

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

03062
29/11

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

"CARACTERIZACION DE UNA MUTACION QUE
PERMITE LA EXPRESION CONSTITUTIVA DEL
GENE REGULADOR glnG EN Escherichia coli"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A

JULIO CESAR URBINA ORANTES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

Este trabajo se realizó en los Laboratorios del Dr. Fernando Bastarrachea Avilés (Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, e Instituto de Fisiología Celular) y de la Dra. Alejandra Covarrubias Robles (Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno), de la U.N.A.M.

Me parece que sólo he sido como un niño
jugando en una playa, que se divierte
al encontrar de vez en cuando una guija
más lisa o una concha más bonita que de
costumbre, en tanto que el enorme océano
de la verdad yace ante él sin ser descu-
bierto.

Isaac Newton.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	14
MATERIALES Y METODOS	17
RESULTADOS	25
DISCUSION	39
BIBLIOGRAFIA	46

INTRODUCCION

El nitrógeno es un elemento fundamental en la estructura y función de las macromoléculas biológicas. Para esto, los organismos han desarrollado estrategias evolutivas que les permiten utilizar eficazmente los recursos nitrogenados disponibles. Así, por ejemplo, los microorganismos que habitan medios susceptibles a variaciones en su composición química, están dotados de la capacidad de utilizar una amplia gama de compuestos nitrogenados, orgánicos e inorgánicos, como fuente de nitrógeno celular.

En las enterobacterias, la fuente favorita de nitrógeno es el amonio, cuya asimilación depende de dos vías conocidas: una que se debe a la producción de glutamina a partir de amonio y glutamato, por una reacción dependiente de ATP, catalizada por la enzima glutamino sintetasa (GS); y la otra que ocurre gracias a la participación de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH), que cataliza la formación de glutamato a partir de la aminación reductiva del 2-oxoglutarato por el amonio (1). Las acciones de estas enzimas, aunadas a la participación de la glutamato sintasa ---- (GOGAT), responsable de la síntesis del glutamato a partir del 2-oxoglutarato y glutamina; están articuladas en un sistema coordinado de asimilación de amonio y biosíntesis de glutamina y glutamato, los intermediarios claves en el metabolismo nitrogenado de las bacterias.

La importancia bioquímica de la glutamina radica en que su grupo amido funge como el donador directo de nitrógeno para la síntesis de ciertos aminoácidos, purinas, pirimidinas y otros compuestos importantes para la economía microbiana (figura 1).

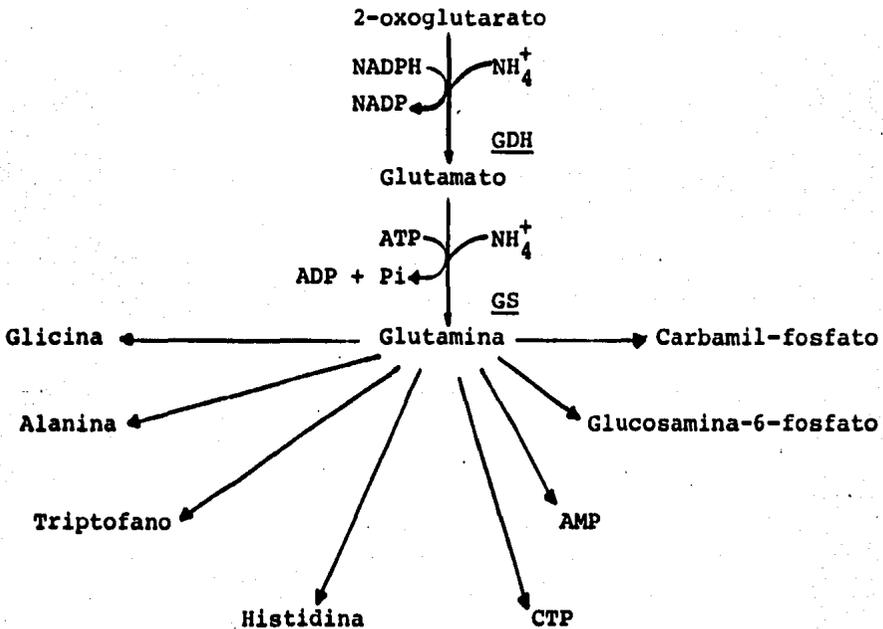
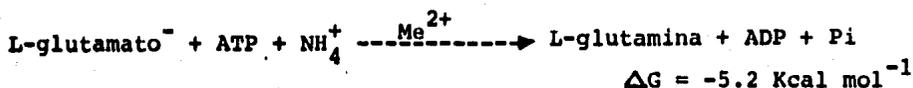


FIGURA 1. Destino metabólico de la glutamina en las enterobacterias (2).

Así, dado que la glutamina ocupa un lugar relevante en el metabolismo nitrogenado, la GS se sitúa como un blanco crucial para el control metabólico, ya que es la primera enzima de una ruta

metabólica profusamente ramificada, que conduce en última instancia a la síntesis de casi todas las macromoléculas importantes para la célula.

Para comprender con mayor detalle la función global de la GS en las enterobacterias, se han realizado numerosas investigaciones desde diversos puntos de vista. En primer término, las investigaciones sobre la estructura de la enzima en Escherichia coli (3), han revelado que se trata de una proteína oligomérica, compuesta de doce subunidades idénticas, ordenadas en dos planos hexagonales, -- uno frente al otro. Cada subunidad posee la facultad de catalizar, en forma independiente, la siguiente reacción:



En lo que respecta a la regulación de la GS, los estudios realizados (3,4) han revelado resultados muy interesantes que indican que la enzima puede ser controlada a dos niveles: tanto en su actividad enzimática per se, como en su biosíntesis.

La regulación de la actividad enzimática de la GS se ejerce por tres mecanismos distintos (4): (i) por la retroinhibición acumulativa de algunos productos terminales del metabolismo de la glutamina; (ii) por la interconversión de las formas relajada (inactiva) y tensa (activa) en respuesta a variaciones en las concentraciones de cationes divalentes; y (iii) por la modificación covalente de la enzima -adenilación y desadenilación- que determinan

el potencial catalítico de la GS. Este último mecanismo es el que mejor se ha estudiado y su importancia radica en que es una estrategia fisiológica de respuesta rápida a variaciones ambientales en la disponibilidad de nitrógeno. Este mecanismo consta de un sistema bicíclico en cascada (5). En un ciclo, las subunidades de la GS son continuamente adeniladas y desadeniladas por la enzima adenil-transferasa (ATasa o P_I). La adenilación de alguna subunidad produce la inactivación catalítica de la misma, de modo que la actividad global de la enzima es inversamente proporcional a la fracción promedio de subunidades que están adeniladas. En el otro ciclo, la proteína reguladora P_{II} es uridilada y desuridilada continuamente, posiblemente por la misma enzima, la uridil-transferasa -- (UTasa). Ambos ciclos, uridilación y adenilación están ligados in vivo porque la forma no uridilada de la proteína reguladora (P_{IIA}), estimula la actividad adeniladora de la ATasa; mientras que la conformación uridilada de P_{II} (P_{IID}) promueve la desadenilación de la GS, a través de la acción de la ATasa. Se ha propuesto que las concentraciones intracelulares y la proporción: 2-oxoglutarato/glutamina, son los parámetros fisiológicos más importantes que determinan el estado promedio de adenilación de la GS, y en general de su actividad enzimática (6). Esto es, que cuando hay amonio en exceso, se formará glutamina a expensas del 2-oxoglutarato (Ver figura 1) y, consecuentemente, se activa la adenilación de la GS; pero si el amonio es escaso, entonces la proporción 2-oxoglutarato/glutamina se invierte y tendrá lugar -

la desadenilación de la GS (figura 2) (2).

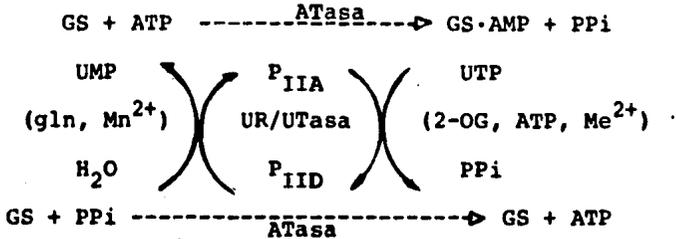


FIGURA 2. Sistema bicíclico de control en cascada de la actividad enzimática de la GS (5). Abreviaturas: gln= glutamina, 2-OG=2-oxoglutarato, Me^{2+} = catión divalente, UR=actividad removedora del grupo uridilo de la ATasa, GS·AMP=GS adenilada.

El segundo nivel de regulación de la GS está dado por un sistema complejo que controla la síntesis de la enzima. Este sistema genético de control responde a las condiciones de disponibilidad de nitrógeno en el medio, es decir, que cuando hay limitación, por ejemplo, a bajas concentraciones de amonio o en presencia de fuentes pobres de nitrógeno, como arginina o incluso glutamina; los niveles enzimáticos son de cinco a diez veces más altos que en condiciones de abundancia de amonio. - Inclusive, esta diferencia puede hacerse mayor cuando las células se crecen en distintos medios, p.e., Klebsiella aerogenes crecida en un medio rico en amonio pero con una fuente pobre de carbono (v.g. histidina), posee niveles de GS alrededor de cien

veces más bajos que cuando crece en medio mínimo con glucosa y amonio limitante (7). En base a este hecho, Bender y Magasanik (8) han sugerido que esta diferencia no resulta simplemente de una represión por amonio, sino más bien de la proporción 2-oxo glutarato/glutamina, que así como gobierna la adenilación y desadenilación de la GS, también controla de algún modo la expresión de glnA, el gene estructural de la GS (9). Apoyan esta hipótesis los hallazgos de Weglenski y Tyler (10), quienes encontraron una correlación positiva entre los niveles de actividad intracelular de la GS y los niveles detectables del RNA mensajero de glnA en K. aerogenes. Así, resulta evidente que la regulación de la --- síntesis de la enzima ocurre, en primer término, a nivel de transcripción.

Diversos estudios genéticos y fisiológicos han conducido a la conclusión de que la expresión del operón glnALG está modulada por la interacción compleja de los productos proteicos de glnL y glnG, miembros del propio operón, y de los genes no ligados glnF, glnB y glnD. Los productos glnL, glnG y glnF son proteínas reguladoras tanto de la expresión del operón como de la síntesis de enzimas responsables de proporcionar amonio intracelular a partir de otras fuentes de nitrógeno. Los productos de glnB (P_{II}) y glnD (UTasa) están implicados en la modificación covalente de la GS, empero, también participan de la regulación genética de la expresión de glnA.

