glnF⁻.

En cuanto a las actividades de GS y de β -galactosidasa de éstas cepas, como se observa en la Tabla 7, la GS tiene una actividad baja constitutiva que es suficiente para que la célula crezca en amonio, y es similar a la anteriormente reportada, tanto para las cepas glnG⁻, como para glnF⁻ glnG⁻. En cuanto a las cepas que tienen glnL82 :: Tn5 también tienen actividades bajas constitutivas de ésta enzima, que concuerda con los datos de S. Kustu (15) en Salmonella donde una doble mutante glnF⁻ glnL⁻ le da el mismo tipo de actividad. La β -galactosidasa de estas cepas, también se mantiene constante en diferentes fuentes de nitrógeno y la ausencia de glnA, glnL o glnG no parece influir en la expresión de glnF ya que se tiene aproximadamente la misma actividad que cuando estos genes están presentes.

Por último se construyeron los merodiploides para estas cepas dobles y se les midieron actividades. Como se observa en la Tabla 7, las actividades tanto de GS como de β -galactosidasa son similares a las que presentan las cepas haploides y que por lo tanto no tienen glnF silvestre.

TABLA 7: Actividades específicas de β -galactosidasa de cepas con inserciones de Mud1 en glnF y de los merodiploides heterocigos correspondientes.

CEPA	ACTIVIDADES DE GS				ACTIVIDADES DE β -galactosidasa			
	gln ^a	gln+NH ₄ ⁺ b	NH ₄ ⁺ ↓ c	NH ₄ ⁺ ↑ d	gln	gln+NH ₄ ⁺	NH ₄ ⁺ ↓	NH ₄ ⁺ ↑
MX1021 (<u>glnF80::Mud1</u> <u>glnA71::Tn5</u>)	<0.01	<0.01	NC ^e	NC	491	423	NC	NC
MX1022 (<u>glnF80::Mud1</u> <u>glnG74::Tn5</u>)	0.05	0.03	0.08	0.05	452	520	392	494
MX1023 (<u>glnF80::Mud1</u> <u>glnL82::Tn5</u>)	0.07	0.03	0.07	0.04	491	426	328	451
MX1025 (F'glnF ⁺ / <u>glnF80::Mud1</u> <u>glnA71::Tn5</u>)	<0.01	<0.01	NC	NC	562	442	NC	NC
MX1026 (F'glnF ⁺ / <u>glnF80::Mud1</u> <u>glnG74::Tn5</u>)	0.06	0.03	0.08	0.05	444	313	436	346
MX1027 (F'glnF ⁺ / <u>glnF80::Mud1</u> <u>glnL82::Tn5</u>)	0.05	0.02	0.05	0.02	469	511	393	569

Las actividades de GS están expresadas en μ mol de producto formado/min./mg. de proteína. Las de β -galactosidasa en nmol. de producto formado/min./mg. de proteína.
 Las células se crecieron hasta 100 unidades Klett a 30°C en glucosa como fuente de carbono y las sig. fuentes de nitrógeno:
 a) glutamina 1mg./ml
 b) glutamina (1mg./ml.) más amonio (15mM)
 c) amonio 0.5 mM
 d) amonio 15mM
 e) No crece en este medio

DISCUSION

En éste trabajo se describe la obtención de inserciones del fago Mud1 (Ap^R Lac) en el gene glnF de Escherichia coli; con éste método se tiene un ensayo para estudiar la expresión de éste gene, midiendo solamente la actividad de la enzima β -galactosidasa la cual estaría bajo la regulación transcripcional del gene glnF.

