

03062
lej. y



Universidad Nacional Autónoma de México

C. C. H. UACPVF.
Instituto de Investigaciones Biomédicas

**Aislamiento y Caracterización de los Genes que Co-
difican para las Subunidades de la Enzima Glutamato
Sintasa de Escherichia coli K-12.**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

MAESTRIA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P r e s e n t a :

EDMUNDO LOZOYA GLORIA

México, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Julio, 1982



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.

INDICE.

	Página.
INTRODUCCION	1
PUBLICACIONES	13
DISCUSION	21
BIBLIOGRAFIA	25

INTRODUCCION:

En la atmósfera se encuentran grandes cantidades de nitrógeno molecular (aprox. 78%), es un compuesto inerte que solamente puede ser usado por algunos microorganismos como son las bacterias fijadoras de nitrógeno y algunas algas azul-verdes. Por esta razón la gran mayoría de los organismos vivientes obtienen el nitrógeno en forma combinada como amonio, nitritos, nitratos y aún compuestos más complejos como son los aminoácidos (1). En este contexto se pueden reconocer dos procesos importantes en el metabolismo del nitrógeno:

1) La asimilación de este elemento a partir de los compuestos disponibles en el medio en donde la forma de asimilación depende del organismo en cuestión y

2) Su utilización en la biosíntesis de los compuestos nitrogenados necesarios para la supervivencia de ese organismo.

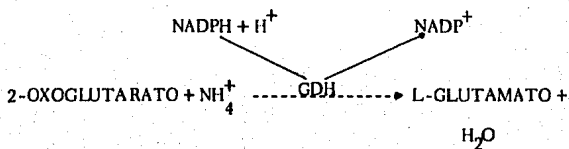
Desde hace ya algunos años se reconocieron a los aminoácidos glutamato y glutamina como fundamentales en la asimilación y biosíntesis de compuestos nitrogenados, ya que actúan como donadores de nitrógeno en las reacciones biosintéticas. En el caso del glutamato, se le reconoce como donador primario del grupo amino para la síntesis de aminoácidos principalmente por la vía de la transaminación, en cuanto a la glutamina se sabe que puede donar su grupo amido para la biosíntesis de aminoácidos, purinas, pirimidinas, aminoazúcares y otros compuestos.

En los procariotes es donde más se ha profundizado en el estudio de la formación de estos dos aminoácidos y en la distribución del nitrógeno en la célula a partir de ellos. Por lo tanto, en el caso que ahora nos ocupa, trataremos esencialmente de la formación de glutamato y glutamina en las bacterias entéricas en general. Se sabe que las enterobacterias utilizan glucosa como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno, para crecer en un medio mínimo. En estas condiciones, el metabolismo intermedio funciona principalmente con los grupos nitrogenados que provienen de glutamato y de glutamina. La formación de glutamato procede esencialmente por 3 vías, dependiendo de la forma en las que se encuentren los átomos de carbono y nitrógeno en el medio; estas vías son:

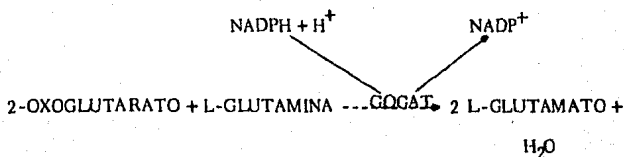
1) La que utiliza 2-oxoglutarato en reacciones enzimáticas diferentes de la transaminación como son:

a) A partir de amonio y 2-oxoglutarato, reacción catalizada por la enzima deshidrogenasa glutámica (L-glutamato: NADP⁺ óxido reductasa; EC 1.4.1.4.) (GDH).

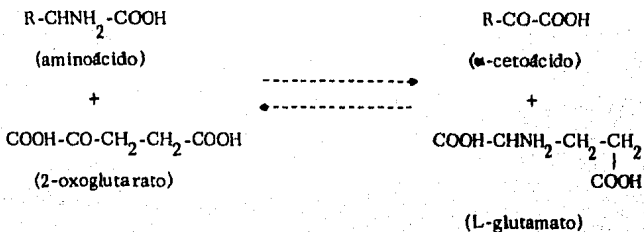
La reacción catalizada es:



b) A partir de 2-oxoglutarato y L-glutamina, reacción catalizada por la enzima glutamato sintasa (L-glutamato: NADP⁺ óxido reductasa, EC 1.4.13.) (GOGAT) en forma acoplada con la reacción dependiente de ATP que es catalizada por la enzima glutamino sintetasa. La reacción catalizada por la GOGAT es la siguiente:



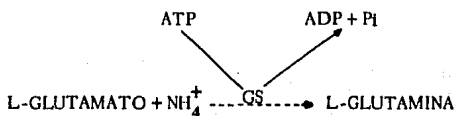
2) A partir de 2-oxoglutarato y los grupos amino de otros aminoácidos por transaminación; la reacción general es :



3) A partir de átomos de carbono y de nitrógeno derivados de la degradación de otros aminoácidos.

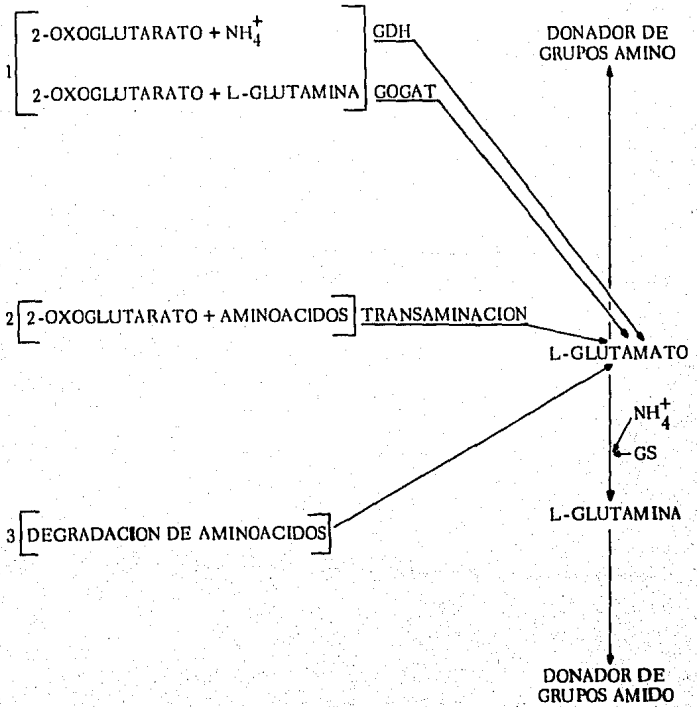
En otros microorganismos se han observado también reacciones catalizadas por deshidrogenasas glutámicas pero que utilizan NADH y éstas parecen estar involucradas en procesos catabólicos (desaminación oxidativa) mientras que las enzimas dependientes de NADPH realizan principalmente la función biosintética (aminación reductiva) del glutamato. En las enterobacterias se ha descrito solamente la GDH biosintética.

La formación de glutamina se realiza por una sola vía mediante la reacción catalizada por la enzima glutamino sintetasa (L-glutamato: amonio-ligasa, EC 6.3.1.2.) (GS). La información que se tiene sobre esta enzima es muy amplia y se sabe que esta sujeta a varias formas de regulación lo que implica un riguroso control celular sobre la concentración y actividad de la GS. La reacción que cataliza es la siguiente (2) :



En la figura 1 se esquematizan las formas de incorporación del amonio a moléculas orgánicas y las tres principales vías de formación del glutamato para llegar a la biosíntesis de glutamina.

FIGURA 1



Puede observarse que la asimilación de amonio y su utilización para la formación de glutamato en las enterobacterias está controlada por las tres enzimas antes mencionadas : GDH , GOGAT y GS y la relación entre ellas se esquematiza en la Figura 2 .

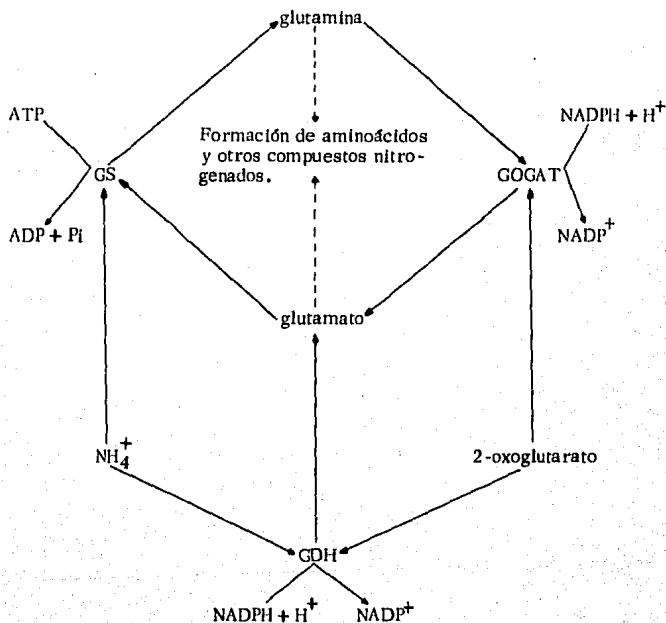


FIGURA 2

De las enzimas mencionadas anteriormente , trataremos en particular de la glutamato sintasa (GOGAT) ya que este trabajo versa sobre la caracterización de los genes que codifican para las dos subunidades que componen la GOGAT de Escherichia coli K-12.

Ha sido descrito por varios autores que el mecanismo primario para la síntesis de aminoácidos a partir de amonio y metabolitos intermedios , es realizado por la GDH; o bien, en aquellos organismos que carecen de esta enzima , por algunas deshidrogenasas de aminoácidos análogas como la alanina deshidrogenasa . Sin embargo, Tempest y colaboradores (3) , realizaron observaciones que apuntaban hacia una vía alternativa de la asimilación del amonio en las bacterias. Estas observaciones son las siguientes : a) Mutantes de Bacillus subtilis que habían perdido tanto alanina deshidrogenasa como la deshidrogenasa glutámica eran aún capaces de crecer en medio mínimo. b) La síntesis de deshidrogenasa glutámica en Klebsiella aerogenes podía ser reprimida casi totalmente sin afectar la capacidad de estos microorganismos de asimilar amonio y crecer en medio mínimo.

Una investigación detallada de este hecho reveló la existencia de una enzima que utilizaba glutamina para sintetizar glutamato y que era desconocida hasta entonces.

Se estableció claramente que la síntesis de glutamato, en cultivos de Klebsiella aerogenes limitados de amonio, podía efectuarse -- por un proceso que involucraba dos etapas; primero la síntesis de glutamina donde se utiliza una molécula de ATP y luego la transferencia reductiva del grupo amido a la posición 2 del 2-oxoglutarato, formándose así -- dos moléculas de glutamato, en esta reacción se consume NADPH.