En E. coli, el operón glnA-glnL-glnG ocupa una región continua de aproximadamente 4,500 pares de bases (pb), suficientes -

para codificar a tres productos proteicos de 55,000, 36,000 y 50,000 daltones de peso molecular, respectivamente (7). Este operón, se encuentra localizado en el minuto 86 del mapa cromosómico de E. coli (11, 12) y su expresión procede de glnA hacia glnG (13, 14, 15). Sin embargo, el análisis de cepas merodiploides con mutaciones por inserción del profago Mu en glnA y glnG, en posición trans, exhibieron regulación normal de la GS, aunque fueron incapaces de utilizar arginina como fuente alternativa de nitrógeno (fenotipo denominado Aut⁻) (16). Este hecho, permitió postular que la expresión del operón procede, por lo menos, de dos promotores: uno localizado en glnA y el otro entre glnA y glnG. Posteriormente, Pahel y colaboradores (11), empleando inserciones del profago especializado Mu dl (lac bla) en glnG, midieron la expresión de éste, ya que el genoma viral insertado en la orientación correcta, sujeta la expresión del operón lac exento de su promotor, bajo la dirección del promotor que modula la transcripción de glnG. Así, estos autores analizando los niveles de la β -galactosidasa encontraron que glnG expresa en forma similar a glnA, es decir, que en condiciones de limitación de nitrógeno, hay una elevada transcripción de glnG procedente del promotor de glnA, pero en condiciones de abundancia de amonio en el medio, la expresión a partir de dicho promotor se reprime, aunque glnG se transcribe a una tasa menor desde un promotor distal a glnA, localizado en glnL (17). Aunque la expresión de glnG a partir de este promotor es suficiente para regular normalmente la síntesis de la GS, es insuficiente para activar la expresión de los sistemas responsables de la utilización de fuentes alternativas de ni-

trógeno (v.g. arginina, prolina, histidina, etc.), denominados sistemas regulados por nitrógeno (sistemas Ntr).

Sobre las características de los genes glnL y glnG, --- MacNeil, Roberts y Tyler (18), diseccionan genéticamente algunas propiedades funcionales de los productos proteicos de estos genes, encontrando que ambas proteínas son bifuncionales. Esto es, que el producto de glnG es regulador positivo de la expresión de glnA y de los sistemas Ntr, en condiciones limitantes de nitrógeno; pero en las condiciones contrarias actúa como represor de glnA. Asimismo, el producto de glnL puede ejercer control negativo sobre la síntesis de la GS, pero parece ser que también es requerido para la desrepresión de los sistemas Ntr. Incluso se propuso que la modificación de activador a represor que sufre el producto de glnG es catalizada por el producto de glnL, que aparentemente es el transmisor de la información relacionada con la disponibilidad de nitrógeno en el medio, proporcionada por las proteínas P_{II} y $UTasa$ (17, 19, 20). En relación al producto de glnF, todos los datos obtenidos (7, 21, 22) indican que actúa como regulador positivo de la expresión de glnA y sistemas Ntr.

Resultados obtenidos recientemente por diversos laboratorios (23, 24, 25, 26, 27) han demostrado que el operón glnALG en las enterobacterias posee un mecanismo global de regulación más complejo. En primer término se ha demostrado que el gene glnA de E. coli, posee dos promotores funcionales (24, 27). El promotor más lejano de la fase de lectura del gene, denominado

glnAp1, sólo es funcional cuando hay en el medio una fuente pobre de carbono (v.g. histidina) y amonio abundante. Este hecho apoya el hallazgo de una secuencia nucleotídica homóloga al sitio de -- unión del complejo AMPc-CAP que precede a glnAp1, lo que hace suponer que este promotor responde a las condiciones metabólicas de - carbono (24, 27). Además, se ha establecido que este promotor es reprimido, en condiciones limitantes de amonio, por el producto - de glnG, ahora denominado regulador de la asimilación de nitrógeno I, -NR_I-, por Reitzer y Magasanik (28).

El segundo promotor, glnAp2, está localizado contiguo al primer promotor, pero más cercano de la fase abierta de lectura -- del gene. Este promotor es el principal responsable de la trans-- cripción de los tres genes cuando las células crecen en medio limi-- tante de nitrógeno. La calidad de la fuente nitrogenada determina el nivel de expresión de este promotor, que es activado por la --- acción coordinada de NR_I y el producto de glnF (27). Se ha postulado (24) que el producto de glnL, denominado NR_{II} (29), está involucrado en la conversión de NR_I de una forma activa, presente en las células limitadas de nitrógeno, a una forma inactiva y viceversa. La forma activa puede activar a glnAp2 y reprimir a glnAp1, - mientras que la forma inactiva, presente en abundancia de amonio, - reprime a glnAp1 y al promotor de glnL, glnLp. La conversión de las formas de NR_I depende de la información que NR_{II} recibe de los productos de glnB (P_{II}) y glnD (UTasa).

Otro hallazgo interesante es la demostración de que el producto de glnF es copurificado con la holoenzima RNA polimerasa

($E\sigma^{70}$) (30). Además, en presencia de la meroenzima RNA pol (E), el producto de glnF es capaz de unirse e iniciar la transcripción de glnA, a partir de glnAp2, en presencia de NR_I , in vitro. Estos resultados han sugerido que el producto glnF es una nueva subunidad sigma (σ), específicamente activa para la transcripción de los promotores regulados por nitrógeno, incluyendo los de fijación de nitrógeno (nif) de enterobacterias (30, 31). Hunt y Magasanik (29) proponen denominar rpoN a glnF y sigma-60 (σ^{60}) a su producto. En cuanto a la expresión de este gene, los estudios genéticos realizados en E. coli (32) y en K. pneumoniae (31) señalan que no hay regulación transcripcional del promotor de glnF por nitrógeno.

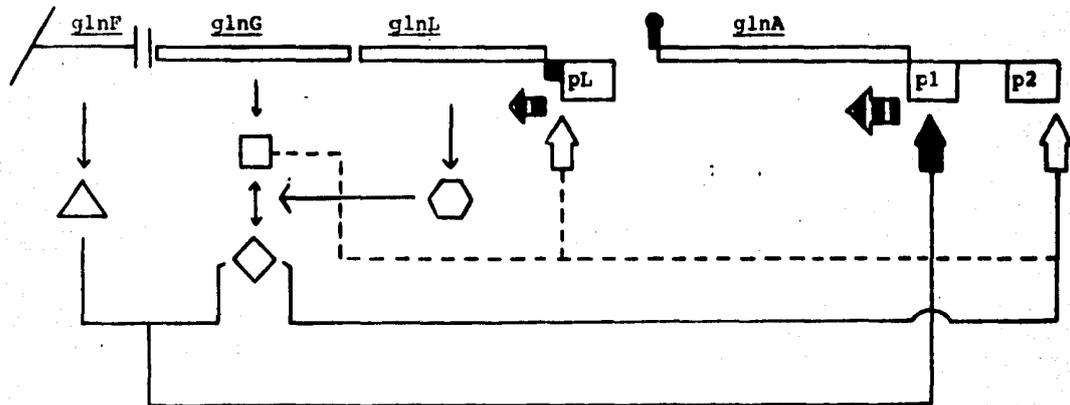
Con relación al promotor de glnL cabe agregar que se trata de un promotor estándar, reconocido por la holoenzima RNA polimerasa con la subunidad σ^{70} . Sin embargo, contiguo al promotor se encuentra una zona de 19 pares de bases (pb) que es reconocida por el dímero de NR_I y que funge como operador de la expresión de glnL y glnG (33). Dicha secuencia es homóloga al sitio operador del promotor glnAp1 (34, 35). Además, en esta región se ha encontrado un terminador potencial rho independiente, antes del promotor de glnL. Este terminador, reduce la transcripción entre glnA y glnL en un 60-70%, empero, la presencia de glnLp garantiza un adecuado abastecimiento de NR_I y NR_{II} .

Resumiendo, el operón glnALG consta de tres promotores - que permiten la expresión diferencial de los genes. Así, en glnA

existen dos promotes, glnAp1 y glnAp2. El primero se utiliza en condiciones de abundancia de amonio y con una fuente pobre de carbono, y el segundo, glnAp2, es el principal promotor de glnA y se activa notablemente por σ^{60} y NR_I . en condiciones limitantes de nitrógeno, mientras que glnAp1 y glnLp son reprimidos por NR_I . -- Cuando la fuente de nitrógeno es abundante, la activación de glnAp2 es reducida por efecto de NR_{II} . Los estudios de Bueno et al (36) sugieren que el producto de glnL, NR_{II} , en combinación con P_{II} convierten NR_I a una forma incapaz de activar la transcripción en -- glnAp2; pero en condiciones limitantes de nitrógeno en el medio, la proporción 2-oxoglutarato/glutamina aumenta, lo que causa que el producto de glnD, UTasa, convierta P_{II} a la forma inocua P_{II} -UMP y modifica a NR_{II} para que éste transforme a NR_I , de su forma inactiva a su forma activadora de la transcripción de glnA y genes Ntr. Datos recientes (37) indican que NR_{II} es capaz de fosforilar -en presencia de ATP- a la proteína NR_I induciendo así su función activadora, que es revertida cuando la misma proteína NR_{II} remueve el fosfato de NR_I . Así, cuando la concentración de amonio es baja y la UTasa convierte a P_{II} en P_{II} -UMP, entonces, induce a que NR_{II} se comporte como una NR_I -kinasa que fosforila a NR_I , quien induce la transcripción de glnA. Un incremento en la concentración de amonio provoca que la UTasa remueva al grupo uridilo de la proteína P_{II} , entonces, NR_{II} se modifica a una NR_I -fosfato fosfatasa que remueve el fosfato de NR_I , reprimiendo así la expresión de glnA y sistemas Ntr. Sin embargo, en ausencia de NR_{II} , el producto de glnG sigue teniendo propiedades activadora y represora, lo que implica que otro producto es capaz de modificar a NR_I , -

aunque en ausencia de NR_{II} , NR_I -el producto de glnG- parece funcionar mas como activador que como represor.

En la figura 3 se esquematiza un modelo sencillo de cómo se controla la expresión del operón complejo glnALG (7, 11, 12, 13, 15, 19, 24, 27, 29, 33).