Varios experimentos indican que las inserciones de Mud1 están en glnF; por una parte, como se muestra en la Tabla 2, la inserción de Mud1 y el gene argG cotransducen del 20% al 30% cuando no hay inducción zigótica, dato similar al dato reportado por Pahel y colaboradores (11) (Fig. 4). También en esta tabla se muestra que con una de las cepas aisladas, la MX974, cuando se transduce a Aut^+ , el 100% se vuelven Lac^- , aunque el 95% de las transductantes son Ap^R como se mencionó anteriormente en Resultados, esto puede deberse a "transposición" de fagos Mud1 aberrantes; de cualquier forma, el fenotipo Lac^+ correlaciona un 100% con Aut^- y viceversa, por lo que no considero que las actividades de β -galactosidasa medidas, se vean afectadas por este fenómeno. Cabe hacer notar que las transductantes $Aut^+ Lac^- Ap^R$, son también sensibles a un lisado de Mu cts62 por lo que aparentemente no conservan tampoco el gene represor de éste fago, entonces realmente parece ser un fenómeno de "transposición" de fagos aberrantes, o bien, que sea sólo el fragmento de la β -lactamasa de Tn3 el que transponga.

En cuanto a la otra cepa aislada, la Mx974-A, al transducirla a Aut^+ , el 97% de las transductantes son Lac^- y sólo el 3% son Ap^R , el he

cho de que ésta cepa tenga un comportamiento diferente quizá sugiera que se trata de una inserción distinta; la cotransducción con el gene argG⁻ de la cepa donadora, en estas dos transducciones mencionadas (Tabla 2), se observa que ambas presentan una frecuencia similar a la reportada con el gene glnF⁻ (11) (Fig. 4).

También se midió la frecuencia de reversión de la cepa MX983 (glnF80 :: Mud1) al fenotipo Gln⁺ puesto que se sabe que una segunda mutación en glnG, suprime la auxotrofia por glutamina de una glnF⁻, y que la supresión ocurre con una frecuencia de 10⁻⁶ aproximadamente. Como se observa en la Tabla 3, se obtuvieron revertantes Gln⁺ con esta frecuencia, además las mutaciones supresoras parecen estar en glnG efectivamente, ya que por un ensayo cualitativo de la enzima GS (medido en las colonias revertantes directamente), indica que tiene muy baja actividad aún en amonio limitante o en glutamina como fuente de nitrógeno, igual que la que presenta una cepa glnG⁻.

El hecho de que la cepa con la inserción de Mud1 tuviera actividad enzimática de GOGAT (aunque un poco más baja que la silvestre), implica que la inserción no está en el locus gltB, ya que una mutación en éste daría un fenotipo muy similar (sería también Aut⁻ y cotransduciría con el gene argG) al de una cepa glnF⁻.

La otra evidencia que indica que la inserción está en glnF, es que cuando se le transfiere por transducción las mutaciones glnG74 :: Tn5 y glnL82 :: Tn5, se suprime el fenotipo Gln⁻, tal como se ha reportado (10,11,12) (Tabla 6).

En cuanto a las actividades enzimáticas presentadas por éstas cepas, se observa en la Tabla 5 que la cepa silvestre para los genes invo lucgrados con glutamina y que tiene una deleción del operón lac. tiene actividades de GS reprimidas en amonio alto (15 mM) y en glutamina (1 mg./ml) más amonio; en cambio la actividad se induce en amonio bajo (0.5 mM) y en glutamina. Tal como se espera, esta cepa no presenta actividad detectable de β -galactosidasa.

Las cepas MX974 y MX974-A, no presentan actividad detectable de GS, como se espera de una cepa glnF⁻; como se ve en la Tabla 5, las actividades de β -galactosidasa que presentan la MX974 (glnF80 :: Mud1), es de 350 a 400 nmol de producto formado por minuto por mg. de proteína. Este valor no parece verse afectado por el crecimiento de la cepa en limitación o exceso de nitrógeno. La MX974-A, tiene actividades mayores de β -galactosidasa (aproximadamente 40% más altas), pero este valor se mantiene relativamente constante, tanto cuando la cepa crece en glutamina, como cuando lo hace en glutamina más amonio (Tabla 5).