De esta manera las reacciones de formación de glutamato -- vía glutamina y la reacción catalizada por la GDH, son casi idénticas con la excepción del gasto de una molécula de ATP; las reacciones correspondientes se pueden observar en la Figura 3.

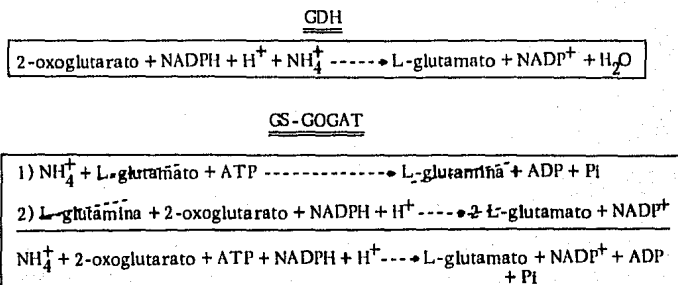


FIGURA 3

Actualmente se reconoce que la reacción 1 de la formación de glutamato por la vía GS-GOGAT está catalizada por la glutamino sintetasa y que la reacción 2 es catalizada por la glutamato sintasa.

Tempest y col. (3) realizaron un estudio del contenido y distribución de GOGAT y GDH en varias especies de bacterias y levaduras encontrando que, mientras la GDH estaba ampliamente distribuida, la formación de glutamato por la GOGAT solo se manifestó en los procariotes. Esto incluye a los organismos fijadores de nitrógeno, varias especies de algas azul-verdes, algunos anaerobios, bacterias termofílicas y criofílicas.

En el caso de los microorganismos fijadores de nitrógeno se conoce que el amonio es el producto primario del proceso de fijación y que este metabolito es un potente inhibidor y posible represor de la nitrogenasa, entonces para que los organismos continúen fijando el nitrógeno debe existir algún mecanismo para eliminar eficientemente el amonio tan pronto como es formado. Algunos autores han planteado la posibilidad de que la GOGAT, presente en estos organismos funcione inicialmente para eliminar el amonio que se está formando (4).

Por otro lado, recientemente se ha reportado actividad de GOGAT en ciertos organismos eucariotes tales como Schizosaccharomyces y Neurospora crassa (17). En las plantas se sabe que las dos enzimas importantes para la síntesis de glutamina y para la transferencia de su nitró-

geno amido a otros aminoácidos son la glutamino sintetasa y la glutamato sintetasa respectivamente. Estas dos enzimas se han aislado, encontrándose a la glutamino sintetasa tanto en el citosol como en los plástidos, a diferencia de la glutamato sintetasa que solo está presente en los plástidos (18).

Los estudios bioquímicos acerca de la GOGAT de Escherichia coli son amplios y han sido realizados por varios autores (5-7), a partir de la purificación a homogeneidad de la enzima. La Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica estuvo de acuerdo con el nombre de glutamato sintetasa ya que, la enzima cataliza la síntesis de glutamato pero no utiliza ATP, las siglas de GOGAT provienen de "glutamino (amido): 2-oxoglutarato amino transferasa (oxido reductasa NADP)", nombre sugerido inicialmente por Tempest (3).

Se sabe que la GOGAT es una flavoproteína que contiene 7.8 moles de flavina, 38.4 moles de hierro y 30.4 moles de azufre por 800,000 gr. de proteína; tiene un coeficiente de sedimentación de 20S. Se le determinó un peso molecular de 800,000 d por equilibrio de sedimentación y filtración en gel. El espectro de absorción es máximo a 278 nm, 380 nm y 440 nm. Por espectros de absorción y de resonancia electrónica paramagnética del NADPH reducido se sugiere la formación de un intermediario flavina semiquinona estable. La proteína para migra como banda única en electroforesis en geles de poliacrilamida a pH 7.2 y pH 8.5 y al tratarla con SDS, urea o guanidina aparecen dos polipéptidos de 135,000 d y 53,000 d de peso molecular en electroforesis de poliacrilamida-SDS, lo que sugiere que esta enzima está formada de dos subunidades diferentes.

Las K_m 's aparentes para NADPH, 2-oxoglutarato y L-glutamina son $7.7 \mu\text{M}$, $7.3 \mu\text{M}$ y $250 \mu\text{M}$ respectivamente. Según Miller (5), se puede mantener la enzima pura a -80°C en presencia de 2-oxoglutarato y EDTA por más de un año conservando su actividad total. El pH óptimo es de 7.6 y entre los más potentes inhibidores de la actividad de la enzima están L-aspartato, L-metionina, D-glutamato y NADP^+ .

Se han aislado la subunidad pesada y la subunidad ligera de la GOGAT de Escherichia coli, y las características que presentan difieren de otras amidotransferasas conocidas. Se estableció que es en la subunidad pesada donde se une la glutamina para la formación de glutamato: esta actividad es dependiente de las flavinas y del Fe-S contenidos también en esta subunidad, aparentemente es necesaria una cisteína para la unión de la glutamina, en esta subunidad se determinó una actividad de glutaminasa (6, 7). Para la subunidad ligera, se observó que también podía formar glutamato pero a partir de amoníaco, en reacción similar a la de GDH. Pudiera pensarse que la deshidrogenasa glutámica y la subunidad ligera de GOGAT son la misma proteína pero esta posibilidad queda descartada ante la falta de reacción cruzada entre los anticuerpos anti-GDH y la subunidad ligera de GOGAT (6).

El mecanismo por el cual forman glutamato ambas subunidades es diferente según el resultado de la utilización del NADPH (7). La actividad dependiente de glutamina es inhibida por una clorocetona

y por metionina sulfoximina, ambos compuestos análogos de la glutamina. Sin embargo, estas sustancias no inhiben la formación de glutamato dependiente de amonio y esta última actividad se ve inhibida por ditionito sódico.

Poco se conoce sobre la regulación de la formación de la -- GOGAT (2). En trabajos realizados con Klebsiella aerogenes, se observan algunas contradicciones ya que se han reportado altos niveles de la enzima en cultivos limitados de amonio (8) respecto de cultivos crecidos en exceso de amonio. Sin embargo, otros trabajos realizados con otra cepa de K. aerogenes reportan que el nivel de GOGAT era más bajo en células crecidas en condiciones limitantes de amonio que en exceso de éste (9). Brenchley y col. (10), reportaron en un extenso estudio realizado -- con S. typhimurium, la existencia de altos niveles de GOGAT en células silvestres crecidas en medio mínimo con glucosa y exceso de amonio a -- pesar de la presencia de glutamato y glutamina. Sin embargo, se encontró una actividad baja en cultivos crecidos con caldo nutritivo o en medio de glucosa y amonio suplementados con aspartato o con una combinación de aminoácidos que inhiben la actividad de la glutamino sintetasa.

Se ha reportado también que la adición de cAMP a mutantes cya^- de E. coli, bajan el nivel de GOGAT alterando también la velocidad de crecimiento. En otro estudio, La Pointe (11), reporta un incremento de cinco veces en el nivel de GOGAT en cepas de E. coli con una mutación termosensible de la glutamyl-tRNA sintetasa cuando se crecen a una

temperatura parcialmente restrictiva y donde la velocidad de crecimiento se vea reducida . En este caso , los niveles de glutamino sintetasa se incrementaron 50 veces lo cual podfa alterar el nivel intracelular de glutamina . De estos datos se ha concluido que la formación de GOGAT está regulada aunque no ha sido posible establecer el mecanismo de esta regulación (2) .

Sobre la genética de la formación de la GOGAT , se han descrito cepas mutantes en K. pneumoniae , K. aerogenes , E. coli y S. typhimurium . Estas mutantes son incapaces de crecer en medio mínimo con glucosa conteniendo una baja concentración de amonio o una variedad de compuestos nitrogenados como única fuente de nitrógeno . Estas cepas fueron descritas originalmente como Asm^- o negativas para la asimilación de amonio (4) .

El locus genético involucrado en la biosíntesis de GOGAT , denominado glt B , se reportó originalmente unido al locus mal P,Q . Sin embargo , Pahel y col. (12) han relocalizado este locus (glt B) en la cercanía del gene arg G , en el cromosoma de E. coli . Tyler ha propuesto (2) que el fenotipo Asm^- podfa resultar de mutaciones en cualquiera de dos genes estructurales ya que la GOGAT está formada por dos subunidades diferentes , o bien que este fenotipo podfa resultar también de alteraciones en una o más proteínas regulatorias . Sin embargo , no se han reportado cepas Asm^- que pierdan la actividad de GOGAT por una mutación no ligada a arg G lo que sugiere que , los genes para ambas subunidades están cercanos a arg G (2) .

Una alternativa interesante para estudiar los genes que codifican para las enzimas antes mencionadas, se ha presentado con el aislamiento de plásmidos que complementan mutaciones presentes en estos genes (13). Estos plásmidos se han aislado a partir de un banco de genes de E. coli (14). Esto ha abierto la posibilidad de estudiar la organización física, transcripción in vitro, expresión en multicopia y regulación de estos genes.

Los plásmidos aislados son, pACR 1 que complementa la mutación gln A20 de la cepa MX 705 que es auxotrofa para glutamina, pRSP 1 y pRSP 20 que complementan las mutaciones gdh-1 y glt B31 respectivamente de la cepa PA 340. Células de esta cepa conteniendo estos dos plásmidos por separado, pierden ahora la auxotrofia por glutamato. En el caso de la MX 729 (pRSP 1 / PA 340) se detecta actividad de GDH -- pero no de GOGAT y en el caso de la cepa MX 730 (pRSP 20/ PA 340) se tiene ahora actividad de GOGAT pero no de GDH (13). Se ha demostrado que estos plásmidos contienen los genes que codifican para estas enzimas y parte de esta tesis corresponde al trabajo realizado donde se demuestra la presencia de los genes que codifican para las dos subunidades de la -- GOGAT de E. coli K-12 en el plásmido pRSP 20. A continuación se anexan los artículos publicados en este respecto (15, 16).

En función de los datos anteriores, nuestro siguiente objetivo fue la subclonación de los genes que codifican para ambas subunidades de la enzima en aquellos fragmentos de DNA más pequeños que lleven cada uno de los genes estructurales así como sus regiones reguladoras.

A continuación se detallan los experimentos llevados a cabo para subclonar los genes que codifican para las dos subunidades de GOGAT de Escherichia coli K-12 en plásmidos independientes. Para la construcción de los plásmidos y para el sistema de minicélulas conteniendo éstos - últimos, se utilizó la misma metodología descrita en los artículos anteriores.