- △ = σ^{70}
- = NR_I
- ◇ = NR_I (fosforilado)
- ⬡ = NR_{II}
- ↑ = Reprise
- ⬆ = Activa
- ← = Transcripción
- ⌞ = Terminador rho-independiente de glnA
- = Operador de glnL

FIGURA 3. Modelo de regulación de la expresión del operón glnALG de Escherichia coli. pL = promotor de glnL, p1 = glnAp1, p2 = glnAp2.

ANTECEDENTES

En el laboratorio se caracterizó una mutación por inserción del transposón Tn₅ en el gene glnL de E. coli (38). Esta mutación (glnL82::Tn5) posee la característica de ejercer efecto polar sobre la expresión de glnG, por los siguientes criterios:

- i) A diferencia de una mutación en glnL no polar (glnL83), - que permite la síntesis alta constitutiva de la GS (fenotipo GlnC); la cepa portadora de la mutación glnL82::Tn5, MX960, presenta niveles bajos de actividad de la GS (esto considerando que la actividad enzimática total es un reflejo de la concentración intracelular de la enzima), lo que permite suponer que la expresión de glnG es baja en esta cepa.
- ii) La presencia del gene glnG silvestre en un plásmido multicopia, pACR3, en la cepa MX960, confiere el fenotipo GlnC.
- iii) En general, las inserciones de transposones, particularmente el Tn₅, exhiben efecto polar sobre la expresión de genes contiguos, transcripcionalmente ligados (39).

Estas evidencias ponen de manifiesto que cuando el producto de glnL (NR_{II}) está defectuoso o ausente, las células portadoras son capaces de activar constitutivamente la transcripción de glnA, lo que ha sugerido que NR_{II} posee más bien una función antiactivadora. Esto per se explica el fenotipo GlnC de numerosas mutaciones

en glnL (7, 11, 15, 17, 18, 40, 41), pero cuando dichas mutaciones son polares sobre glnG impiden su expresión y, por lo tanto, la activación de la expresión de glnA. De ahí que sus niveles de GS -- sean bajos tanto en condiciones de limitación como de abundancia -- de amonio. A este fenotipo se le denomina GlnR.

Con respecto a la mutación glnL82::Tn5 (figura 4), sugerimos que la polaridad sobre la expresión de glnG no es total, ya que la mutante MX960 posee cierta regulación parcial de la síntesis de la GS y no el fenotipo esperado GlnR. Este hecho, nos ha permitido conjeturar sobre la posible existencia de un promotor secundario entre glnL y glnG que permita la expresión débil de glnG, suficiente para ejercer cierta regulación sobre glnA, aunque insuficiente para activar el sistema Ntr de utilización de arginina como fuente única de nitrógeno (fenotipo Aut⁻).

En el presente trabajo se describe el aislamiento y caracterización de una mutación que permite la expresión constitutiva de glnG, a partir de una cepa portadora de una inserción del transposón Tn5 en glnL. Además, se presentan algunas evidencias que apoyan -- fuertemente la idea sobre la existencia de un promotor propio en -- glnG.

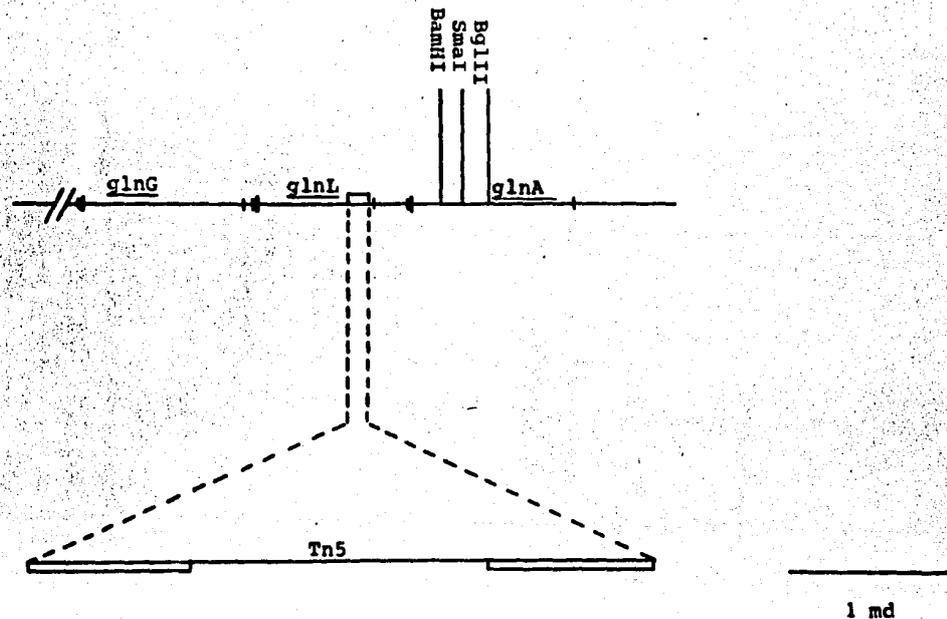


FIGURA 4. Localización de la mutación *glnL82::Tn5* en la cepa MX960. El transposón Tn5 está situado entre 100 y 170 p.b. "abajo" del sitio de iniciación de la transcripción de *glnL*. Los sitios de restricción se señalan como referencia.

MATERIALES Y METODOS

CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS. Las cepas bacterianas empleadas en este trabajo son derivadas de Escherichia coli K-12 y se describen en la tabla 1, así como también los plásmidos empleados, cuya descripción genética se ilustra en la figura 5.

MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO. Los medios de cultivo - empleados, medio mínimo (NN) y medio nutritivo complejo Luria modificado por la exclusión de glucosa, han sido descritos con anterioridad (42). Al medio mínimo, se le agregó glucosa en solución a una concentración final del 0.2%, como fuente de carbono; y como fuente de nitrógeno se emplearon 0.5 y 15 mM de NH_4Cl , para condiciones de limitación y abundancia, respectivamente. También se utilizó glutamina (1 mg/ml) para la condición limitante de nitrógeno y para las cepas auxótrofas de glutamina; y el uso de arginina (0.2%) fue para determinar el fenotipo Ntr. Otros suplementos nutricionales adicionados al medio mínimo, para satisfacer ciertos requerimientos metabólicos, se utilizaron en concentraciones que fluctuaron, según el caso, de 5×10^{-4} a 2×10^{-3} M. Para los medios sólidos se añadió bacto-agar a una concentración final del 1.5%. Cuando fue requerido, se emplearon antibióticos para preservar la presencia de agentes que confieren resistencia a estas sustancias (v.g. plásmidos y el Tn5). Así, se usaron kanamicina (50 $\mu\text{g/ml}$) y ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$).

Los cultivos se incubaron a 37°C, empleándose agitación - mecánica cuando se usaron medios líquidos. La densidad celular -

A. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

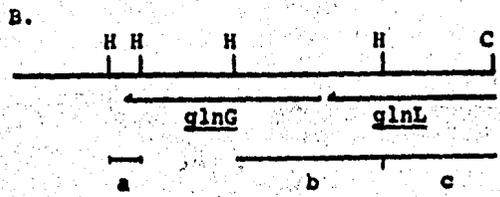
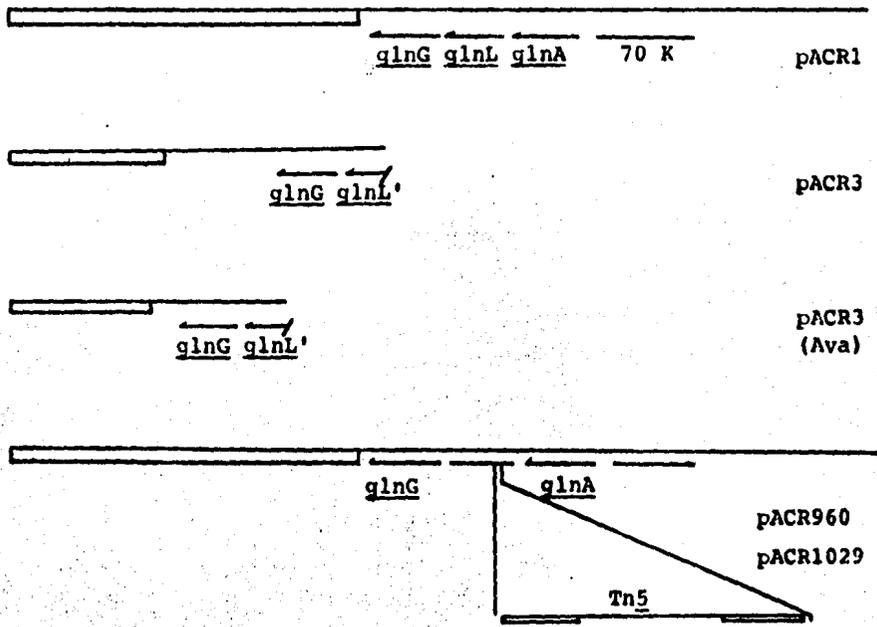


FIGURA 5. Mapas genéticos de los plásmidos empleados: A. Mapas topográficos de los plásmidos, indicando los genes del operón glnALG de E. coli; las barras blancas indican la región propia de los plásmidos, y la línea la región del cromosoma bacteriano clonada; B. Detalle sobre algunos sitios de restricción y fragmentos de DNA utilizados como detectores de la región glnL-glnG. Símbolos: ' = gene incompleto, H = sitio de HinfI, C = sitio de ClaI, a = fragmento HG2, b = frag. HG1 y c = fragmento HL1.

TABLA I. CEPAS DE Escherichia coli Y PLASMIDOS EMPLEADOS.

CEPA O PLASMIDO	DESCRIPCION	FUENTE O DERIVACION
<u>E. coli</u>		
MX614	$\Delta(\text{pro-lac})$ <u>galE</u> <u>ilv-680</u> <u>thi-1</u>	50
MX734	MX614 <u>glnA71::Tn5</u>	23
MX914	$\Delta(\text{pro-lac})$ $\Delta(\text{gal att}\lambda \text{ bio})$ <u>supF</u> <u>ilv-680</u> <u>thi-1</u> <u>lamB</u> $\Delta(\text{glnALG-rha})$	23
MX924	MX914 (pACR1)	25
MX943	MX914 Sm^r espontánea	F.B.A.*
MX960	MX614 <u>glnL82::Tn5</u>	38
MX1019	MX614 <u>glnL83</u>	F.B.A.*
MX1029	MX614 <u>glnL82::Tn5</u> <u>glnG85</u>	Este trabajo
MX1030	MX614 <u>glnL82::Tn5</u> <u>gln-86</u>	Este trabajo
MX1128	MX943 (pACR960)	Este trabajo
MX1129	MX943 (pACR1029)	Este trabajo
MX1157	MX960 (pACR3)	Este trabajo
MX1211	MX943 (pACR3 Δ [Ava])	Este trabajo
<u>Plásmidos</u>		
pACR1	$\text{ColE1}^{\text{imm}}$ <u>glnA⁺</u> <u>glnL⁺</u> <u>glnG⁺</u>	42
pACR3	Ap^r <u>glnG⁺</u>	52
pACR3 Δ (Ava)	pACR3 <u>delección</u> <u>AvaI-AvaI</u>	Laboratorio de A. Covarrubias
pACR960	pACR1 <u>glnL82::Tn5</u>	Este trabajo
pACR1029	pACR1 <u>glnL82::Tn5</u> <u>glnG85</u>	Este trabajo

* Colección de laboratorio de F. Bastarrachea.

se determinó por turbidimetría (43), utilizando para este fin matraces nefelométricos y un colorímetro Klett-Summerson.