La cepa MX1008 cuyo genotipo es glnF80 :: Mud1, recA⁻, y además posee el episoma KLF41 que lleva la región de glnF silvestre, presenta actividades reguladas de GS, y las de β -galactosidasa son similares al haploide del cual proviene (MX974). Cabe hacer notar que en esta cepa hay más variación en los datos, sobre todo cuando la cepa está crecida en amonio limitante donde la actividad de β -galactosidasa es casi la mitad del valor que se obtiene cuando se cultiva en las demás condiciones (Tabla 5). En primer lugar, mediciones independientes de una misma cepa en

las mismas condiciones de cultivo, dan datos que varían en aproximadamente un 30% del valor promedio, por lo cual variaciones de la misma magnitud entre los promedios de una condición (exceso de nitrógeno) y otra (limitación de nitrógeno), no pueden considerarse como significativas.

En segundo lugar es importante remarcar que el crecimiento de las cepas complementadas con el episoma KLF41, crecen muy lento (con un tiempo de duplicación de unas 6 hrs.), sobre todo la cepa MX1008 que es además recA⁻; por éstas razones la variación observada en estos merodiploides posiblemente no sea significativa.

En general, dentro de una misma cepa, la relación de la actividad de β -galactosidasa medida en crecimiento en glutamina y en glutamina más amonio (o entre amonio bajo y amonio alto), es muy cercana a uno.

El hecho de que los merodiploides tengan actividades de β -galactosidasa similares a las haploides correspondientes, indica que glnF no se autorregula, ya que si lo hiciera, la copia silvestre del episoma, debería reprimir o activar la síntesis de ésta enzima, tal como lo hace con la GS.

El valor de la actividad de β -galactosidasa que presentan en general las cepas (aproximadamente 400 nmol. de producto formado/min./mg. de proteína), corresponde aproximadamente 75% de la actividad que de ésta enzima tendría una cepa silvestre para lac en condiciones de inducción total.

Para probar si las mutaciones en los otros genes relacionados con la regulación de glnA tenían algún efecto sobre la expresión de glnF, se hicieron los experimentos mostrados en la Tabla 7. La ausencia de glnA

(por inserción de Tn5) no tiene ningún efecto sobre la expresión de glnF, así como tampoco lo tiene la ausencia de los productos de glnL y de glnG por lo que puede decirse que estos genes regulatorios no están involucrados en la expresión de glnF.

Las actividades de GS de las dobles mutantes, excepto la glnA :: Tn5, son bajas constitutivas similares a las reportadas para una cepa glnG⁻ que ahora es independiente de si tiene o no glnF silvestre y que esta actividad le es suficiente para crecer en ausencia de glutamina. El hecho de que la glnL82 :: Tn5 tenga actividades muy parecidas a la glnG74 :: Tn5 en ausencia de glnF, puede explicarse en parte, porque esta cepa teóricamente no tendría ni represor ni activador por lo que debería equivaler a la pérdida de glnG el cual se ha propuesto que modula las dos actividades (15), otra posibilidad es que la inserción de Tn5 en glnL sea polar sobre glnG (25) lo que daría una menor expresión de éste gene dando lugar a un fenotipo igual al de una glnG⁻. Esta última explicación se ve apoyada por el hecho de que la cepa que sólo tiene la mutación glnL82 :: Tn5 es Aut⁻.

Se construyeron los merodiploides para la región de glnF de estas cepas utilizando como marcador complementado el gene argG⁻ cromosomal y seleccionando exclusivamente para prototrofia por arginina. Como se nota en la Tabla 7, estos merodiploides tienen actividades muy similares a sus haploides isogénicos de cada una de las enzimas. El hecho de que la cepa glnF80 :: Mud1 glnL :: Tn5 complementada con el episoma KLF41 (glnF⁺) tenga la misma actividad de GS que su haploide, habla en favor de que la inserción de Tn5 en glnL en glnL es polar sobre glnG de manera que

se comporta como una cepa que carece de este gene.