A) Subclonación de fragmentos generados por restricción del pRSP 20 en diversos vehículos de clonación molecular.

Como se ha mencionado, Covarrubias y col. (15) reportaron el aislamiento de tres plásmidos híbridos de Col E1 que complementaban las mutaciones gln A20, gdh-1 y glt B31. El plásmido pRSP 20 que complementa la mutación glt B31 de la cepa PA 340, lleva los genes que codifican para las dos subunidades de la enzima GOGAT de E. coli (16). En la Figura 4 se presenta un mapa de restricción del pRSP 20; para localizar la posición relativa de los genes que codifican para las dos subunidades de GOGAT en el fragmento de DNA cromosomal clonado en el pRSP 20 se utilizaron diversas estrategias las cuales se describen a continuación.

Una mezcla de los plásmidos pRSP 20 y pBR 328 (19), se trató con la endonucleasa de restricción Eco R1 y los fragmentos generados se ligaron con la enzima ligasa de T4. La mezcla resultante de la ligasa se utilizó para transformar a la cepa productora de minicélulas -- (P678-54) y se seleccionaron las clonas Cm^S, Tc^R y Ap^R. En una purificación rápida de plásmido de estas clonas, se encontraron dos tipos di-

8. Isolation of *E. coli* Chromosomal DNA Regions Carrying *glnA*, *gdh* and *gltB* Structural Genes

ALEJANDRA COVARRUBIAS, RAY SÁNCHEZ-PESCADOR, EDMUNDO LOZOYA, FERNANDO BASTARRACHEA, AND FRANCISCO BOLIVAR

Departamento de Biología Molecular
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70228, México 20, D. F.,
México.

SUMMARY

Three hybrid plasmids were isolated from the Clarke-Carbon *E. coli* gene bank. These recombinant DNA molecules, pACR1, pRSP1 and pRSP20 complemented *glnA*, *gdh* and *gltB* mutations respectively. In every case, the plasmid conferred to otherwise mutant cells the capacity to synthesize the corresponding wild type enzymes: glutamine synthetase, glutamate dehydrogenase and glutamate synthase, respectively. Evidence is presented that indicates the presence of the *glnA* gene in pACR1, the *gdh* gene in pRSP1 and *gltB* gene(s) in pRSP20. Initial characterization of these plasmids using restriction endonucleases, is also presented.

INTRODUCTION

In *Escherichia coli* and other enteric bacteria, three enzymes play a crucial role for the assimilation of ammonia into glutamate and glutamine. Glutamine synthetase (GS), is not only responsible for

the biosynthesis of glutamine but also for the incorporation of ammonia into glutamate through a coupled reaction with glutamate synthase (GOGAT) (1, 2). In addition, glutamate can be synthesized from ammonia and oxoglutarate by a reaction catalyzed by glutamate dehydrogenase (GDH).

Enteric bacterial strains lacking GDH do not require glutamate for growth. Such mutants grow as well as wild type strains on both low and high ammonia concentrations and on other nitrogen sources (1, 2).

Mutants lacking GOGAT can grow without glutamate on minimal medium containing glucose and excess ammonia but are unable to grow on minimal medium containing a low ammonia concentration or other organic compounds as sole sources of nitrogen (2, 3). Mutants lacking both GDH and GOGAT activities can not utilize ammonia as the only nitrogen source and require glutamate for growth (4).

Mutations affecting the synthesis and regulation of GS have been isolated in different enteric bacteria. Genetic studies have shown that these mutations are localized at a number of distinct loci around the chromosome: *glnA*, *glnB*, *glnD*, *glnE*, *glnF* and *glnG* (*glnR*) (5, 6, 7). From all these loci, the *glnA* gene, which has been mapped at 85 min in the linkage map of *E. coli* (8), is known to be the structural gene for the GS subunit.

To study the physical organization and the expression of their respective genes in different genetic backgrounds, we sought to isolate individual hybrid plasmids which contain genes that complement *E. coli* chromosomal mutations affecting GS, GDH and GOGAT activities, respectively.

We have screened the Clarke and Carbon *E. coli* gene bank (9), for the presence of GS, GDH and GOGAT gene-complementing mutations and have isolated three different plasmids (10). One of these, pACR1, carrying the GS structural gene, *glnA*; a second, pRSP1 carries the *gdh* gene; and a third, pRSP20, complements the *gltB31* mutation that affects GOGAT activity. The isolation and initial characterization of these plasmids are described in the present paper.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains. The *E. coli* strains used in this work are listed in Table I, and have been described before (10).

Media and growth conditions. For most experiments the NN minimal-medium was used (10). Glucose at 0.2% was always added as

TABLE I
List of Strains

Strain	Genotype	Source or Reference
CS520	HfrC <i>trpA58 metB1 glyV50 supF58 relA1</i>	Clarke and Carbor. (9)
RR1	F' <i>proA2 leuB6 thi-1 lacY1 galK2 rpsL20 hsdS</i>	Bolivar <i>et al.</i> (13)
AB1206	F' 14/ <i>proA2 his4 thi-1 rpsL8 lacY1 galK2 tfr-3 supE44 (ilvE-argH) ΔE2</i>	A. J. Pittard via A. J. Clark
PA340	F <i>thr-1 leuB6 gdh-1 hisG1 gltB31 argH1 thi-1 ara-14 lacY1 gal-6 malA1 xyl-7 mtl-2 tonA2 λRλ- rpsL9 supE44</i>	F. Jacob via B. J. Bachmann
MX705	F' <i>glnA20 proA2 leuB6 thi-1 lacY1 galK2 rpsL80 rsdS</i>	F. Bastarrachea <i>et al.</i> Chapter 7
MX727	F' <i>thi ilv-680 (pro-lac) Δ (gas-pgl-att) bio ΔglnA21::Tn5</i>	F. Bastarrachea <i>et al.</i> Chapter 7
MX729	Same as PA340 but carrying pRSP1	Covarrubias <i>et al.</i> (10)
MX730	Same as PA340 but carrying pRSP20	Covarrubias <i>et al.</i> (10)
MX731	Same as MX705 but carrying pACR1	Covarrubias <i>et al.</i> (10)
MX746	Same as MX727 but carrying pACR1	Covarrubias <i>et al.</i> (10)

carbon source. Nitrogen sources were either 0.5mM or 15 mM NH_4Cl , L-glutamate (2mg/ml) or L-glutamine (1mg/ml). Other growth factors were added at predetermined optimal concentrations from $1 \times 10^{-6}\text{M}$ to $2 \times 10^{-3}\text{M}$. Luria broth modified by the omission of glucose, was used as the rich medium. For solid media, agar (Difco) at a final concentration of 1.5% was added. Strains were maintained as slants of Luria medium except MX705 which was maintained on Luria supplement with glutamine (1mg/ml) and merodiploid strains which were maintained on glucose-NN medium with 15 mM NH_4Cl .

Plasmid DNA purification and restriction endonuclease analysis. ColE1 and ColE1 hybrid plasmids were prepared by the method of Betlach *et al.* (11) after chloramphenicol (200 mg/l) amplification. All the restriction enzymes used in this work were prepared by the method of Greene *et al.* (12) with the exception of the enzyme *Sma*I which was obtained from Bethesda Research Labs. The reaction conditions for the various restriction enzymes have been previously reported (13). Agarose gel electrophoresis was carried out in a vertical slab gel apparatus using a Tris-Borate-EDTA System (13).

Enzyme assays. For enzyme assays, culture were grown on glucose-NN medium with the nitrogen sources added as indicated. Culture and harvesting conditions were those described by Bender *et al.* (14). The GS assay used for whole cells and extracts was the glutamyl transferase assay described by Shapiro and Stadtman (15), using the final concentration of reactants recommended by Bender *et al.* (16), except that the pH was 7.55, the isoactivity point for both the adenylylated and nonadenylylated forms of *E. coli* GS (17). In parallel assays, 60 mM $MgCl_2$ was added to measure the adenylation state of GS subunits, since Mg^{2+} inhibits the activity of the adenylylated subunits only (18). To determine the average state of adenylylation (\bar{n}), we used the formula suggested by Stadtman *et al.* (18).

For determination of GDH and GOGAT activities, 100 ml cells were grown to a density of 6×10^8 cells/ml on glucose NN medium with 30mM NH_4Cl as only nitrogen source, except those of strain PA340 which were grown on the same medium supplement with 2 mg/ml of glutamate.

Cells were centrifuged, resuspended in a 1/100 volume of buffer (50mM Tris, pH7.6 plus 10 mM mercaptoethanol and disrupted in a Branson sonifier. A clear supernatant was obtained after centrifugation for 30 min at 10,000xg. The GDH and GOGAT activities were determined spectrophotometrically by recording the initial rate of NADPH oxidation at 340nm as described by Meers *et al.* (19).

Enzyme purification. To purify GS the bacteria were grown in aerated cultures at 37°C in glucose NN medium containing either 0.2% glutamic acid plus 0.5mM NH_4Cl or glutamine (1 mg/ml) as nitrogen source. The cells were harvested in the late logarithmic growth phase, washed twice with extraction buffer (5mM KH_2PO_4 , 0.5 mM EDTA, 50 mM K_2HPO_4 , pH 7.2), resuspended in the same buffer containing 2.25 mM $MnCl_2$ and disrupted by sonication. The suspension was centrifuged 15 min at 10,000 rpm and the supernatant subjected to a purification procedure based on affinity chromatography on anthranilate-bound Sepharose (20, See also Chapter II). Glutamate synthase was purified from the same strain as reported

to homogeneity, as described by Sakamoto *et al.* (21), with some modifications. Instead of the Sepharose 6B chromatography step, we utilized a preparative flat bed electrophocusing apparatus with Sephadex G75 (superfine) as the support (LKB, Application note 198). Glutamate synthase was purified from the same strain as reported by Sakamoto *et al.* (21)

Immunoprecipitation of GS. Immunoprecipitation studies were carried out as previously described by Palacios *et al.* (22). The *E. coli* anti-GS gamma globulin fraction used was kindly donated by S. López and R. Palacios.

Purification and labelling of minicells. Plasmid containing minicells were grown and purified as described by Meagher *et al.* (23). Minicells were labeled with 50 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}^{35}\text{S}$ -methionine in the presence of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of each of the unlabeled amino acids.

Other methods. Colicin E1 was prepared from strain JC411 ColE1 as described by Schwartz and Helinski (24) up to the ammonium sulfate precipitation step. Transformants were tested for colicin immunity by cross-streaking on L-broth agar plates previously spread with the colicin E1 preparation described above. Protein was determined in whole cells or in extracts by the method of Lowry *et al.* (25) using bovine albumin as a standard. Polyacrylamide slab gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate, was performed according to Laemmli (26).