PROCEDIMIENTOS GENETICOS

MUTAGENESIS Y AISLAMIENTO DE MUTANTES. Para aislar mutantes Ntr^+ a partir de la cepa MX960 (Ntr^-), se recurrió a la mutagénesis, con N-metil-N'-nitro-N-Nitroso guanidina (NG), según el método descrito por Miller (44). Este consistió en crecer un cultivo de la MX960 en medio nutritivo hasta alcanzar la fase exponencial, centrifugar y lavar la pastilla celular dos veces con buffer de citratos, pH 5.5 (ácido cítrico 0.1 M y citrato de sodio 0.1 M). Después se agregó la NG a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$ y se incubaron las células a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó el cultivo, se lavó la pastilla celular con buffer de fosfatos, pH 7.0 (solución equimolar de Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4), para finalmente resuspender la pastilla en un volumen de medio nutritivo. Este se incubó a 37°C con agitación durante 12 horas aproximadamente y, finalmente, se espatularon alícuotas en el medio selectivo.

TRANSDUCCIONES. La preparación de lisados del bacteriófago transductor P1 virA y el protocolo para las transducciones se basaron en el método de Miller. (44). En síntesis, consiste en lo siguiente: una vez obtenido el lisado, se cultiva la cepa blanco en medio líquido hasta aproximadamente 1×10^8 células/ml (40 unidades Klett de turbidez), se colectan las células mediante centrifugación y se resuspenden en una décima parte del volumen inicial de bactotripton a 1%. Se agrega una cantidad similar de solución de CaCl_2 (0.015M) y MgSO_4 (0.03 M) y se adiciona una dilución 1:20 del lisado viral, con respecto al cultivo bacteriano. Se incuba la mezcla durante 20 minutos a 37°C. Posteriormente, se colectan nuevamente las células, se lavan con medio mínimo, se resuspenden en una centésima de volumen inicial de medio mínimo y se espatulan en el medio selectivo. Finalmente se incuban las cajas de selección a 37°C, de 24 a 48 horas.

TRANSFORMACIONES. Las transformaciones de Escherichia coli se siguieron apegadas al método de Betlach et al (45). Brevemente, este método consiste en cultivar la cepa blanco hasta alcanzar 30 u. Klett de turbidez. Entonces, se centrifugan las células y se resuspenden en la mitad de volumen de CaCl_2 30 mM. Se deja reposar la suspensión celular de 20 a 30 minutos y se concentra cinco veces en la misma solución. Se adiciona el DNA plasmídico que se va a utilizar (cuya eficiencia de transformación para E. coli se calcula en 10^7 transformantes/ μg de DNA), y se deja reposar en hielo 60 minutos, seguido de un pulso térmico de 42°C durante 70 segundos. Después se agrega medio nutritivo Luria, se incuba con agitación durante dos o -

tres horas y, finalmente, se toman alícuotas y se plaquean en el medio selectivo. Se incuban las cajas de transformación - durante uno o dos días a 37°C.

PROCEDIMIENTOS BIOQUIMICOS Y DE BIOLOGIA MOLECULAR.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA GS. Se utilizó el ensayo de la γ -glutamil transferasa para determinar la actividad enzimática de la GS, como se ha descrito previamente (42). Las actividades específicas se refieren a la actividad total de la enzima (adenilada y no adenilada), y están dadas en micromolas de γ -glutamilhdroxamato producido por minuto por miligramo de proteína a 37°C. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (46) empleando albúmina sérica de bovino como estándar. El ensayo de actividad de la GS en colonia se realizó según el método cualitativo descrito por Pahel et al (op. cit., en 18).

PURIFICACION DE DNA DE PLASMIDO. La purificación de DNA de plásmido se llevó a cabo siguiendo el método de Betlach et al (45). Para análisis rápidos de plásmidos, se empleó el microensayo de Holmes y Quigley (47). Las endonucleasas de restricción fueron generosamente proporcionadas por A. Covarrubias. Las condiciones de utilización se siguieron apegadas a los lineamientos descritos por Maniatis et al (48), así como también las técnicas de manipulación del DNA.

PURIFICACION DE RNA. Las cepas utilizadas para la purificación de RNA, fueron crecidas en los medios de cultivo indicados, hasta alcanzar la fase exponencial (aproximadamente 60-80 unidades Klett). Posteriormente, el RNA fue extraído siguiendo el método - descrito por Aiba et al (49)

HIBRIDIZACION RNA-DNA EN FILTROS DE NITROCELULOSA. (NORTHERN)

Para este procedimiento, se efectuaron electroforesis de los RNA's en geles desnaturalizantes de agarosa al 1.2%, conteniendo, además, 2.2M de formaldehído, preparados y utilizados como está descrito por Maniatis et al (48), excepto que se usó NaH₂PO₄ 2 mM en todos los buffers. La transferencia de los RNA's de los geles a los filtros de nitrocelulosa (Scheicher & Schuel BA85) y su posterior hibridización con fragmentos de DNA específicos marcados radiactivamente, se llevó a cabo - como está indicado por Thomas (50). Los fragmentos de DNA utilizados fueron: el detector HG1 que es un fragmento HinfI-HinfI de 900 pares de bases que contiene al extremo 5' de glnG y parte del extremo 3' de glnG; el detector HG2 que también es un fragmento HinfI-ClaI de 706 - pares de bases cuya secuencia corresponde a un segmento interno de -- glnL. Ambos fragmentos fueron obtenidos a partir del plásmido pACR3 (Ava) y purificados de geles de agarosa de bajo punto de fusión al - 1.5%, en buffer Tris-boratos (48). El marcaje radiactivo de estos -- fragmentos se efectuó empleando el procedimiento comercial de incorporación de (α -³²P) dCTP in vitro (nick-translation), diseñado por Amersham International Ltd.

MAPEO DE RNAm POR DIGESTION CON NUCLEASA S1. El procedimiento seguido para la ejecución de los experimentos de Mapeo con nucleasa S1, es el que ha descrito Aiba et al (49). Para esto, se utilizó el fragmento HG1 marcado radiactivamente en su extremo 5'-glnG con ^{32}P mediante la reacción con la kinasa de T_4 y (γ - ^{32}P) ATP como sustrato (48). El procedimiento se ajustó al método mencionado salvo algunas excepciones: La hibridización RNA-DNA se efectuó calentando la mezcla hasta 75°C y dejando descender la temperatura gradualmente hasta 42°C ; la reacción con la nucleasa S1 (Boehringer Mannheim) se hizo a 20°C durante una hora y empleando 300 unidades de enzima por cada $140\ \mu\text{g}$ de RNA; y, finalmente, la electroforesis fue en geles cortos (aproximadamente de 15 cm. de longitud) de poliacrilamida al 5%-Urea 8M en buffer TBE.

REACTIVOS. Todos los aminoácidos y vitaminas empleados fueron de Sigma Chemical Co. Las enzimas fueron obtenidas a partir de fuentes comerciales. Todo el material empleado para el marcaje radiactivo y medios utilizados fueron obtenidos de fuentes comerciales y usados en grado analítico.

RESULTADOS

I. AISLAMIENTO DE LA CEPA MUTANTE MX1029.

La cepa MX1029 (glnL82::Tn5 glnG85) se aisló como una revertante Aut^+ a partir de la mutante MX960 (glnL82::Tn5), que es incapaz de utilizar arginina como fuente de nitrógeno. Para esto, se sometió a la MX960 a mutagénesis química con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, seleccionando aquellas colonias que crecieron en medio mínimo con glucosa y arginina. De esta selección, se aislaron dos colonias independientes, denominadas MX1029 y MX1030. Posteriormente, se determinó la actividad enzimática de la GS, encontrándose que fue alta constitutiva, para ambas cepas, tanto en condiciones de limitación como de abundancia de amonio, aunque cabe destacar que las actividades en condiciones de activación (NH_4Cl 0.5 mM) fueron mayores, aproximadamente cuatro veces (ver tabla 2):

Para mapear la localización de estas mutaciones se hizo un lisado del bacteriófago P1 en las cepas MX1029 y MX1030, independientemente, y se transdujeron a la cepa MX734 (glnA71::Tn5), seleccionando colonias protótrofas de glutamina (Gln^+) que además fueran resistentes a kanamicina (50 μM), ya que el Tn5 confiere resistencia a este antibiótico. Se encontró que el 100% (200/200) de las colonias fueron Aut^+ (Ntr^+) lo que implica que las mutaciones responsables de este fenotipo se encuentran muy ligadas al gen glnL, donde está insertado el Tn5 (38).

Dado que se requiere de la expresión de glnG para activar la expresión de los sistemas Ntr , se consideró que las mutaciones

gln-85 y gln-86, de las cepas MX1029 y MX1030, respectivamente, se localizaban en glnG o por lo menos permitían su expresión. Además, puede inferirse que estas mutaciones, por permitir la utilización de arginina como fuente de nitrógeno, efectivamente afectan la síntesis de NR_I probablemente sin alterar la estructura primaria de la proteína, ya que tanto por activar el sistema Aut, como por inducir la síntesis de la GS, parece lógico suponer que ambas mutaciones sólo afectan la expresión del gene.

Estas mutantes ofrecen por lo menos dos alternativas para explicar la supresión del efecto polar de la mutación glnL82 ::Tn5: una consiste en suponer que las mutaciones gln-85 y gln-86 afectan a un promotor en glnG, aumentando su expresión; y la segunda alternativa deja abierta la posibilidad de que se hayan generado promotores nuevos en la región intercistromica glnL-glnG o en la vecindad del transposón Tn5.