En condiciones de inducción (crecimiento en glutamina o amonio bajo), se sintetizan aproximadamente de 1 a 1.5 unidades de GS por cada unidad de β -galactosidasa; en exceso de nitrógeno se producen de 0.3 a 0.5 unidades de GS por cada unidad de β -galactosidasa. Esta síntesis de β -galactosidasa, es similar a la obtenida con inserciones de Mud1 en glnG en condiciones de inducción (25) (Tabla 8).

En cuanto a la regulación general del sistema, como se mencionó anteriormente en la introducción, S. Kustu y colaboradores (15) proponen un modelo en el cual el producto de glnG puede actuar como represor de la síntesis de glnA, si se encuentra interactuando con el producto de glnL; en cambio, si se encuentra interaccionando con el de glnF, se activa entonces la síntesis del producto de glnA. Magasanik además propone que la pequeña proteína P₁₁ es en realidad la molécula sensible a las concentraciones relativas intracelulares de 2-oxoglutarato y glutamina; cuando esta relación es baja, la P₁₁ en su forma P_{11A} favorecería la interacción entre el producto de glnG y el de glnL para formar el complejo represor; si por el contrario la concentración intracelular de glutamina es baja con respecto a la de 2-oxoglutarato, la P₁₁ uridilada favorecería la formación del complejo activador (16,17): esto es, que P₁₁ actuará, en condiciones de represión como un antiactivador.

Por otra parte, se han hecho estudios de inserciones de Mud1 tanto en glnA (30), como en glnL (31) y como en glnG (25) con el fin de estudiar la regulación de la transcripción de éstos genes. La Tabla 8 --

muestra una recopilación de los datos obtenidos por estos autores.

Las inserciones de Mud1 en glnA, tienen una síntesis de β -galactosidasa que varía con la fuente de nitrógeno, tal como lo hace la GS: en exceso de nitrógeno se reprime, y se induce en limitación del mismo. Como se ve en la inserción haploide, no hay una represión muy marcada en la síntesis de β -galactosidasa: cuando se complementa con episodio que lleva esa región, los niveles de síntesis de la enzima son regulados de igual manera que la GS, indicando que el Mud1 en glnA es polar sobre los genes reguladores siguientes, por lo cual la regulación no es normal, supuestamente por no haber niveles suficientes ni de glnG ni de glnL (30). También se observa que en este tipo de inserciones, la ausencia del producto de glnF abole casi totalmente la síntesis de β -galactosidasa, tal como se espera si el gene lacZ se está expresando a partir del promotor de glnA.

Pahel y colaboradores (25) utilizan inserciones del fago Mud1 en el gene glnG de E. coli. El estudio de estas cepas en diferentes condiciones (Tabla 8), indica primero, que en el haploide la β -galactosidasa no responde a la cantidad de nitrógeno en el medio, como tampoco lo hace la GS; sin embargo, una cepa diploide para esta región, reprime la síntesis de la enzima en exceso de amonio debido a algún producto que le provee en trans el episodio (Tabla 8); cuando se utiliza una cepa que tenga en cis una inserción polar de Tn5 en glnA, la actividad de β -galactosidasa es aproximadamente igual a la de la glnA⁺, lo cual habla de la existencia de otro promotor independiente del de glnA a partir del cual se puede transcribir en ausencia de glnG. Este promotor se reprime en trans por algún pro-

TABLA 8. ACTIVIDADES DE GS Y β -GALACTOSIDASA DE INSERCIIONES DE Mud1 EN glnA, glnL y glnG DE E. coli TOMADAS DE LAS REFERENCIAS INDICADAS