RESULTS

Isolation of ColE1 hybrid plasmids

One liter batches of M9 medium were inoculated with 100 different *E. coli* strains from the Clarke-Carbon bank, and plasmid DNA was isolated. We were able to obtain 22 DNA pools. With these DNA pools, two recipient strains were transformed: PA340, in order to isolate recombinant plasmids complementing either *gdh* or *gltB31* mutations, and MX705, for plasmids complementing the *glnA20* allele. We were able to isolate a recombinant plasmid, termed pACR1, from one Gln⁺ MX705 transformed clone and two plasmids, termed pRSP1 and pRSP20, from Glu⁺ PA340 transformed clones.

GDH and GOGAT activities in cells harboring plasmids pRSP1 or pRSP20

The activities of GDH and GOGAT were determined in cells extracts from strains MX729 (PA340/pRSP1) and MX730 (PA340/pRSP20). Results are shown in Table II. GDH activity was only

TABLE II

Glutamate Dehydrogenase and Glutamate Synthase Specific Activities
Determined by Plasmids pRSP1 and pRSP20

Strain	Genotype	GDH	GOGAT
CS520	<i>gdh+</i> <i>gltB+</i>	184.1	51.2
PA340	<i>gdh-1</i> <i>gltB31</i>	2.1	0.6
MX729	PA340/pRSP1	448.6	0.5
MX730	PA340/pRSP20	2.3	128.6

One hundred ml cultures were grown to a density of 6×10^8 cells/ml on glucose NN medium with 30 mM NH_4Cl as the only nitrogen source, except those of strain PA340 which were grown on the same medium supplemented with 2 mg/ml glutamate.

detected in strain MX729. In this case, the GDH specific activity was approximately 2.4 fold higher than that observed for the wild type strain CS520. The GOGAT activity of MX729 cells was as low as that obtained for PA340 cells carrying no plasmid. By contrast, MX730 cells synthesized GOGAT with an activity higher by a factor of 2.5 than the one synthesized by wild type CS520 cells. Consequently, plasmid pRSP1 complemented the *gdh* mutation, and plasmid pRSP20 complemented the *gltB31* mutation from PA340.

GS activity determined by pACR1

The total amount of GS ($-\text{Mg}^{+2}$) as well as the amount of nonadenylylated GS ($+\text{Mg}^{+2}$) was determined using the transferase assay in cells of strains MX731 (MX705/pACR1), MX746 (MX727/pACR1), MX705(*glnA20*), MX727 (*glnA21::Tn5*), RR1 (the *glnA+* strain from which MX705 was derived) and, CS520 (*glnA+*) from which the colony bank of ColE1 hybrid plasmids was originally made (9). In addition, the GS biosynthetic activity was measured by the forward reaction assay (14, 16). These results are summarized in Table III.

Wild type *glnA+* strains RR1 and CS520 synthesized derepressed levels of partially adenylylated GS when grown on medium with either 0.5 mM ammonium or glutamate as sole nitrogen sources. Under similar growth conditions, MX731 cells had a two-fold higher GS activity, half of which was also adenylylated. This high GS activity

TABLE III

GS Specific Activities and Adenylation States of E. coli Strains

Strain (genotype)	Nitrogen Source	GS assay		n	Forward reaction assay
		-Mg ²⁺	+Mg ²⁺		
CS520 (<i>glnA</i> ⁺)	0.5 mM NH ₄ ⁺	0.92	0.43	6	0.40
	15 mM NH ₄ ⁺	0.08	0.01	10	0.01
	Glutamate	0.66	0.34	6	0.35
	Glutamine	0.53	0.40	3	0.32
RR1 (<i>glnA</i> ⁺)	0.5 mM NH ₄ ⁺	1.03	0.52	6	0.52
	15 mM NH ₄ ⁺	0.09	0.02	9	0.02
	Glutamate	0.80	0.43	6	0.43
	Glutamine	0.64	0.57	1	0.37
MX705 (<i>glnA20</i>)	Glutamine	<0.01	<0.01	—	0.01
MX731 (pACR1 <i>glnA</i> ⁺ / <i>glnA20</i>)	0.5 mM NH ₄ ⁺	1.95	1.07	5	0.93
	15 mM NH ₄ ⁺	0.08	0.01	10	0.01
	Glutamate	1.99	1.26	6	0.88
	Glutamine	0.16	0.06	7	0.06
MX727 (<i>glnA21::Tn5</i>)	Glutamine	<0.01	<0.01	—	0.01
MX746 (pACR1 <i>glnA</i> ⁺ / <i>gln21::Tn5</i>)	0.5 mM NH ₄ ⁺	1.96	1.11	5	0.68
	15 mM NH ₄ ⁺	0.17	0.04	9	0.01
	Glutamate	1.59	0.81	6	0.45
	Glutamine	1.68	1.46	2	0.72

Inocula were grown overnight in minimal medium with the nitrogen source indicated in the table. Cultures were diluted 1:10 with the corresponding fresh medium and aerated until growth reached approximately 6×10^8 cells/ml.

Enzyme determinations were carried out as described in MATERIALS AND METHODS. Samples of cultures of the merodiploid strains grown on glutamine as sole nitrogen source were removed before harvesting and screened for the presence of Gln-segregants. These were found only at frequencies of 5% for MX731, and 0.5% for MX746.

could be the result of increased gene dosage, since ColE1 hybrid plasmids are known to exist in bacterial cells at 15-20 copies per chromosome (27).

A 15 mM ammonium concentration supported good growth of all Gln⁺ strains that were tested (table III), eventhough it caused a strong repression of GS synthesis. The well known pattern of enteric bacterial cells synthesizing small amounts of highly adenylated GS in response to their culturing on high ammonia concentration (5), was strictly followed by all strains that were tested.

Minicells carrying pACR1, pRSP1 and pRSP20

To demonstrate that these plasmids carry the GS, GDH and GOGAT structural genes, the synthesis of these proteins was studied in minicells. Minicells carrying the hybrid plasmids were purified and allowed to synthesize protein in the presence of ³⁵S-methionine.

Labeled proteins from minicells extracts were separated on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide slab gels and the results are shown in Figs. 1 and 2. In the case of minicells carrying pACR1, a plasmid coded protein (Fig. 1A, lane a) comigrates with purified GS monomer. Considering the results presented in the preceding sections, this radioactive polypeptide is very likely to be GS monomer. However, the possibility that the band could also be truncated colicin E1 (23), had to be discarded.

Therefore, radioactive minicells extracts were treated with rabbit anti GS gamma globulin as described (22). The GS specific antibodies precipitated only a 53,000 d. protein band, that again comigrates with purified GS monomer (Fig. 1B lanes h and i). These results clearly indicate the presence of *glnA* in pACR1.

In minicells extracts carrying pRSP1 plasmid, it can also be seen a ³⁵S labeled plasmid coded protein comigrating with purified GDH monomer (Fig. 2A lanes a and c respectively). To demonstrate that this protein was effectively GDH monomer, a double dimension electrophoresis was performed using radioactive extracts from minicells carrying pRSP1. In this experiment it was possible to visualize a protein comigrating with purified GDH monomer (Sánchez-Pescador *et al.*, unpublished results).

Plasmid pRSP20 was able to complement the *gltB31* mutation. To demonstrate the presence of the structural gene(s) for the GOGAT enzyme it was necessary to use the minicells system. Fig. 2B lane b, shows the ³⁵S labeled proteins coded by plasmid pRSP20; the position

of purified GOGAT subunits are shown by the arrows in lane c. It can be seen that plasmid coded proteins comigrate with purified GOGAT subunits.

Restriction endonuclease analysis of hybrid-plasmids

The three ColE1 hybrid plasmids pRSP1, pRSP20 and pACR1, were purified and treated with a collection of restriction enzymes in order to obtain preliminary restriction maps and molecular weights. The relative position of the endonuclease sites present in each DNA molecule, was determined by agarose gel electrophoresis of single and double digestion of plasmid DNA with different restriction enzyme combinations (10).

As can be seen Fig. 3, a 0.7 md restriction fragment can be derived from all three hybrid plasmids after digestion of DNA with the restriction endonuclease *Pst* I. The same fragment, which includes a *Sma*I site, can be obtained from plasmid ColE1. Therefore, we assume that this fragment is part of the inactivated colicin E1 structural gene in the ColE1-hybrid plasmids (28). These data allowed us to localize the position of the colicin E1 immunity gene and the origin of replication in the hybrid plasmids, assuming that no deletion or insertion of foreign DNA in the ColE1 segment occurred during the bank construction.

The hybrid plasmid, pACR1, has a molecular weight of 10.6×10^6 daltons and carried unique restriction sites for the endonucleases *Bgl* II, and *Hind* III. It carried two substrate sites for the restriction enzymes *Eco* RI, *Sal* I and *Bam* HI, three for *Sma* I and four *Pst* I. There were four *Hpa* I restriction sites in the molecule.

The plasmid pRSP1 has a molecular weight of 8.0×10^6 daltons, one substrate site for each of the restriction enzymes *Sal* I, *Bgl* II, and *Sma* I, two for the endonuclease *Eco* RI, three for *Pst* I and three for the endonuclease *Hpa* I. No sites for the restriction enzymes *Hind* III and *Bam* HI were detected in pRSP1.

The third plasmid, pRSP20 with a molecular weight of 12×10^6 daltons, has one substrate site for the restriction enzymes *Sal* I and *Bgl* II. It carried two substrate sites for the endonucleases *Eco* RI and *Sma* I, three for the endonuclease *Pst* I and four, possibly five, *Hind* III sites. Three of these *Hind* III sites have been mapped in the molecule; a fourth was localized in either one of the two *Hind* III positions shown as dashed lines in the map. A fifth site could be localized very close to one of these four sites. No *Bam* HI site was present in the hybrid molecule.

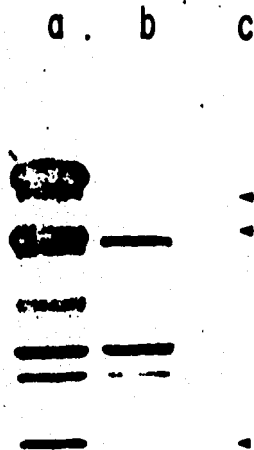


Fig. 1A. Autoradiography of a polyacrilamide SDS gel showing the [^{35}S] methionine labeled proteins produced by pACR1 (lane a) and ColE1 (lane b), in minicells.

Molecular weight markers (lane c) from the top to the bottom: 60,000 d, 50,000 (GS, *E. coli*), 25,000 and 17,800.