De estas mutantes, se seleccionó a la MX1029 para analizar y caracterizar su mutación que revierte el fenotipo Aut⁻ de la MX960.

II: SUBCLONACION in vivo DE LA MUTACION glnG85 EN UN PLASMIDO MULTICOPIA.

La estrategia para trasladar la mutación glnG85 a un plásmido multicopia (pACR1), portador de la región silvestre glnALG, fue la siguiente: Se propagó el bacteriófago transductor P1 en la cepa MX1029 obteniéndose un lisado que se utilizó para infectar a la cepa MX924 seleccionando aquellas transductantes que crecieron

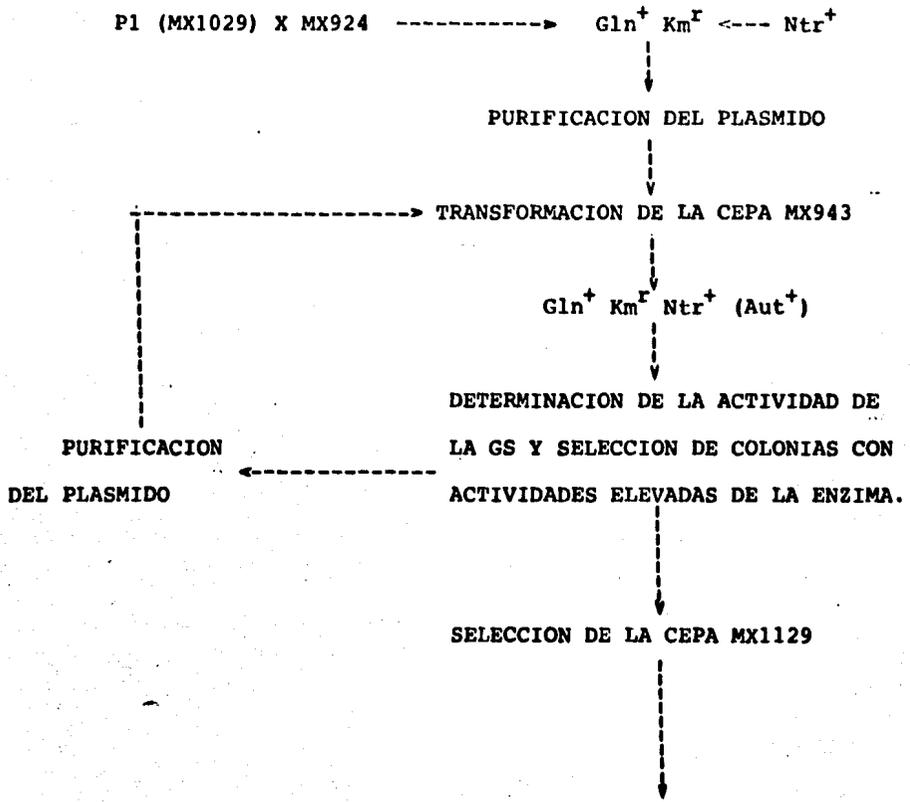


FIGURA 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA LA SUBCLONACION in vivo DE LA MUTACION glnG85 EN UN PLASMIDO MULTICOPIA (pACR1).

en medio mínimo con glucosa, NH_4Cl 15 mM y kanamicina (50 ug/ml). Se tomaron 50 colonias independientes, se crecieron en medio nutritivo Luria (L01), en presencia de kanamicina, y se purificó plásmido. Este, se empleó para transformar a la cepa MX943 ---- ($\Delta[\text{glnALG}]$), seleccionando las transformantes que fueron $\text{Gln}^+ \text{Km}^r$. Dado que se obtuvieron aproximadamente 70 colonias $\text{Gln}^+ \text{Km}^r \text{Aut}^+$, se utilizó el ensayo para determinar actividad de la GS en colonias crecidas en medio mínimo con limitación y abundancia de amonio. Aunque este ensayo es cualitativo y las células no están en las mismas condiciones de crecimiento, el ensayo es reproducible y confiable (20). Así, mediante este método se seleccionaron 3 cepas que presentaron actividades elevadas de GS en ambas condiciones, cuyo fenotipo se reprodujo mediante el ensayo cuantitativo de la actividad de la GS (42). Se seleccionó una colonia para purificar plásmido y repetir el procedimiento desde la transformación de la MX943. Esto se hizo con el objeto de garantizar que la población de plásmidos de las cepas transformadas fuera homogénea. Posteriormente, de la última transformación se obtuvieron 19 colonias cuando se utilizó 1 μg de DNA plasmídico, y se seleccionó una colonia con actividad elevada de la GS (ver Tabla 2). Es necesario destacar que la mutación glnG85 se subclonó ligada al alelo $\text{glnL82}::\text{Tn5}$, dado que es muy difícil separarlas genéticamente, además, la inserción del Tn5 sirve como indicador positivo para la manipulación genética de la mutación glnG85 .

Todo el procedimiento se repitió para subclonar la mutación $\text{glnL82}::\text{Tn5}$ de la cepa MX960, excepto que el fenotipo Ntr en-

contrado fue Aut[±], es decir, que crece lentamente en medio mínimo con arginina como fuente única de nitrógeno (datos no mostrados).

Los datos sobre las actividades enzimáticas de la GS de las cepas portadoras de las mutaciones glnL82::Tn5 y glnG85, en plásmidos, aparecen en la tabla 2.

TABLE 2. CARACTERIZACION FENOTIPICA DE LAS CEPAS PORTADORAS DE LAS MUTACIONES glnL82::Tn5 y glnG85.

CEPA	FENOTIPO O GENOTIPO RELEVANTE	ACTIVIDAD ENZIMATICA ¹	
		N↑	N↓
MX614	Silvestre	0.20	1.63
MX960	Gln ⁺ Aut ⁻ Km ^r	0.20	0.80
MX1029	GlnC Aut ⁺ Km ^r	0.87	3.10
MX1030	GlnC Aut ⁺ Km ^r	0.54	2.73
MX1057	Gln ⁺ Aut ⁺ Km ^r Ap ^r (MX960/pACR3)	1.97	3.20
MX1019	GlnC Aut ⁺	1.50	2.00
MX924	Aut ⁺ [I (glnALG)]/pACR1	0.21	4.06
MX1128	Aut [±] [I (glnALG)]/pACR960	0.34	2.88
MX1129	Aut ⁺ [I (glnALG)]/pACR1029	0.56	2.92

¹La actividad enzimática de la GS está expresada en μ moles de γ -glutamyl-hidroxamato producido por minuto por miligramo de proteína (umoles/min/mg de proteína). N indica que la cepa fue criada en medio mínimo (con 0.2% de glucosa) y NH₄Cl 15 mM; N indica que el crecimiento fue en medio mínimo con NH₄Cl 0.5 mM.

III. DETECCIÓN DEL RNAm DE glnG POR HIBRIDIZACIÓN RNA-DNA TIPO NORTHERN.

Una vez caracterizada la cepa MX1129 (MX943/pACR1029) y siguiendo la idea de que glnG se expresa gracias a la mutación - glnG85, el siguiente paso consistió en demostrar que glnG se transcribe. También quedaba la cuestión de si tal expresión provenía de la región intercistronica glnL-glnG o bien de otro sitio, por ejemplo del Tn5 en glnL. Sabemos que el transposón está insertado entre 100 y 170 pb "abajo" del extremo 5' de glnL, por lo que si la transcripción procede de este sitio, el RNAm de glnG debe ser de mayor tamaño que si se inicia al principio del propio gene. Para resolver esta cuestión, se hicieron experimentos de hibridización RNA-DNA en filtros de nitrocelulosa (Northern), a fin de detectar y determinar el tamaño del transcrito de glnG. Para esto, se purificó RNA de distintas cepas bajo diferentes condiciones de crecimiento y se efectuaron las hibridizaciones correspondientes (ver Figura 7).

Los resultados demuestran que utilizando el fragmento HG1 de DNA, que lleva el extremo 5' de glnG, puede detectarse el transcrito de este gene en la cepa MX1129, en tanto que utilizando el fragmento HL1, que comprende parte de glnL hacia su extremo 3', en la misma cepa no se detecta hibridización. Esto implica que el transcrito de glnG no procede del transposón de la mutación glnL82 ::Tn5 ni de otro sitio "arriba" del propio gene. Si así fuera, se hubiera detectado el transcrito con ambos detectores, además, el -

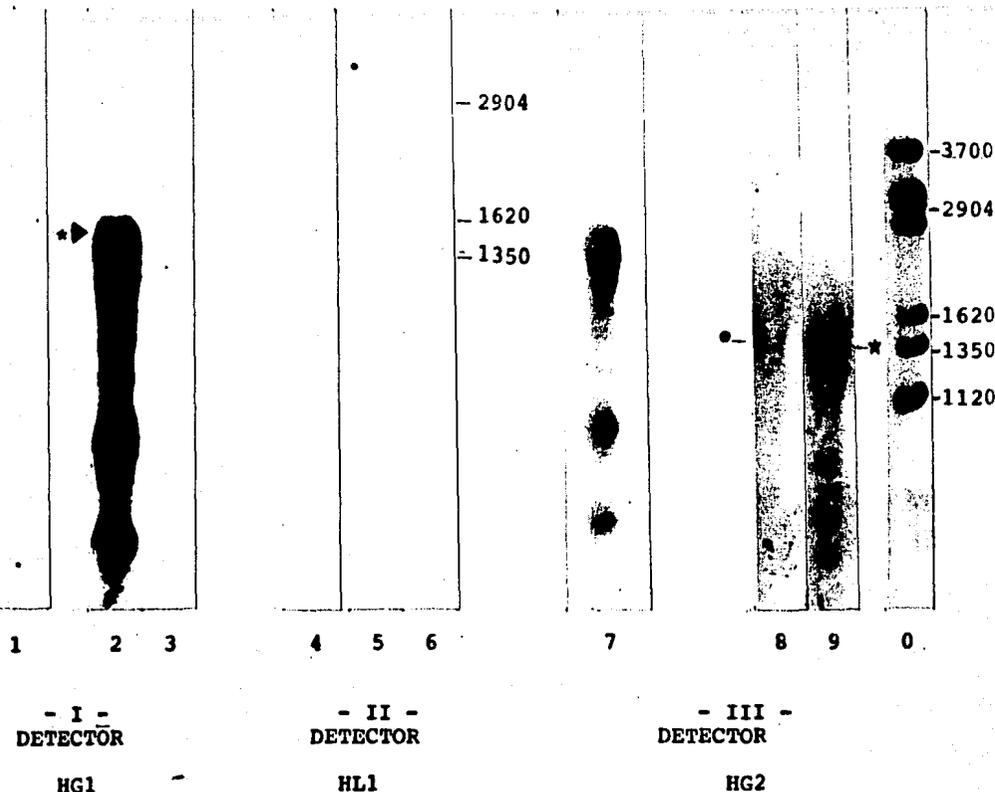
tamaño del RNAm de glnG comprende aproximadamente 1,400 bases de longitud, dimensión que sólo alcanza a contener el mensaje que codifica para NR_I.