Genotipo relevante	GS μ mol/min/mg.		β -gal. nmol/min/mg.		Referencia
	gln	gln NH ₄	gln	gln NH ₄	
<u>glnA</u> :: Mud1	---	---	13,900	8,170	Rothstein (30)
<u>glnA21</u> :: Mud1, <u>glnF</u> :: Tn10	---	---	--	30	idem
F' <u>glnA</u> ⁺ / <u>glnA21</u> :: Mud1	1.7	0.16	3,440	250	idem
F' <u>glnA</u> ⁺ / <u>glnA21</u> :: Mud1 <u>glnF</u> :: Tn10		--	--	20	idem
<u>glnG</u> :: Mud1	0.06	0.06	400	320	Pahel (25)
<u>glnA</u> :: Tn5 <u>glnG</u> :: Mud1	--	--	265	360	idem
F' <u>glnA</u> ⁺ <u>glnG</u> ⁺ / <u>glnA</u> :: Tn5 <u>glnG</u> :: Mud1	1.0	0.13	9	45	idem
F' <u>glnA</u> ⁺ <u>glnG</u> ⁺ / <u>glnA</u> ⁺ <u>glnG</u> :: Mud1	2.0	0.16	570	70	idem
F' <u>glnA</u> ⁺ <u>glnG</u> :: Tn5/ <u>glnA</u> ⁺ <u>glnG</u> :: Mud1	0.14	0.14	215	250	idem
F' <u>glnA</u> :: Tn 5 <u>glnG</u> ⁺ / <u>glnA</u> ⁺ <u>glnG</u> :: Mud1	1.5	0.1	1230	105	idem
<u>glnL11</u> :: Mud1	0.04	0.04	413	173	Guterman (31)
<u>glnL11</u> :: Mud1 <u>rho</u> 115	0.38	0.06	430	79	idem

ducto provisto por el episoma ya que la actividad en el merodiploide de ésta cepa baja unas 7 veces en las mismas condiciones. La inserción de Tn5 en glnA tiene un efecto polar muy marcado en bajo amonio, ya que la cepa glnA⁺ complementada con el episoma en condiciones de inducción tiene unas 50 veces más actividad que la glnA :: Tn5 en la misma condición: en cambio en represión la actividad es sólo 2 veces más baja en esta cepa: esto nos lleva a proponer que en condiciones de limitación de nitrógeno la expresión de glnG depende del promotor de glnA, y aparentemente, la expresión a partir del promotor distal es más fuerte en condiciones de represión.

Por lo que respecta a la inserción de Mud1 en glnL mostrada en la Tabla 8, parece ser una mutación polar sobre glnG ya que las actividades de GS son bajas constitutivas, y en cuanto a la actividad de β -galactosidasa, se observa que parece reprimirse un poco por exceso de amonio (unas 2 veces). Cuando se miden estas actividades en una derivada de esta cepa con una mutación en el factor de terminación rho (que aliviaría la polaridad), hay una represión por amonio de unas 4 veces de la β -galactosidasa; también aumenta la inducción de la GS por limitación de nitrógeno,

Parecería como si glnL estuviera sometido a la misma regulación que glnA, lo que quizá sería contradictorio debido a que en condiciones de represión debería haber más producto de glnL ^{para reprimir efectivamente, es posible que el transcrito de glnL} esté sometido a una regulación postranscripcional; en el laboratorio de A. Covarrubias se ha visto que plásmidos que llevan glnL y glnG y que se transcriben a partir de un promotor interno del plásmido, parecen sintetizar mucho menores cantidades del pro--

ducto de glnL que del de glnG en minicélulas.

Se sabe por otro lado que mutaciones en gltB, que es el gene que codifica para la enzima GOGAT, confieren el fenotipo Reg^- y que éste se puede suprimir por otra mutación en glnL (1,2,11): además por datos - obtenidos en el laboratorio, sabemos que un exceso de glnG (clonado en un plásmido multicopia) no suprime el fenotipo Reg^- de la mutación gltB31 - por lo que no es suficiente elevar las cantidades de glnG para suprimir - este fenotipo Reg^- , ya que podría suponerse que si hay un exceso de glnG, y como glnF es constitutivo, habría más posibilidad de formar el complejo activador que favorecería la transcripción de los operones catabólicos. - Todos estos datos sugieren que el producto de glnL es un represor muy fuerte, es decir, que basta con pocas moléculas para ejercer una marcada re- presión.