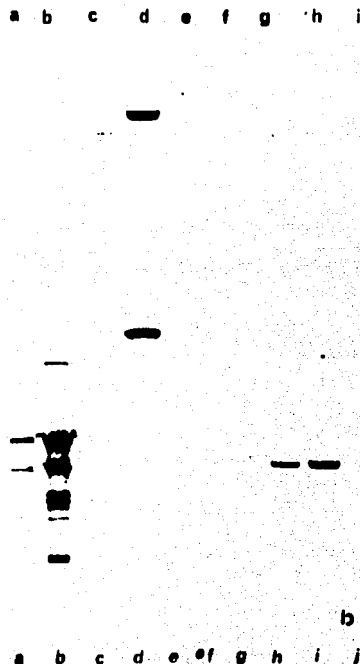


Fig. 1B. Immunoprecipitation of *de novo* synthesized GS. The immunoprecipitation was carried out as described in MATERIALS AND METHODS. The immunoprecipitates were processed for slab gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. The top part of the figure shows the stained gel and the bottom the autoradiography of the [^{35}S] labeled proteins. Lanes a and b show proteins coded by ColE1 and pACR1, respectively. Lanes c and g show purified (not labeled) GS monomer. Lanes d and j show the same molecular weight markers as in fig. 1A. Lanes e and f show the immunoprecipitation with anti *E. coli* GS of the ColE1 minicells extract, negative control). Lanes h and i show the immunoprecipitation with anti *E. coli* GS of the pACR1 minicells extract.

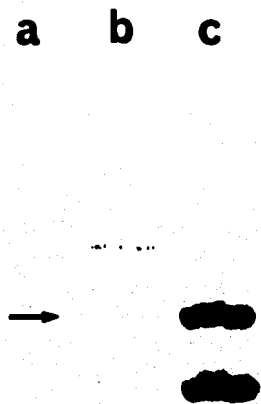
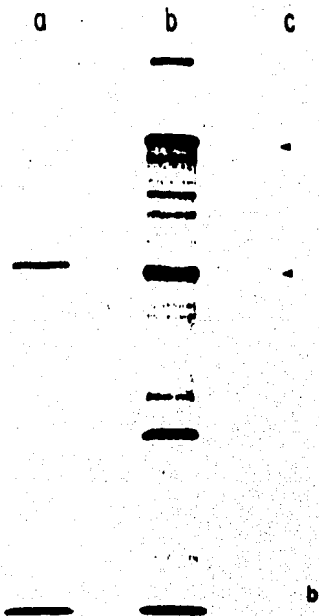


Fig. 2A Autoradiography of a polyacrylamide-SDS gel showing the [35 S] methionine labeled proteins coded by ColE1 (lane b) and pRSP1 (lane c), in minicells. The arrow in lane a shows the position of purified GDH monomer. Fig. 2B *De novo* synthesized labeled proteins codified by ColE1 (lane a) and pRSP20 (lane b) in minicells. The position of purified GOGAT subunits are shown on lane c.



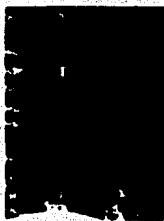
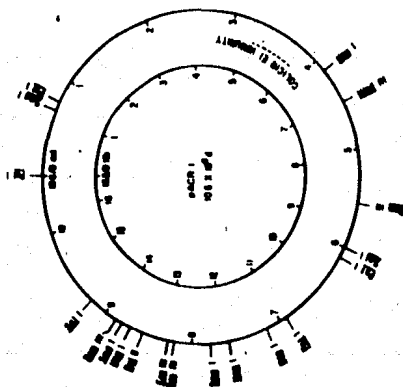
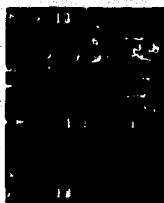
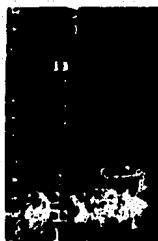
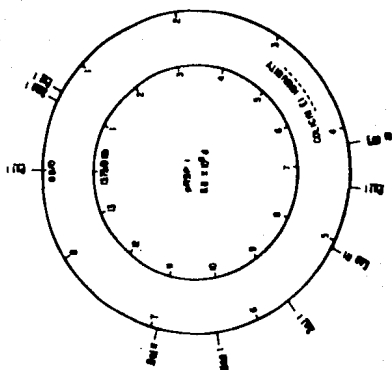
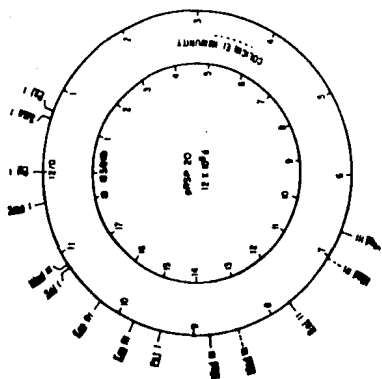


Fig. 3. Circular restriction maps of pRSP1 (A), pRSP20 (B) and pACR1 (C). The relative positions of restriction sites are drawn to scale on circular maps divided into units of 1×10^6 d (outer circle) and 1 kilobase (inner circle).

One percent agarose electrophoresis slab gels showing single and double restriction endonuclease digestions for each of the plasmid DNAs, are presented at the bottom of each map.

For the plasmid pRSP1: E: *EcoRI*; Bsm: *BglII* and *SmaI*; BS: *BglII* and *SalI*; BE: *BglII* and *EcoRI* (partial); B: *BglII*; Sm: *SmaI*; SmS: *SmaI* and *SalI* SmP: *SmaI* and *PstI*; ES: *EcoRI* and *SalI*; PE: *PstI* and *EcoRI*; PS: *PstI* and *SalI*. Molecular weight estimates are based on the six λ DNA fragments generated by *EcoRI* (A E) 19.7, 4.68, 3.7, 3.56, 3.03 and 2.09 md., (15).

For the plasmid pRSP20: HSm: *HindIII* and *SmaI*; H: *HindIII*, HB: *HindIII* and *BglII*; E: *EcoRI*; BE: *BglII* and *EcoRI*; B: *BglII*, P: *PstI*; PB: *PstI* and *BglII*; PS: *PstI* and *SalI*; EB: *EcoRI* and *BglII*; ES: *EcoRI* and *SalI*. Molecular weight markers as in the previous section. In addition, PM2 DNA digested with *HindIII* (PM2) was used. The molecular weights of the resulting fragments are: 3.14, 1.34, 0.6, 0.31, 0.29, 0.14 and 0.06 md; the last one not seen in the gel (15).

For the plasmid pACR1: PB: *PstI* and *BglII*; PE: *PstI* and *EcoRI* PH: *PstI* and *HindIII*; P: *PstI*; PBm: *PstI* and *BamHI*; PSm: *PstI* and *SmaI*; PS: *PstI* and *SalI*; PHp: *PstI* and *HpaI*; H: *HindIII*; S: *SalI* Sm: *SmaI*; Bm: *BamHI*; P: *PstI*; E: *EcoRI* Molecular weight markers are the same ones used for pRSP1 and pRSP20.

DISCUSSION

In this communication we reported the isolation and initial restriction enzyme characterization of three ColE1-hybrid plasmids that carry the GS, GDH and GOGAT structural genes.

The conclusive evidence that plasmid pACR1 carries the *glnA* gene was demonstrated via the specific immunoprecipitation with anti GS antibodies of a plasmid coded-protein of approximately 53,000d. Evidence presented here strongly suggests that pRSP1 carries the structural gene that codes for the GDH subunit and that plasmid pRSP20 carries the GOGAT structural genes. Double dimension electrophoresis, in which plasmid coded proteins comigrate with purified GDH and GOGAT monomers, has recently confirm this hypothesis (Sánchez-Pescador *et al.*, unpublished observations).

At the present time we are interested in isolating those minimal chromosomal DNA regions, from each of the three hybrid plasmids, that still code for these proteins. Accordingly, we have been able to subclone the *glnA* gene in different restriction enzyme fragments (Covarrubias *et al.*, unpublished results). The same is true for the *gdh* gene. The isolation of these fragments will allow us to establish a physical map of these genes, a step that we believe is essential for understanding the physical organization of the regulatory and structural regions.

Acknowledgements. We wish to thank Mario Rocha and Aurora Osorio for their technical help. This research was supported by Grants Nº 1649 and 1650 from Proyecto Nacional de Ciencias Básicas (PNCB) of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

REFERENCES

1. Brenchley, J. E., and Magasanik, B. (1974) *J. Bacteriol.* 117, 544-550.
2. Berberich, M. A. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 1498-1509.
3. Brenchley, J. E., Prival, M. J., Magasanik, B. (1975) *J. Biol. Chem.* 248, 6122-6128.
4. Pabel, G., Zelenetz, A. D., and Tyler, B. M. (1978) *J. Bacteriol.* 133, 139-148.
5. Tyler, B. (1978) *Ann. Rev. Biochem.* 47, 1127-1162.
6. Pabel, G., and Tyler, B. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4544-4548.
7. Kustu, S., Burton, D., Garcia, E., McCarter, L., and McFarland, N. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4576-4580.
8. Bachmann, B. J., Low, K. B., and Taylor, A. L. (1976) *Bacteriol. Rev.* 40, 116-167.
9. Clarke, L., and Carbon, J. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 4361-4365.

10. Covarrubias, A. A., Sánchez-Pescador, R., Osorio, A., Bollivar, F., and Bastarrachea, F. (1980) *Plasmid* 3, 150-164.
11. Betlach, M., Hershfield, V., Chow, L., Brown, W., Goodman, H. M., and Boyer, H. W. (1976) *Fed. Proc.* 35, 2037-2043.
12. Greene, P. J., H. L., Bollivar, F., Rodríguez, R. L., Betlach, M. C., Covarrubias, A. A., Backman, K., Russel, D. J., Tait, R., and Boyer, H. W. (1978) *Nucleic Acids Res.* 5, 2373-2380.
13. Bolivar, F., Rodríguez, R. L., Betlach, M. C., and Boyer, H. W. (1977) *Gene* 2, 75-93.
14. Bender, R. A., Janssen, K. A., Resnick, A. D., Blumenberg, M., Foor, F., and Magasanik, B. (1977) *J. Bacteriol.* 129, 1001-1009.
15. Shapiro, B. M., Stadtman, E. R. (1970). In: *Methods in enzymology* (H. Tabor and C. W. Tabor eds.) vol. 17A, pp. 910-922 Academic Press, New York.
16. Bender, R. A., and Magasanik, B. (1977) *J. Bacteriol.* 132, 100-105.
17. Bloom, F. R., Levin, M. S., Foor, F. and Tyler, B. (1978) *J. Bacteriol.* 132, 569-577.
18. Stadtman, E. R., Ginsburg, A., Ciardi, J. E., Yeh, J., Henning, S. B., and Shapiro, B. M. (1970) *Adv. Enz. Regul.* 8, 99-118.
19. Meers, J. L., Tempest, D. W., and Brown, C. M. (1970) *J. Gen. Microbiol.* 64, 187-192.
20. Palacios, R. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 4787-4791.
21. Sakamoto, N., Kotre, A. M., and Savagran, M. A. (1975) *J. Bacteriol.* 124, 775-783.
22. Palacios, R., Campomanes, M., and Quinto, C. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 3028-3034.
23. Meagher, R. B., Tait, R. C., Betlach, M., and Boyer, H. W. (1977) *Cell* 10, 521-536.
24. Schwartz, S. A., and Helinski, D. R. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 6318-6327.
25. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
26. Laemmli, U. K. (1970) *Nature (London)* 227, 680-685.
27. Hershfield, V., Boyer, H. W., Yanofsky, C., Lovett, M. A. and Helinski, D. R. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4576-4580.
28. Bell, G. I., DeGennaro, L. J., Gelfand, D. H., Bishop, R. J., Valenzuela, P., and Rutter, W. J. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 8118-8125.