Se utilizó la cepa MX924 como control positivo para glnG. En la figura 7 puede observarse el transcrito específico de glnG, tanto en la cepa MX924 como en la MX1129, aunque cabe destacar que para detectar el transcrito de la MX924 se necesitan poner de 4 a 6 veces más RNA que el de la MX1129. Además, los transcritos no coinciden exactamente en tamaño, sino que el de la MX924 es aproximadamente 40 bases mayor que el de la mutante.

Puede observarse que el RNA de la MX1129 ostenta un patrón de numerosas bandas de hibridización, reproducibles cuando se usa el fragmento HG1 como detector. Asimismo, por lo menos parte de este patrón se reproduce cuando se usa como detector el fragmento HG2, que lleva la región 3' de glnG. Esto implica que glnG se expresa en su totalidad y de que existen formas isoméricas del transcrito o bien pueden ser formas modificadas o alostéricas del RNAm.

Por otro lado, al hibridizar RNA de la cepa MX1129, crécida en distintos medios (figura 7), puede observarse que tanto en condiciones de abundancia y limitación de amonio, la cantidad de transcrito producido, es aproximadamente la misma, lo que concuerda con la hipótesis de que la mutación glnG85 permite la síntesis constitutiva del RNAm correspondiente. Sin embargo, destaca el hecho de que en medio nutritivo, la cantidad de transcrito detectado es menor que cuando las células son cultivadas en medio mínimo. Esto quizás obe-

A.



- I -
DETECTOR

HG1

- II -
DETECTOR

HL1

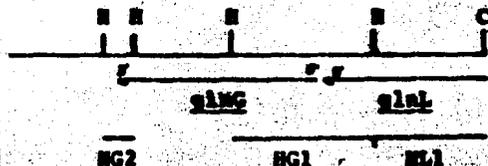
- III -
DETECTOR

HG2

*Transcrito principal correspondiente a glnG (longitud aproximada de 1400 bases) de la cepa mutante Mx1129.

*Transcrito poco abundante de la cepa tipo silvestre MX924, correspondiente a glnG.

CARRILES: RNA de las cepas MX924 (Δ [glnALG]/pACR1); 1, 4, 8; MX1129 (Δ [glnALG]/pACR1029): 2, 5, 7, 9; MX1128 ([glnALG]/pACR960): 3, 6; RNA de Rotavirus humano: 0 (indicado en bases de longitud).



B.

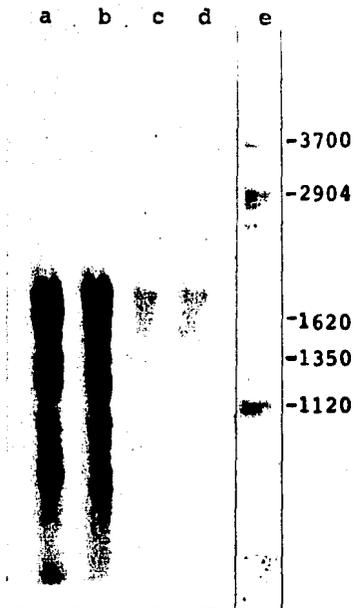


FIGURA 7. Detección del transcrito específico de glnG por hibridización RNA-DNA en filtros de nitrocelulosa (Northern's).

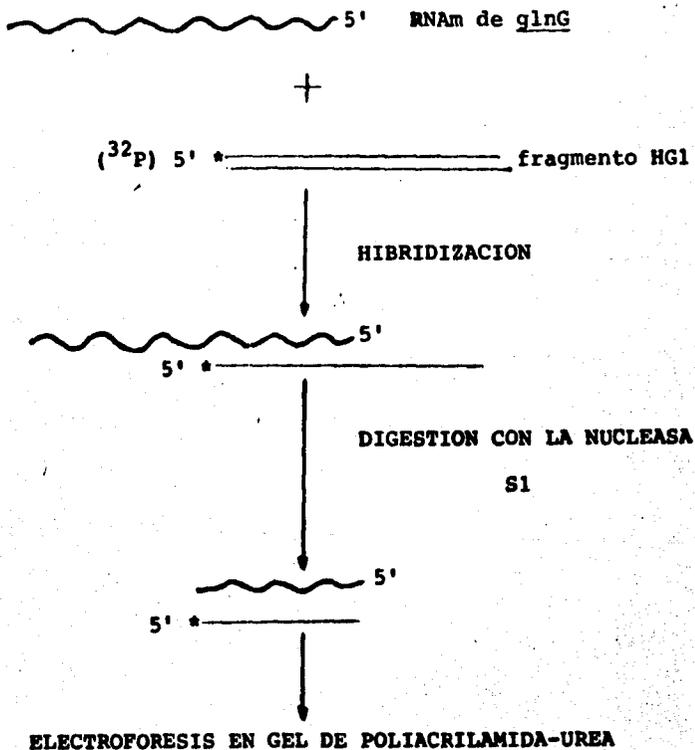
A) Los RNA's empleados fueron obtenidos de las cepas MX924 - (gln[ALG]⁺), MX1129 (glnL82::Tn5 glnG85) y MX1128 (glnL82::Tn5). El detector empleado está indicado en cada pñel y se esquematiza en la parte inferior de la figura. La cantidad de RNA empleada fue de 10 µg/carril, excepto en el carril 8 donde se usaron 40 µg.

B) Detección del RNAm de glnG en la cepa Mx1129, crecida en distintos medios: a) medio mínimo con exceso de amonio (NH_4Cl 15 mM), b) medio mínimo con amonio limitante (NH_4Cl 0.5 mM), c) medio nutritivo Luria, y d) medio Luria con glutamina (1 mg/ml). El detector utilizado fue el fragmento HG1. En el carril e se puso RNA genómico de rotavirus humano como marcador de peso molecular, cuyos valores están expresados en bases.

dece a las condiciones de síntesis global del RNA en estos medios, que son radicalmente distintos.

IV. MAPEO DEL RNAm DE glnG POR DIGESTION CON LA NUCLEASA S1.

En la figura de abajo se muestra una representación esquemática del experimento de mapeo con nucleasa S1 empleado. Se usó este procedimiento para mapear el sitio donde se inicia la transcripción de glnG en la mutante MX1129.



El detector de DNA utilizado fue el fragmento HGI marcado radiactivamente en sus extremos HinI-5'. Este fragmento porta el extremo 5' de glnG y el 3' de glnL, de tal forma que la nucleasa S1 degrada la porción de DNA que no hibridiza con RNAm de glnG. Para esto se utilizó RNA purificado de las cepas MX1128, MX1129 y MX924 crecidas en medio mínimo con glucosa (0.2%) y NH_4Cl 15 y 0.5 mM, para las condiciones de abundancia y limitación del nitrógeno, respectivamente.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 8. En primer término, encontramos que en el caso de la cepa silvestre (figura 8 A y B; carriles 1 y 2), se observa que el fragmento de DNA protegido por el RNA fue de aproximadamente 585 bases de longitud, en ambas condiciones probadas. Asimismo, es notable que la abundancia del transcrito de glnG es mayor en condiciones limitantes de amonio, aunque en general la concentración relativa es baja, ya que la detección de este transcrito sólo se logra cuando se emplean cantidades elevadas de RNA total.

Cuando examinamos el RNA de la cepa MX1129, encontramos que se protege un fragmento de aproximadamente 540 bases de magnitud, cuya abundancia es similar en ambas condiciones, limitación y abundancia de amonio. Este fragmento es más corto que el que protege el RNA de la cepa MX924, lo que probablemente implica que el transcrito que se produce en la MX1129 comienza "abajo" del sitio donde se inicia el mensaje en la cepa silvestre. Otro aspecto interesante es el hecho de que en la cepa MX1129, el transcrito específico de glnG es mucho más abundante que en la cepa silvestre. Sin embargo,

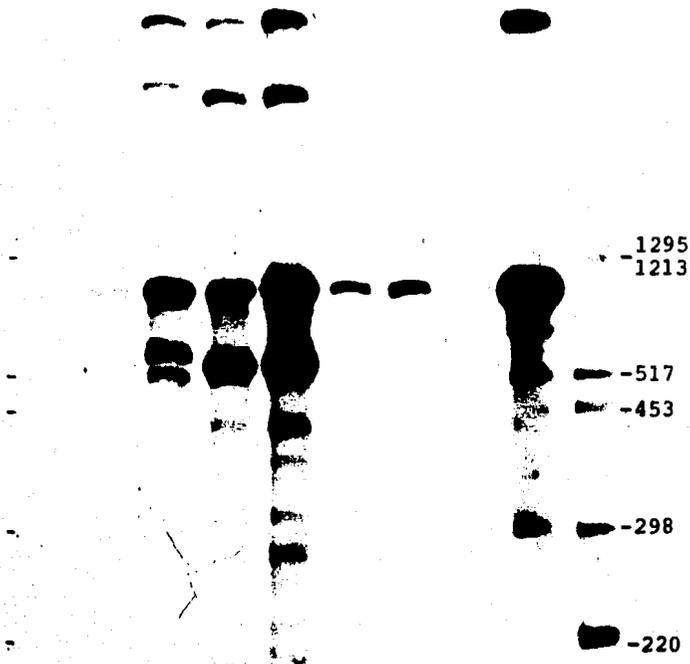
es difícil dar una estimación cuantitativa sobre el número de veces más que se produce el transcrito de glnG en la cepa mutante - que en la silvestre.

Al analizar el RNA de la cepa MX1128 parece observarse que se protege un fragmento de tamaño similar al de la cepa silvestre - (MX924), sin embargo, debido a su muy escasa abundancia es difícil determinar si se trata de un transcrito real o de un artefacto del experimento.

En la figura 8 se muestran las autorradiografías de los experimentos de mapeo por nucleasa S1 realizados.

B.