También se conoce que mutaciones polares por inserción de Mu en glnA, complementan a otra mutación en glnG dispuesta en trans, sólo en cuanto a la regulación de la síntesis de GS, pero no para activar la trans cripción de los operones catabólicos Aut o Put (14): de manera que es ne- cesario que los genes glnA⁺ y glnG⁺ estén dispuestos en cis para desrre- pri mir los demás operones. Se ha propuesto que la transcripción a partir del promotor de glnA es mayor que la que viene del promotor distal, y que se - requiere tener altos niveles de glnG para estimular la transcripción de -- los operones Reg: niveles que no se obtienen cuando se transcribe a partir del promotor interno del operón (32,33). Es necesario además, tener el - gene glnF intacto para que la célula utilice arginina, histidina, prolina,

etc. como fuentes de nitrógeno (32) por lo que una vez más, aparentemente es importante para la célula tener altos niveles del producto de glnG y del de glnF para contrarrestar la fuerte represión que promueven bajos niveles relativos de glnL.

Una cepa glnL⁻ no polar, en alto amonio tiene una actividad de GS de aproximadamente 0,7 $\mu\text{mol}/\text{min.}/\text{mg.}$ de proteína, y en bajo amonio es de unas 2 μmol ; es decir, que en estas condiciones la activación es normal, el problema de esta cepa glnL⁻ es que no puede reprimir la GS totalmente ya que la actividad en estas condiciones es solamente de 2 a 3 veces menor; en cambio la silvestre se reprime por un factor de 10 veces. Probablemente es la proteína P₁₁ la responsable de esta pequeña represión o antiactivación observada en la cepa glnL⁻ no polar en alto amonio. Así pues debe ser glnL la molécula que reprima las otras 4-5 veces la síntesis de glnA y quizá por esta razón la célula necesite de grandes cantidades del producto de glnF para contrarrestar la fuerte represión ejercida por pocas cantidades relativas del producto de glnL.

Si glnL no está sujeto a regulación postranscripcional y en condiciones de desrepresión está elevado, tal como lo sugiere la inserción de Mud1 en este gene (Tabla 8), entonces sería necesario tener muy altos los niveles de glnF para activar. Ahora bien, en exceso de nitrógeno probablemente P₁₁ evite que se forme eficientemente el complejo activador, y sería suficiente con la baja producción del producto de glnL observado en estas condiciones para reprimir totalmente la transcripción de glnA.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo, utilizando 2 fusiones de Mud1 con la región regulatoria de glnF, indican -- que la transcripción de éste gene, no está sometida a regulación por la accesibilidad de nitrógeno, ni por su propio producto, así como tampoco parece responder a los genes reuladores glnL y glnG ya que la actividad de β -galactosidasa no cambia significativamente ni por la accesibilidad de nitrógeno, ni por la presencia del gene glnF silvestre, ni por mutaciones en glnA ó en glnL ó en glnG (Tablas 5 y 7). De ésta manera, glnF es un gene que se sintetiza constitutivamente a deferencia de glnG (25) y de algunos otros genes reuladores que si responden a algún tipo de regulación.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Tyler, B.: Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 1127-1162 (1978).
- 2) Magasanik, B., Prival, M.J., Brencheley, E., Tyler, B., Deleo, A.B., Sreicher, S.L., Bender, R.A., Paris, C.G.: Glutamine synthetase as a regulator of enzyme synthesis. *Curr. Topics in Cell Reg.* Vol. 8 pp 119-139 (1974).
- 3) Bachman, B.J., Brookslow, K. : Linkage map of E. coli K-12 Edition 6 *Microbiol. Rev.* 44: 1-56 (1980).
- 4) Standman, E.R., Ginsburg, A.: The glutamine synthetase of Escherichia coli: structure and control. *The Enzymes* Paul Boyer (ed) Vol. X (3^o edición). Capítulo 24 pp 755-807 Academic Press (1974).
- 5) Stadman, E.R., Mura, V., Boom Chock, Rhee G.S.: The interconvertible enzyme cascade that regulates glutamine synthetase activity en Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation. Mora J. Palacios, R. (eds). Academic Press, N.Y. (1980).
- 6) Stricher, S.J., Bender, R.A., Magasanik, B.: Genetic control of glutamine synthetase in K. aerogenes. *J. Bact.* 121: 320 (1975).
- 7) Foor, F., Janssen, K.A., Magasanik, B.: Regulation of glutamine synthetase by adenylylated glutamine synthetase. *PNAS*: 72: 4844 (1975).
- 8) Janssen, K.A., Magasanik, B.: Glutamine synthetase of Klebsiella aerogenes: Genetic and physiological properties of mutants in the adenylylation system. *J. Bact.* 129: 993-1000 (1977).