Tight Linkage of Genes That Encode the Two Glutamate Synthase Subunits of *Escherichia coli* K-12

EDMUNDO LOZOYA, RAY SANCHEZ-PESCADOR, ALEJANDRA COVARRUBIAS, IRMA VICHIDO,
AND FRANCISCO BOLIVAR*

Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México 20, Distrito, Apdo Postal 70228 Federal, México

A hybrid deoxyribonucleic acid molecule, plasmid pRSP20, which was isolated from the Clarke and Carbon *Escherichia coli* gene bank, was shown to complement the *gltB31* mutation, which affects the synthesis of glutamate synthase in *E. coli* strain PA340. We present evidence which demonstrates that plasmid pRSP20 carries an 8-megadalton *E. coli* chromosomal fragment, including the genes encoding the two unequal glutamate synthase subunits. Polypeptides with molecular weights of about 135,000 and 53,000, which comigrated with purified *E. coli* glutamate synthase subunit polypeptides and immunoprecipitated with antibodies to *E. coli* glutamate synthase, were synthesized by minicells carrying the pRSP20 plasmid.

Glutamate occupies a central position in bacterial amino acid metabolism because it acts as an amino donor in the synthesis of practically all other amino acids. In enteric bacteria, glutamate can be formed by a variety of reactions. One of these is from ammonia and 2-oxoglutarate in a reaction catalyzed by glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.4). Glutamate can also be synthesized from 2-oxoglutarate and glutamine in a reaction catalyzed by glutamate synthase (EC 2.6.1.15). Particularly during growth under conditions of nitrogen limitation, the glutamate synthase-catalyzed reaction is coupled to the ATP-dependent production of glutamine from ammonia and glutamate catalyzed by glutamine synthetase (EC 6.3.1.2) (11).

The glutamate synthase of *E. coli* is an iron sulfide flavoprotein consisting of a dimer of two unequal subunits; the molecular weights of the two polypeptides are approximately 135,000 and 53,000 (8, 9). Four dimers apparently associate to form an oligomeric structure of 800,000 daltons (12, 19). The gene *gltB*, which is involved in the synthesis of this enzyme in this enteric bacterium, is closely linked to the *argG* locus (15) and is, in fact, the same locus previously called *aspB* (17).

Since glutamate synthase consists of two non-identical subunits, one might expect the phenotype lacking glutamate (Glt⁻) to be the result of mutations in at least two structural genes. It is interesting that in a substantial number of the independent *glt* mutants that have been isolated from *E. coli* (15), *Klebsiella aerogenes* (4), and *Klebsiella pneumoniae* (S. L. Streicher, F. R. Bloom, F. Fuor, M. Levin, and B. Tyler, Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1977, K88, p.

200), the loss of glutamate synthase activity is due to lesions linked to *argG* (15). These results suggest that either the structural genes for both subunits are linked to *argG* or they are unlinked but for some reason only mutations in the gene linked to *argG* give the Glt⁻ phenotype (19).

In this investigation we used an *in vitro* recombinant plasmid DNA molecule that complements the *gltB31* mutation of strain PA340 to demonstrate that the genes that encode the two glutamate synthase subunits are tightly linked in the *E. coli* chromosome.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. The strains used are listed in Table 1. *E. coli* strain PA340 is the same as strain CB100 from the laboratory of B. D. Sanwal, with which Berberich (1) showed that both *gltB* and *gdh* mutations are necessary to make a strain a glutamate auxotroph. PA340 reverts to glutamate independence at a frequency of 10⁻⁸/cell (15).

Media and growth conditions. For most experiments NN minimal medium was used. It contained (in grams per liter): KH₂PO₄, 13.6; K₂SO₄, 2.61; MgSO₄·7H₂O, 0.2; CaCl₂, 0.01; and FeSO₄·7H₂O, 0.0005. Glucose (0.2%) was always added as the carbon source. The nitrogen source was 15 mM NH₄Cl or L-glutamate (2 mg/ml; Sigma Chemical Co.). Other growth factors were added as previously described (3). Luria broth (13) modified by the omission of glucose was used as the rich medium. For solid media, agar (Difco Laboratories) at a final concentration of 1.5% was added.

Strain PA340 was maintained in slants of Luria medium; merodiploid strains were maintained on glucose-NN medium containing 0.5 mM NH₄Cl and the required supplements.

Cultures for DNA extraction were grown on M9 medium (13). All incubations were carried out at 37°C with shaking.

TABLE 1. List of strains

Strain	Genotype	Source or reference
CS520	HfrC <i>trpA58 metB1 glyV50 supF58 relA1</i>	J. Carbon
I678-54	F' <i>thr leu thi-1 supE lacY tonA gal mal xyl ara mtl mun</i>	R. Tait
PA340	F' <i>thr-1 leuB6 gdh-1 hisG1 gltB-31 argH1 thi-1 ara-14 lacY1 gal-6 malA1 xyl-7 mtl-2 tonA2 rpsL9 supE44</i>	
MX729	Same as PA340, but carrying pRSP1 (<i>gdh</i> ⁺)	3
MX730	Same as PA340, but carrying pRSP20 (<i>gltB</i> ⁺)	3
MX743	Same as PA340, but <i>gltB</i> ⁻	P1 (CS520) x PA340

Plasmid DNA purification and restriction endonuclease analysis. ColE1 and ColE1 hybrid plasmid pRSP20 were prepared by the method of Betlach et al. (Fed. Proc. 35:2037, 1977) after chloramphenicol (200 mg/liter) amplification. All of the restriction enzymes used in this work were prepared by the method of Greene et al. (5), with the exception of *Sma*I, which was obtained from New England Biolabs. The reaction conditions for the various enzymes have been described previously (2). Agarose gel electrophoresis was carried out in a vertical slab gel apparatus, using a Tris-borate-EDTA system (2).

Enzyme assays. For determinations of glutamate synthase activities, cells were centrifuged, suspended in 0.01 volume of buffer (50 mM Tris, pH 7.6, 10 mM mercaptoethanol), and disrupted with a Branson Sonifier. A clear supernatant was obtained after centrifugation at 10,000 × g for 30 min.

Enzyme activities were determined spectrophotometrically by recording the rate of NADPH oxidation at 340 nm, as described by Meers et al. (11). Measurements were made with a Zeiss model PMQII spectrophotometer (light path, 1 cm). One unit of glutamate synthase activity was defined as the amount of enzyme that oxidized 1 μmol of NADPH per min at 20°C. Specific activities are expressed as units of enzyme per milligram of protein.

Glutamate synthase. Glutamate synthase was purified to homogeneity as previously described by Sakamoto et al. (18).

Preparation of antibodies. To prepare anti-glutamate synthase antibodies, New Zealand rabbits (weight, 2 to 3 kg) were injected three times with 150 μg of purified *E. coli* enzyme (CS520 *gltB*⁺). Sera obtained from different bleedings were pooled, and the total globulin fraction was prepared by the method of Palacios et al. (16).

Protein electrophoresis. Slab gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate was performed as described by Laemmli (7). Two-dimensional electrophoresis was carried out as described by O'Farrell (14). The conditions for the first dimension (isoelectric point) were as follows: 6% acrylamide gel containing 10% Nonidet P-40; Biolyte (Bio-Rad Laboratories) with a pH range of 3 to 10. The gel was run at 400 V for 18 h at 20°C. The second dimension was run in a 0.1% sodium dodecyl sulfate-11% polyacrylamide gel for 4 h at 20 mA and 20°C.

Incorporation of [³⁵S]methionine into minicells. Minicells were isolated by three subsequent sucrose gradient centrifugations (10). Portions (2 ml) of the minicell suspension were incubated at 37°C for 30 min with shaking in the presence of a mixture containing 19 unlabeled amino acids (no methionine) and [³⁵S]methionine (927 Ci/mmol; New England Nuclear Corp.). The minicell suspension was chilled and centrifuged, and the pellet was stored at -70°C.

Immunoprecipitation of plasmid-encoded glutamate synthase. Immunoprecipitation studies were performed as reported by Palacios et al. (16).

Rocket quantitative immunoprecipitation. Rocket quantitative immunoprecipitations were performed as previously described (20). Samples (cell-free extracts) were applied to circular wells, and electrophoresis was in an agarose gel containing a monospecific antiserum. The relative amount of antigen was determined by measuring the areas of the rocket-shaped precipitates that were formed. A 1% gel containing 1% anti-glutamate synthase globulin fraction was used. The buffer was 25 mM sodium barbital (pH 8.6) containing 0.025% sodium azide. The gel was run for 15 h at 5 V/cm. After electrophoresis, the gel was washed extensively, dried, and stained with Coomassie brilliant blue R250.

RESULTS

Synthesis of glutamate synthase by minicells carrying pRSP20. We have previously reported the isolation of the ColE1 hybrid plasmid pRSP20, which complements the *gltB31* mutation present in *E. coli* strain PA340 (3). Figure 1 shows a detailed restriction map of pRSP20, including the recently determined *Kpn*I restriction sites. As Table 2 shows, PA340

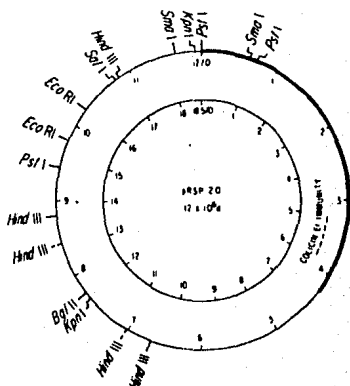


FIG. 1. Restriction map of pRSP20. The positions of the various restriction endonuclease substrate sites are drawn to scale on a circular map. The heavy-lined region of pRSP20 represents the ColE1 vector.