0 1 2 3 4 5 6 # HGI 0



= MX943 (Δ [glnALG])

FIGURA 8. Mapeo por digestión con nucleasa S1 del RNAm de glnG. Se utilizó como detector el fragmento HGI desnaturalizado y marcado con ^{32}P en su extremo 5'. Los RNA's empleados proceden de las cepas indicadas en la parte superior de la figura A, y por los números indicados en la parte inferior de la misma figura. Las cepas fueron crecidas en medio mínimo con glucosa (0.2%) y NH_4Cl : 15 mM (#) y 0.5 mM (|), excepto la cepa MX943 que fue cultivada en medio Luria con glutamina (1 mg/ml). Símbolos: +fragmento HGI re-naturalizado, *fragmento protegido (~585 b), *fragmento protegido (~540 b). A y B son experimentos diferentes.

DISCUSION

Los resultados mostrados en este trabajo demuestran fehacientemente que la mutación glnG85 permite la expresión constitutiva del gene glnG. Las evidencias que soportan esta afirmación son las siguientes:

- i) El método de selección genética de las mutantes estuvo basado en el hecho de que es necesaria la expresión de glnG para que E. coli pueda utilizar fuentes alternativas de nitrógeno. Bajo este criterio, se dirigió la mutagénesis y selección de las colonias revertantes Ntr^+ de la cepa MX960. También, se verificó que una de las revertantes seleccionadas, denominada MX1029 cotransduce la mutación que le confiere el fenotipo Ntr^+ 100% - con la mutación glnL82::Tn5. Asimismo, los niveles de actividad de la GS son elevados en ambas condiciones, limitación y abundancia de nitrógeno en el medio; lo que nos permite sugerir que este fenotipo responde a la expresión de glnG. Así, las evidencias genéticas -y el mismo tipo de selección- indican que la mutación glnG85 permite la síntesis de NR_1 , que debe producirse en cantidad suficiente no sólo para inducir la actividad de la GS, sino también para activar los sistemas Ntr . Por estas funciones parece ser que esta proteína es fisiológicamente normal, aunque no puede descartarse alteraciones en su estructura.
- ii) Los experimentos de hibridización RNA-DNA tipo Northern, indican que la cepa portadora de la mutación glnG85 en plásmido, produce un transcrito abundante de glnG de aproximadamente 1400 bases de

extensión. Este RNA posee la característica de ser específico de la región de glnG, ya que es detectado con los fragmentos - HG1 y HG2; pero cuando se usa el fragmento HL1, específico para glnL, no se detecta (ver figura 7). Esto significa que el plásmido pACR1029, posee expresión de glnG, cuya transcripción no procede ni de la parte media ni del extremo 5' de glnL, lo que también anula la posibilidad de que el Tn₅ sea el responsable de dicha expresión. Asimismo, cabe destacar que la detección del transcrito de 1400 bases es reproducible en todas las condiciones de crecimiento de la cepa MX1129 (figura 7), y sobresale como la banda principal. Sin embargo, existen numerosas bandas de hibridización reproducibles, destacándose dos de ellas de aproximadamente 490 y 145 bases de longitud, que incluso pueden detectarse cuando se hibridiza este RNA con el fragmento HG2 (ver figura 7). Resulta difícil interpretar este resultado ya que si estas bandas corresponden a fragmentos de RNA del tamaño proporcional, no está claro como pueden hibridizar con -- fragmentos de DNA separados por más de 600 bases. Quizás lo que ocurre es que son formas conformacionales de este RNA que migran anormalmente durante la electroforesis.

En relación a la detección del RNAm de glnG en la cepa -- MX924, éste sólo se logra observar cuando se emplean 40 µg de RNA total por carril, y aun así la detección es muy pobre. Además, en la figura 7 puede observarse que la banda de hibridización es ligeramente mayor que la de la MX1129, lo que implica que la transcripción en ambos casos procede de sitios distintos. A este respecto, - un problema crítico que se ha presentado para detectar el transcri-

to de glnG es que coincide con la posición del RNAr'16S de E. coli y que atrapa inespecíficamente al DNA empleado como detector. Esto es particularmente problemático en la detección del transcrito en las cepas MX924 y MX1128, donde se tiene que usar mucho RNA total. En la MX1129, dado que el RNAm de glnG es muy abundante, el "ruido" del RNAr 16S no dificulta el reconocimiento visual de la hibridización.

iii) Finalmente, los resultados obtenidos en los experimentos de mapeo con nucleasa S1, indican que el RNAm de glnG en la -- MX1129, se inicia al final de glnL, en su extremo 3'. Este hecho corrobora los resultados obtenidos en los Northern's -- sobre el posible inicio transcripcional de glnG, ya que si -- se ha determinado que el transcrito consta de 1400 bases de longitud, era de esperar que se iniciara en la vecindad del extremo 3' de glnL. Estos hechos indican además que en la -- cepa MX924 (y presumiblemente en la MX1128) se produce un --- transcrito propio ligeramente mayor que el de la MX1129. Este transcrito, quizás es propio de glnG, dado que no se detecta con el detector HLI en los Northern's, aunque no puede descartarse que sea un producto modificado del transcrito bicistrónico glnL-glnG que se inicia en glnLp. Cabe agregar que -- dicho mensaje bicistrónico no se ha detectado como tal en --- nuestro laboratorio ni se ha reportado en la literatura respectiva, de modo que su existencia está más deducida de las evidencias genéticas de polaridad de glnL sobre glnG (11, 14, 17, 19, 34). Empero, dado que el transcrito de glnG de la --

cepa MX924 es similar al putativo transcrito de la MX1128, cuya existencia no está bien clara, es posible pensar que - glnG cuente con un promotor propio.

Recientemente, J. Miranda (53) y A. Covarrubias (manuscrito en preparación) han obtenido la secuencia nucleotídica de los genes glnL y glnG de E. coli, encontrando que éstos están separados por únicamente once pares de bases, entre el codón de terminación de glnL y el codón de iniciación de glnG. Esto permite pensar que si existe un promotor propio para glnG, éste debe imbricarse con la secuencia de glnL, de tal modo que su funcionamiento debe ser interferido por la transcripción de glnL. Esto podría explicar por qué este promotor es poco activo en la cepa MX924. - En un análisis computacional sobre las posibles secuencias promotoras que se localizan en glnL y glnG, efectuado por J. Miranda (comunicación personal), ha encontrado numerosas, aunque todas débiles. Además, parece existir una alta frecuencia de estas secuencias en la región intercistronica glnL-glnG, mientras que en la parte media de estos genes la frecuencia encontrada es muy baja. Esto posiblemente implica que E. coli está dotada de la propiedad evolutiva de contar con una "reserva" de promotores potenciales para glnG, y quizás ocurre esto también con otros genes, de modo que si las circunstancias fisiológicas en cierto momento demandan de la expresión de un gene, éste cuenta con una serie de secuencias promotoras "potenciales" que, con el auxilio de mutaciones idóneas, pueden proporcionarle una expresión independiente. También, es posible que este --

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

hallazgo sea casual y que simplemente se encuentre esa alta frecuencia de posibles secuencias promotoras fuera de la fase abierta de lectura de NR_1 en glnG, porque es mas estable, evolutivamente hablando, no presentar secuencias nucleotídicas dentro de un gene que pudieran interferir su expresión normal o alterar su función.

En relación a la mutación glnG85, A. Covarrubias obtuvo la secuencia de nucleótidos de un fragmento de DNA donde está incluida esta mutación, encontrando que consiste en una transición pirimidínica en el nucleótido 44 "arriba" del codón de iniciación de la traducción de glnG:

secuencia silvestre:	...TACCGA	----	26 pb	----	TAA	----	11 pb	----	ATG
						(1)			(2)
						↓			
mutación <u>glnG85</u> :T					

(1) = codón de terminación de la traducción de glnL.

(2) = codón de iniciación de la traducción de glnG.

Esta mutación se localiza en un posible promotor cuya secuencia silvestre es:

--ATTGAAT-----	17 pb	-----CATACC*G---
-35		-10

en donde el alelo glnG85 podría incrementar su "valor" como promotor (*C-->T), ya que según el promotor consenso, el sexto nucleótido -T- de la región -10, es importante para la función promotora de esta región. Asimismo, el sitio de inicio de la transcripción de glnG, inferido por el mapeo por nucleasa S1, se localiza muy cerca de esa secuencia. Además, resulta evidente que

este promotor no es el que utiliza la cepa silvestre para la transcripción de glnG, ya que éste debe localizarse unos 45 pares de bases "arriba".

La función del promotor de glnG, considerada dentro del contexto del operón glnALG, no se conoce ya que no se han determinado las condiciones en las que su participación sea significativa. Sin embargo, probablemente existan ciertas condiciones particulares en las cuales este promotor adquiriera importancia funcional, sobre todo si se considera que Escherichia coli habita normalmente un medio natural con características ambientales muy complejas y, en muchos aspectos, desconocidas. Así, es posible que no se hayan reproducido adecuadamente las condiciones necesarias in vitro para encontrar aquellas donde el promotor de glnG sea funcionalmente importante. Cabe considerar también la posibilidad de que la participación de este promotor no tenga importancia fisiológica significativa, sino que más bien actúe como un sitio opcional para el inicio de la transcripción de glnG, a manera de un sitio secundario que se emplea sólo en circunstancias muy especiales. Incluso, resulta interesante la idea de que este promotor funcione como una válvula de seguridad que garantice la expresión de glnG. Algo así como una forma, fisiológicamente significativa, de asegurar la dotación adecuada de la proteína NR_1 , cuya importancia capital en la regulación metabólica celular es de tal magnitud que quizás sea evolutivamente conveniente invertir energía y organización biológica para mantener dicho sistema, a manera de una redundancia funcional sostenida para asegurar cierta función biológica prioritaria, en un punto crucial como lo es

la expresión de un gene regulador general del metabolismo nitrogenado.