- 9) García, E., Bancroft, S., Rhee, G.S., Kustu, S.: The product of a newly identified gene glnF is required for synthesis of glutamine synthetase in Salmonella.
- 10) Gaillardin, C.M., Magasanik, B.: Involvement of the product of glnF gene in the autogenous regulation of glutamine synthetase formation in Klebsiella aerogenes. J. Bact. 133: 1329-1338).
- 11) Pahel, G., Zelenetz, A.D., Tyler, B.M.: "bltB gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in Escherichia coli. J. Bact. 133: 139-138 (1978).
- 12) Kustu, S., Burton, D., García, E., McCarter, L., McFarland, N.: Nitrogen control in Salmonella: regulation by glnR and glnF gene products. PNAS 76: 4576-4580 (1979).
- 13) Leonardo, K.M., Goldberg, R.B.: Regulation of nitrogen metabolism in glutamine auxotrophs of Klebsiella pneumoniae. J. Bact. 142: 99-110 (1980).
- 14) Pahel, G., Tyler, B.: A new glnA-linked regulatory gene for glutamine synthetase in Escherichia coli. PNAS 76: 4544-4548 (1979).
- 15) McFarland, N., McCarter, L., Artz, S., Kustu, S.: Nitrogen regulatory locus glnR of enteric bacteria is composed of cistrons ntrC and ntrB: identification of their protein products" PNAS 78: 2135-2139 (1981).
- 16) Foor, F., Reuveny, Z., Magasanik, B.: "Regulation of the synthesis of glutamine synthetase by the P₁₁ protein in Klebsiella aerogenes. PNAS 77: 2636-2640 (1980).
- 17) Reuveny, Z., Foor, F., Magasanik, B.: Regulation of glutamine synthetase by regulatory protein P₁₁ in Klebsiella aerogenes mutants lacking adenylytransferase. J. Bact. 146: 740-745 (1981).

- 18) Casadaban, M.K., Cohen, S.N.: Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: In vivo probe for transcriptional control sequences. PNAS 76: 4530-4533 (1979).
- 19) Miller, J.M. Experiments in Molecular Genetics 2a. Edición. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1972).
- 20) Covarrubias, A.A., Sánchez-Pescador, R., Osorio, A., Bolívar, F., Bastarrachea, F.: Col El hybrid plasmids containing Escherichia coli genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine. Plasmid 3: 150-169 (1980).
- 21) Swanstron, M., Adams, M.H.: Agar layer method for production of high titer phage stocks. Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 78: 372 (1951).
- 22) Bender, R.A., Janssen, K.A., Resnick, A.D., Blumberg, M., Foor, F., Magasanik, B.: Biochemical parameters of glutamine synthetase from Klebsiella aerogenes. J. Bact. 129: 1001-1009 (1977).
- 23) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurements with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951).
- 24) Fuchs, R.L., Madonna, J.M., Brencheley, J.E.: Identification of the structural genes of glutamate synthase and genetic characterization of this region of Salmonella typhimurium chromosome. J. Bact. 149 906-915 (1982).
- 25) Pahel, G., Rothstein, D., Magasanik, B.: Complex glnA, glnL, glnG operon of Escherichia coli. J. Bact. 150: 202-213 (1982).
- 26) Wanner, B.L., Wieder, S., McSharry, R.: Use of bacteriophage transposon Mud1 to determine the orientation for three proC-linked phosphate-starvation-inducible (psi) genes in Escherichia coli K-12. J. Bact. 146: 93-101 (1981).