TABLE 2. Glutamate synthase specific activities determined in various strains*

Strain	Relevant genotype	Glutamate synthase sp act
CS520	<i>gdh</i> ⁺ <i>gltB</i> ⁺	52
PA340	<i>gdh-1 gltB31</i>	0.6
MX743 ^b	<i>gdh-1 gltB</i> ⁺	54
MX730	<i>pRSP20 gltB</i> ⁺ / <i>gdh-1 gltB31</i>	131

* Cultures (100 ml) were grown to a density of 8×10^8 cells per ml on glucose-NN medium containing 15 mM NH₄Cl as the nitrogen source, except for strain PA340, which was grown on the same medium supplemented with 2 mg of glutamate per ml.

^b Strain MX743 is a *gltB*⁺ transductant (P1 CS520) of strain PA340.

cells carrying plasmid pRSP20 synthesized glutamate synthase with a specific activity 2.5-fold higher than the specific activity of the enzymes synthesized by strain CS520 (3) and a *gltB*⁺ transductant of PA340.

To demonstrate that the gene or genes for one or both of the glutamate synthase subunits were present in pRSP20, we studied the synthesis of the proteins encoded by this plasmid in minicells. The minicell-producing strain P678-54 was independently transformed with the hybrid plasmid pRSP20 and the cloning vehicle ColE1. Minicells from stationary-phase cultures of transformants were purified and allowed to synthesize proteins in the presence of [³⁵S]methionine. Minicells were lysed with sodium dodecyl sulfate, and their proteins were separated electrophoretically in a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide slab gel. ³⁵S-labeled proteins were then located by autoradiography.

As Fig. 2, lane b', shows, the autoradiography of pRSP20-encoded proteins showed the presence of three main bands which were not present in minicells carrying ColE1 (Fig. 2, lane a'). It was interesting that two of these main proteins encoded by pRSP20 comigrated with purified glutamate synthase subunits (Fig. 2, lane c'). Because the 8-megadalton chromosomal DNA fragment present in pRSP20 is not sufficient to account for all the protein bands observed in lane b', we believe that at least some of the less intense bands represented degradation products of one or both glutamate synthase subunits.

Two-dimensional electrophoresis of pRSP20-encoded proteins. The results described above strongly indicated that pRSP20 carried the genes for the large subunit and possibly the small subunit of glutamate synthase. However, it has been reported that cloning at the EcoRI site of ColE1 disrupts the colicin E1 structural gene and that, in some instances, a 53,000- to 54,000-dalton truncated colicin E1

protein is synthesized instead of the normal 56,000-dalton colicin E1 polypeptide (10). To determine whether this protein band was composed, at least in part, of the small glutamate synthase subunit, we performed a two-dimensional electrophoresis analysis. Radioactive extracts from minicells carrying pRSP20 subjected to O'Farrell-type gel electrophoresis showed the presence of two proteins, which comigrated with the large and small purified glutamate synthase subunits (Fig. 3).

Specific immunoprecipitation of glutamate synthase encoded by pRSP20. Although the radioactive pRSP20-encoded polypeptides migrating in the positions of the purified glutamate synthase subunits were very unlikely to be anything other than these polypeptides, radioactive pRSP20 minicell extracts were treated with rabbit anti-glutamate synthase serum, as previously described (16), to demonstrate specific immunoprecipitation. As Fig. 4, lane c, shows, the specific antiserum precipitated only two bands, which again comigrated with the two enzyme subunits.

Quantitative immunoelectrophoresis of glutamate synthase. To determine whether *E. coli* strain PA340 was able to synthesize any antigen that cross-reacted with specific anti-glutamate synthase antibodies and whether MX730 (pRSP20 *gltB*⁺/*gltB31*) was able to synthesize more enzyme antigen than wild-type strain CS520 (*gltB*⁺) (as expected, due to the known multicopy nature of the ColE1 hybrid plasmids), we performed quantitative immunoelectrophoresis experiments in which we used extracts of

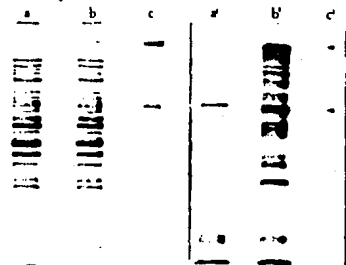


FIG. 2. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of Cuomassie brilliant blue stained proteins from minicells carrying ColE1 (lane a) and pRSP20 (lane b). Lane c contained the glutamate synthase subunits purified from CS520 cells. The autoradiography of this gel is shown on the right. Lanes a' and b' show the [³⁵S]methionine labeled proteins encoded by ColE1 and pRSP20, respectively. Lane c' shows the positions of the two glutamate synthase subunits (indicated by arrows).



FIG. 3. Autoradiograph of pRSP20-encoded proteins after two dimensional gel electrophoresis. Minicells carrying pRSP20 were purified and allowed to synthesize proteins in the presence of [35 S]methionine. The minicells, which were mixed previously with cold purified glutamate synthase, were lysed and electrophoresed on a two-dimensional gel. Finally, the gel was autoradiographed (see text). The arrows indicate the positions of migration of the two purified glutamate synthase subunits, which comigrated with plasmid-encoded proteins.

these *E. coli* strains. As Fig. 5, lanes e through h show, wild-type CS520 extracts had glutamate synthase antigenic levels which were approximately 30% those of MX730 extracts. However, PA340 (*gltB31 gdh-1*) (Fig. 5, lanes i, j, k, and l) and MX729 (pRSP1 *gdh⁺/gdh-1 gltB31*) (data not shown) cells did not synthesize detectable levels of glutamate synthase antigen.

DISCUSSION

The evidence presented here clearly demonstrates that the DNA regions that code for the large and small glutamate synthase subunits in *E. coli* are present in an 8-megadalton chromosomal DNA fragment. However, at the present time it is not known whether these regions are in fact two different structural genes which are part of the same operon or even whether they are contiguous. We believe that at least the last question could be answered in the near future as different chromosomal DNA fragments from pRSP20 are subcloned. However, certain evidence suggests that the DNA regions coding for these two enzyme subunits could be part of the same transcriptional unit. Quantitative immunoelectrophoresis experiments showed that when a CS520 (*gltB⁺*), MX743 (a *gltB⁺* transductant of PA340 [data not shown]), or MX730 (pRSP20 *gltB⁺/gltB31*) extract was used, it was possible to detect cross-reacting material with antibodies prepared against wild-type enzyme

m a b c

FIG. 4. Immunoprecipitation of *de novo*-synthesized glutamate synthase. Minicells carrying either pRSP20 or ColE1 were purified and allowed to synthesize proteins in the presence of [35 S]methionine. Immunoprecipitation was performed by the procedure described by Palacios et al. (16). The immunoprecipitates were processed for slab gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (16). The figure shows the autoradiography of immunoprecipitated proteins, when anti-glutamate synthase antibodies were used, of minicells (lane a), minicells carrying ColE1 (lane b), and minicells carrying pRSP20 (lane c). The arrows indicate the positions of the purified glutamate synthase subunits (lane m).

and that PA340 (*gltB31*) extracts did not synthesize detectable levels of glutamate synthase antigen (Fig. 5). Therefore, if *gltB31* is a single mutation, which seems to be the case (15), one simple way to explain how this mutation switches off the synthesis of two proteins is to consider that the genes coding for these proteins are part of the same transcriptional unit. However, another kind of evidence indicates that these coding regions are not part of the same transcriptional unit. If the large and small subunits are synthesized from the same transcriptional unit, then one would expect roughly equal molar quantities to be produced. This is apparently not the case because the data in Fig. 2 and 3 show both subunits present at roughly equal intensities, indicating that they might be synthesized at different rates. Alternatively, the *gltB31* mutation could affect an activator gene whose product may be required for the expression of both glutamate synthase structural genes. If this last hypothesis is true, the putative activator gene also has to be present in pRSP20.

The fact that the merodiploid strain MX730

Fig. 5. Rocket quantitative immunoelectrophoresis of glutamate synthase from extracts of CS520 (*gltB*⁺), PA340 (*gltB31*), MX730 (PA340/pRSP20 *gltB*⁺/*gltB31*), and MX743 (PA340 *gltB*⁺ transductant). Experimental procedures were as described in the text. Glutamate synthase antigen was quantitated by using a standard curve of protein concentration versus the area of the rocket as a reference. Slots a, b, c, and d contained extracts from wild-type strain CS520 (4, 3, 2, and 1 μ g of total protein, respectively); slots e, f, g, and h contained extracts from MX730 (4, 3, 2, and 1 μ g of total protein, respectively); slots i, j, k, and l contained extracts of PA340 (5, 10, 20, and 30 μ g of total protein, respectively); and slots m, n, o, p, q, and r contained glutamate synthase purified from CS520 (6, 5, 4, 3, 2, and 1 μ g of total protein, respectively). Results similar to those obtained for CS520 extracts were obtained for MX743 (*gltB*⁺ *gdh-1*) extracts (data not shown).

showed elevated levels of enzyme activity (Table 2) was in agreement with the high level ($\approx 250\%$) of enzyme antigen found in the extracts of this strain (Fig. 5). The higher glutamate synthase specific activity observed in MX730 compared with the specific activities in wild-type strains CS520 and MX743 can be explained partially by the high number of copies of ColE1 hybrid plasmids probably present per cell (6), although this will have to await confirmation. However, if pRSP20 is present at the same copy number as ColE1 (15 to 30 copies per cell), this will imply that enzyme levels are not proportional to gene dosage.

Finally, we should mention that the *gltB31* mutation has been found to cotransduce with both *argG* and *glnF* genes. Unfortunately, plasmid pRSP20 did not complement either *argG* or *glnF* mutations (data not shown). However, this plasmid could be used as a hybridizing probe to isolate bacterial chromosomal regions carrying these genes.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Rafael Palacios for technical advice, Sidney Kustu for valuable criticism of the manuscript, and Fernando Bastarrachea for help in the preparation of the manuscript. We are also grateful to Rosa Maria Cuevas for typing the manuscript.