Son numerosas las hipótesis que pueden plantearse para explicar el posible papel que desempeña el promotor de glnG, sin embargo, es menester acumular mas evidencias de su participación y, sobre todo, escudriñar entre diversas condiciones y ver si alguna o algunas determinan su actividad. Para esto, se necesitan efectuar nuevos experimentos diseñados para detectar la participación de este promotor, mejorar la detección del transcrito, determinar si se trata de un mensaje bicistrónico que sufre cierto procesamiento post-transcripcional y determinar cual de los posibles promotores es el efectivo y si hay reguladores que modulen su funcionamiento.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Tyler, B. 1978. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 1127-1162.
- (2) Cohen, P. 1978. Control de la actividad enzimática. Edic. Omega, S. A. Barcelona, Esp. 88 p.
- (3) Ginsburg, A. y Stadtman, E. R. 1973. Regulation of glutamine synthetase in Escherichia coli. En Prusiner, S. y Stadtman, E. R. (ed). *The enzymes of glutamine metabolism*. P:9-42. Academic Press, N. Y. 615 p.
- (4) Meister, A. 1980. Catalytic mechanism of glutamine synthetase: Overview of glutamine metabolism. En Mora, J. y Palacios, R. (ed). *Glutamine: Metabolism, enzymology and regulation*. p: 1-40. Academic Press, N. Y. 334 p.
- (5) Stadtman, E. R., Mura, U., Boon Chock, P. y Goo Rhes, S. 1980. The interconvertible enzymes cascade that regulates glutamine synthetase activity. En Mora, J. y Palacios, R. (ed) *Glutamine: Metabolism, enzymology and regulation*. P: 41-59. Academic Press, N. Y. 334 p.
- (6) Senior, P. J. 1975. Regulation of nitrogen metabolism in Escherichia coli and Klebsiella aerogenes: studies with continuous culture technique. *J. Bacteriol.* 123: 407-418.
- (7) Magasanik, B. 1982. Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Ann. Rev. Genet.* 16: 135-168.
- (8) Bender, R. A. y Magasanik, B. 1977. Regulatory mutations in the Klebsiella aerogenes structural gene for glutamine synthetase. *J. Bacteriol.* 132: 100-105.

- (9) Deleo, A. R. y Magasanik, B. 1975. Identification of the structural gene for glutamine synthetase in Klebsiella aerogenes. J. Bacteriol. 121: 313-319.
- (10) Weglenski, P. y Tyler, B. 1977. Regulation of glnA messenger ribonucleic acid synthesis in Klebsiella aerogenes. J. Bacteriol. 129: 880-887.
- (11) Pahel, G., Rothstein, D. M. y Magasanik, B. 1982. Complex glnA-glnL-glnG operon of Escherichia coli. J. Bacteriol. 150: 202-213.
- (12) MacNeil, T., MacNeil, D. y Tyler, B. 1982. Fine-structure deletion map and complementation analysis of the glnA-glnL-glnG region in Escherichia coli. J. Bacteriol. 150: 1302-1313.
- (13) Alvarez-Morales, A., Dixon, R. y Merrick, M. 1984. Positive and negative control of the glnA ntrBC regulon in Klebsiella pneumoniae. EMBO J. 3: 501-507.
- (14) Krajewska-Grynkiewicks, K. y Kustu, S. 1984. Evidence that nitrogen regulatory gene ntrC of Salmonella typhimurium is transcribed from the glnA promoter as well as from a separate ntr promoter. Mol. Gen. Genet. 193: 135-142.
- (15) Backman, K., Chen, Y. M. y Magasanik, B. 1981. Physical and genetic characterization of the glnA-glnG region of the Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 78: 3743-3747.
- (16) Pahel, G. y Magasanik, B. 1979. A new glnA-linked regulatory gene for glutamine synthetase in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76: 4544-4548.
- (17) Chen, Y. M., Backman, K. y Magasanik, B. 1982. Characterization of a gene, glnL, the product of which is involved in the regulation of nitrogen utilization in Escherichia coli. J. Bacte-

riol., 150: 214-220.

(18) MacNeil, T., Roberts, G.P. y Tyler, B. 1982. The product of glnL and glnG are bifunctional regulatory proteins. Mol. Gen. Genet., 188: 325-333.

(19) Ueno-Nishio, S., Backman, K.C. y Magasanik, B. 1983. - Regulation at the glnL-operator-promoter of the complex glnALG - operon of Escherichia coli. J. Bacteriol., 153: 1247-1251.

(20) Foor, F., Reuveny, Z. y Magasanik, B. 1980. Regulation of the synthesis of the glutamine synthetase by the P_{II} protein - in Klebsiella aerogenes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 77: 2636-2640.

(21) Garcia, E., Bancroft, S., Goo Rhee, S. y Kustu, S. 1977. The product of a newly identified gene, glnF, is required for --- synthesis of glutamine synthetase in Salmonella. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74: 1662-1666.

(22) Kustu, S., Burton, D., Garcia, E. McCarter, L. y McCarter, L. y McFarland, N. 1979. Nitrogen control in Salmonella: regulation by the glnR and glnF gene products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 4576-4580.

(23) Osorio, A. V., Servín, L., Rocha, M., Covarrubias, A. A. y Bastarrachea, F. 1984. Cis-dominant, glutamine synthetase constitutive mutations of Escherichia coli independent of activation - by glnG and glnF products. Mol. Gen. Genet., 194: 114-123.

(24) Reitzer, L. J. y Magasanik, B. 1985. Expression of glnA in Escherichia coli is regulated at tandem promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 1979-1983.

(25) Leon, P., Romero, D., Garcíarrubio, A., Bastarrachea, F. y Covarrubias, A. A. 1985. Glutamine synthetase constitutive mut-

ation affecting the glnALG upstream promoter of Escherichia coli. J. Bacteriol., 164: 1032-1038.

(26) Dixon, R. 1984. Tandem promoters determine regulation of the Klebsiella pneumoniae (glnA) gene. Nucleic Acids Res., - 12: 7811.

(27) Garciarrubio, A. 1985. Dos promotores para el gene estructural de la glutamino sintetasa de Escherichia coli. Tesis de posgrado (maestría). U.A.C.P. y P., C.C.H.; UNAM. 79 p.

(28) Reitzer, L. J. y Magasanik, B. 1983. Isolation of the nitrogen assimilation regulator NR₁, the product of the glnG gene of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 5554-5558.

(29) Hunt, T.P. y Magasanik, B. 1985. Transcription of glnA by purified Escherichia coli components: core RNA polymerase and the products of glnF, glnG and glnL. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 8453-8457.

(30) Hirschman, J., Wong, P. K., Sei, K., Keener, J. y Kustu, S. 1985. Products of nitrogen regulatory genes ntrA and ntrC of enteric bacteria activate glnA transcription in vitro: evidence that the ntrA protein is a σ factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 7525-7529.

(31) de Bruijin, F. J. y Ausubel, F. M. 1983. The cloning and characterization of the glnF (ntrA) gene of Klebsiella pneumoniae: role of glnF (ntrA) in the regulation of nitrogen fixation (nif)- and other nitrogen assimilation genes. Mol. Gen. Genet., 192: --- 342-353.

(32) Castaño, I. y Bastarrachea, F. 1984. glnF-lacZ fusions in Escherichia coli: studies of glnF expression and its chromosomal orientation. Mol. Gen. Genet., 195: 228-233.

- (33) Rocha, M., Vázquez, M., Garciarrubio, A. y Covarrubias, A.A. 1985. Nucleotide sequence of the glnA-glnL intercistronic region of Escherichia coli. Gene, 37: 91-99.
- (34) Ueno-Nishio, S., Mango, S., Reitzer, L.J. y Magasanik, B. 1984. Identification and regulation of the glnL operator-promoter of the complex glnALG operon of Escherichia coli. J. Bacteriol., 160: 379-384.
- (35) MacFarlane, S. A. y Merrick, M. 1985. The nucleotide sequence of the nitrogen regulation gene ntxB and the glnA-ntxB intergenic region of Kelbsiella aerogenes. Nucleic Acids Res., 13: 7591-7606.
- (36) Bueno, R., Pahel, G. y Magasanik, B. 1985. Role of glnB and glnD gene products in regulation of the glnALG operon of Escherichia coli. J. Bacteriol., 164: 816-822.
- (37) Ninfa, A. J. y Magasanik, B. 1986. Covalent modification of the glnG product, NR_I' by the glnL product, NR_{II}, regulates the transcription of the glnALG operon in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 5909-5913.
- (38) Urbina, J. C. 1984. Caracterización física y genética de una mutación en el gene regulador glnL de Escherichia coli. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, UNAM. 66 p.
- (39) Kleckner, N. 1977. Translocatable elements in procaryotes. Cell, 11: 11-23.
- (40) McFarland, N., McCarter, L., Artz, S. y Kustu, S. 1981. Nitrogen regulatory locus glnR of enteric bacteria is composed of cistrons: ntxB and ntxC: identification of their protein products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 2135-2139.
- (41) MacNeil, T., MacNeil, D. y Tyler, B. 1982. Fine-structure

deletion map and complementation analysis of the glnA-glnL-glnG region in Escherichia coli. J. Bacteriol., 150: 1302-1313.

(42) Covarrubias, A. A., Sánchez-Pescador, R., Osorio, A., Bolívar, F. y Bastarrachea, F. 1980. ColE1 hybrid plasmids containing Escherichia coli genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine. Plasmid, 3: 150-164.

(43) Genhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R.N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R. y Phillips, G. B. 1981. Manual of methods for general bacteriology. ASM Press, Washington, D.C., U.S.A. 524 p.

(44) Miller, J. H. 1972, Experiments in molecular genetics. C SH Lab Press. N. Y., U.S.A. 446 p.

(45) Betlach, M., Hershfield, V., Chow, L., Brown, W., Goodman, H. M. y Boyer, H. W. 1976. A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the EcoRI restriction and modification of DNA. Fed. Proc., 35: 2037-2043.

(46) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.

(47) Holmes, y Quigley, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmid. Anal. Biochem., 114: 193-197.

(48) Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: A laboratory Manual. CSH Lab Press. N. Y., U.S.A. 545 p.

(49) Aiba, H., Adhya, S. y de Combruggs, B. 1981. Evidence for two functional gal promoters in intact Escherichia coli cells. J. Biol. Chem., 256: 11905-11910.

(50) Thomas, P. S. 1980. Hibridization of denatured RNA and - Small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205.

(51) Bastarrachea, F., Brom, S., Covarrubias, A. A., Osorio, V. y Bolívar, F. 1980. Genetic characterization of mutations -- affecting glutamine biosynthesis and its regulations in Escherichia coli K-12. p: 107-121. En Mora, J. y Palacios, R. (ed.). Glutamine: Metabolism, enzymology and regulation. Academic Press. N. Y., U.S.A.

(52) Covarrubias, A.A. y Bastarrachea, F. 1983. Nucleotide - sequence of the glnA control region of Escherichia coli. Mol. Gen. Genet., 190: 171-175.

(53) Miranda, J. 1986. Estudios sobre la regulación de la expresión del operón glnALG de Escherichia coli. Tesis Profesional. U.A.C.P. y P., CCH, U.N.A.M. 51 p.