- 27) van de Putte, P.G., Westmass, M., Wigfferman, G. and C.: On the kil gene of bacteriophage Mu En A.I. Bukhari, J.A., Shapiro, S.L. Adhya (ed) DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1977).
- 29) Low, B.: Formation of merodiploids in matings with a class of rec⁻ recipient strains of Escherichia coli K-12. PNAS 60: 160 (1968).
- 30) Rothstein, D.M., Pahel, G., Tyler, B.: Magasanik, B.: Regulation of expression from the glnA promoter of Escherichia coli in the absence of glutamine synthetase. PNAS 77: 7372-7376 (1980).
- 31) Guterman, S.K., Roberts, G., Tyler, B.: Polarity in the glnA operon: supression of the Reg⁻ phenotype by rho mutations. J. Bact. 150: 1314-1321 (1982).
- 32) Tyler, B., Bloom, F., Pahel, G.: Regulation of nitrogen metabolism in Escherichia coli. En Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation, Mora, J., Palacios, R. (eds). Academic Press, N.Y. (1980) pp. 69-79.
- 33) Magasanik, B., Rothstein, D.: The role of glutamine synthetase in the regulation of bacterial nitrogen metabolism. idem. pp. 61-67.
- 34) Stacey, K.A. and Simson, E.: Improved method for the isolation of thymine-requiring mutants of Escherichia coli. J. Bact. 90: 554-555. (1965).
- 35) Bastarrachea, F., Brom, S., Covarrubias, A.A., Osorio, A., Bolívar, F. Genetic characterization of mutations affecting glutamine biosynthesis and its regulation in Escherichia coli K-12. En Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation, Mora J., Palacios, R. (eds). Academic Press, N.Y. (1980).

- 36) Meers, J.L., Tempes, D.W., Brown, C.M.: "Glutamine (amide); 2-oxo-glutarate amino transferase oxido-reductase (NADP)" an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 64: 187-192 (1970).
- 37) Savageau, M.A.: Autogenous and classical regulation of gene expression: a general theory and experimental evidence. En Biological Regulation and Development Goldberger, R.F. (ed) Plenum Press New York and London pp. 57-108.
- 38) Magasanik, B.: Regulation of the hut system, en The Operon GSH Lab. 2a. Ed. Miller, J. y Reznikoff, W.S. (eds) pp. 373-387 (1978).
- 39) Lee, N.: The molecular aspects of ara regulation. idem pp. 389-409.
- 40) Menzel, R., Roth, J.: Regulation of the genes for proline utilization in Salmonella typhimurium: autogenous repression by putA gene product. *J. Mol. Biol.* 148: 21-44 (1981).
- 41) Eisen, H., Bache, P., Pereira da Silva, L., Jacob, F.: Regulation of repressor expression in λ , *PNAS* 66: 855-862 (1970).
- 42) van de Putte, P., Giphart-Gassler, M., Goosen, N., Goosen, T., van Leerden, E.: Regulation of integration and replication functions of bacteriophage Mu. *C.S.H.Q.B.* 45: 347-353 (1980).
- 43) Chou, J., Casadaban, M., Lemaux, P., Xohen, S.N.: Identification and characterization of a self regulated repressor of translocation of the Tn3 element. *PNAS* 76: 4020. (1979).