This work was supported by grant FCCBNAL-790197 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

LITERATURE CITED

- Berberich, M. A. 1972. A glutamate-dependent phenotype in *E. coli* K-12; the result of two mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47:1498-1503.
- Bolívar, F., R. L. Rodríguez, M. C. Betlach, and H. W. Boyer. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene* 2:75-93.
- Covarrubias, A. A., R. Sanchez-Peñador, A. Osorio, F. Bolívar, and F. Bastarrachea. 1980. ColE1 plasmids containing *Escherichia coli* genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine. *Plasmid* 3: 150-164.
- Gaillardin, C. M., and B. Magasanik. 1978. Involvement of the product of the *glnF* gene in the autogenous regulation of glutamine synthetase formation in *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* 133:1329-1336.
- Greene, P. J., H. L. Heyneker, F. Bolívar, R. L. Rodríguez, M. C. Betlach, A. A. Covarrubias, K. Bachman, D. J. Russell, R. Tait, and H. W. Boyer. 1978. A general method for purification of restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 6:2373-2380.
- Hershfield, V., H. W. Boyer, C. Yanofsky, M. A. Lovett, and D. R. Helinski. 1974. Plasmid ColE1 as a molecular cloning vehicle for cloning and amplification of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71:3455-3459.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680-685.
- Mantsala, P., and H. Zalkin. 1976. Glutamate synthase: properties of the glutamine-dependent activity. *J. Biol. Chem.* 251:3294-3299.
- Mantsala, P., and H. Zalkin. 1976. Properties of the apoglutamate synthase and comparison with glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 251:3300-3305.
- Meagher, R. B., R. C. Tait, M. Betlach, and H. W. Boyer. 1977. Protein expression in *E. coli* minicells by

- recombinant plasmids. *Cell* 10:521-536.
11. Meers, J. L., D. W. Tempest, and C. M. Brown. 1970. Glutamine (amide) 2-oxoglutarate amino transferase oxido-reductase (NADP): an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 64:187-192.
 12. Miller, E. R., and E. R. Studman. 1972. Glutamate synthase from *Escherichia coli*: an iron sulfide flavo-protein. *J. Biol. Chem.* 247:7409-7419.
 13. Miller, J. 1972. Experiments in molecular genetics, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 14. O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021.
 15. Pahl, G., A. D. Zelenetz, and B. M. Tyler. 1978. *gluB* gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 133:129-146.
 16. Palacios, R., M. Campomanes, and C. Quinto. 1977. *Neurospora crassa* glutamine synthetase. *J. Biol. Chem.* 252:3028-3034.
 17. Reiner, A. M. 1969. Isolation and mapping of polynucleotide phosphorylase mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 97:1431-1436.
 18. Sakamoto, N., A. M. Kotre, and M. A. Savegeou. 1975. Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties. *J. Bacteriol.* 124:775-783.
 19. Tyler, B. 1978. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Annu. Rev. Biochem.* 47:1127-1162.
 20. Werke, B. 1973. Rocket immunoelectrophoresis, p. 37-46. In N. N. Aelsten, J. Krolland, and B. Werke (ed.), *A manual of quantitative immunoelectrophoresis*. Universitetsforlaget, Oslo.

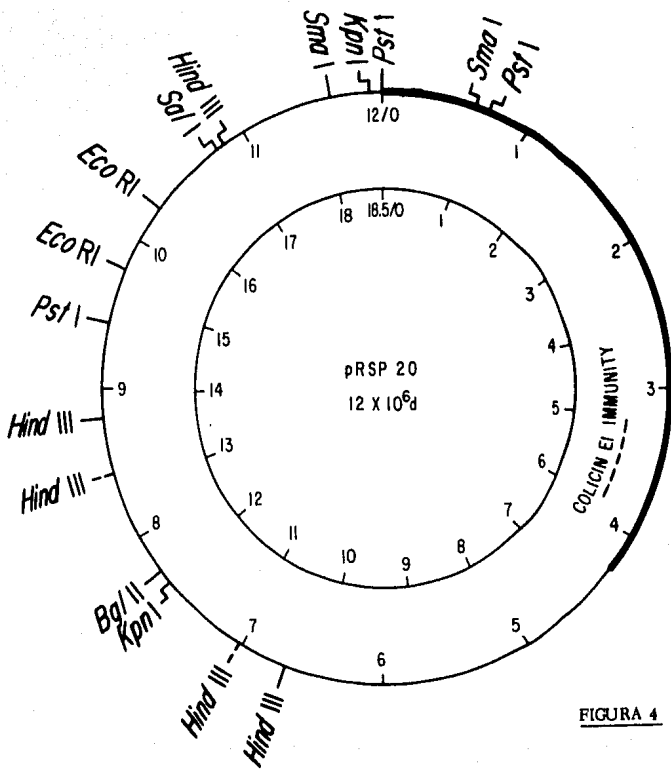
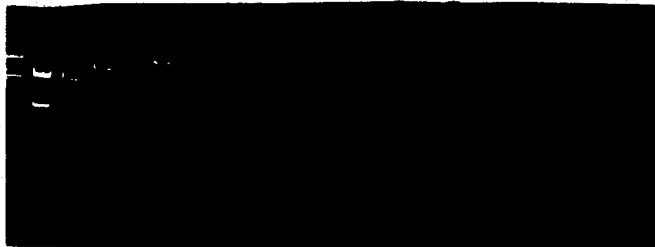


FIGURA 4

AE PM2 HSm H HB E BE B P PE PB PS EB ES K KE KB KP KS AE



ferentes de plásmidos de acuerdo al patrón de restricción realizado con varias endonucleasas .

El plásmido pGOP 1 se compone del pBR 328 insertado entre los sitios de Eco R1 del pRSP 20 ; en este plásmido se ha perdido el fragmento de DNA cromosomal de aproximadamente 0.5 Md comprendido entre los sitios de Eco R1 presentes en el pRSP 20 . El segundo plásmido encontrado corresponde a la subclonación del fragmento de 0.5 Md antes mencionado , en el sitio de Eco R1 del pBR 328 ; a este plásmido híbrido se le ha denominado pCOL 5 (Figura 5) .

En el pRSP 20 se encuentran tres sitios para la enzima Pst 1 lo que presenta una buena opción para obtener fragmentos de DNA cromosomal . Con este propósito se trataron los plásmidos pRSP 20 y pBR 327 (19) con la enzima Pst 1 , los fragmentos generados se mezclaron , se ligaron y se utilizó la mezcla de ligasa para transformar la cepa P678-54. Se seleccionó en medios de Luria agar con tetraciclina y se obtuvieron clonas Ap^s , Tc^r . Al purificar plásmido de estas clonas se encontró un tipo de plásmido (pGOP 3) , formado por el fragmento de 8.6 Md del pRSP 20 que contiene la región de inmunidad a colicina E1 y el pBR 327 .

Otra estrategia utilizada fué la subclonación del fragmento de DNA cromosomal comprendido entre los sitios de las enzimas Bgl II y Sal I (3.1 Md) del pRSP 20 entre los sitios de Bam HI y Sal I del pBR 327:

CONSTRUCCION DE PLASMIDOS DERIVADOS DEL pRSP 20

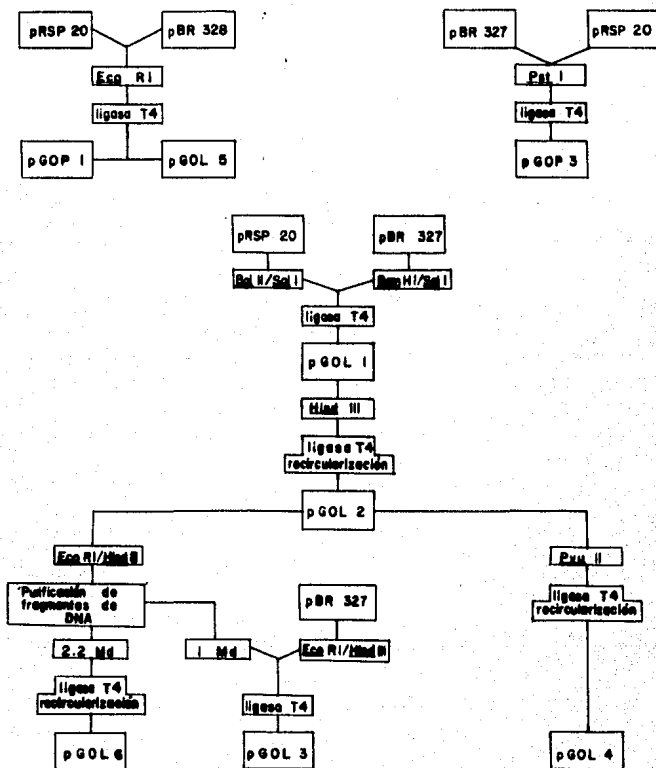


FIGURA 5

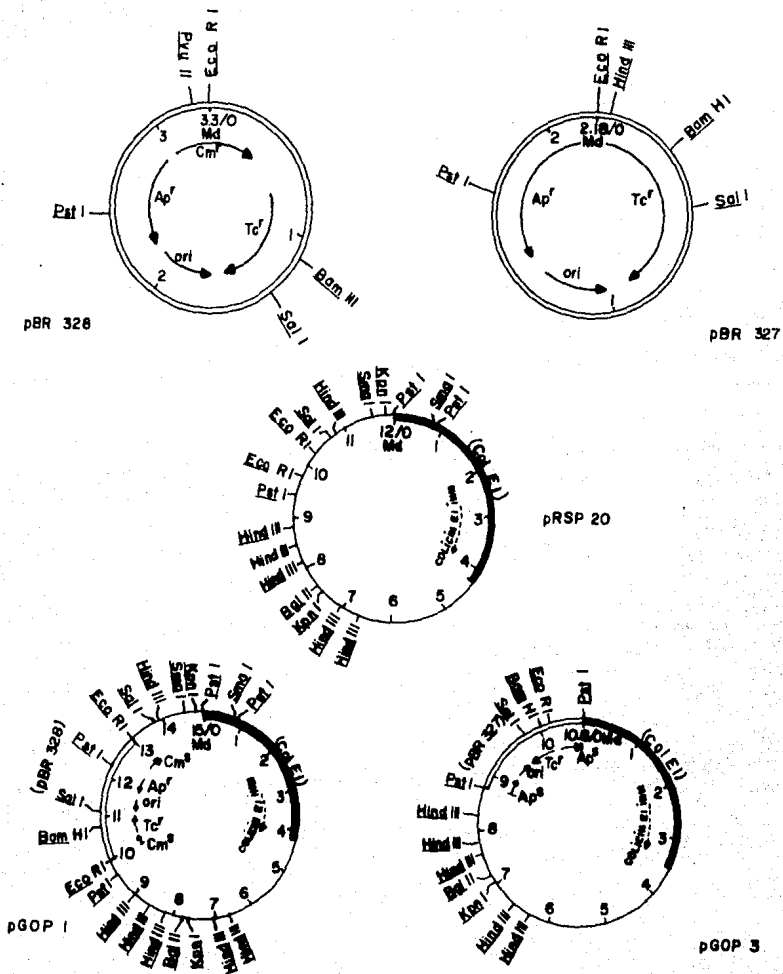


FIGURA 5

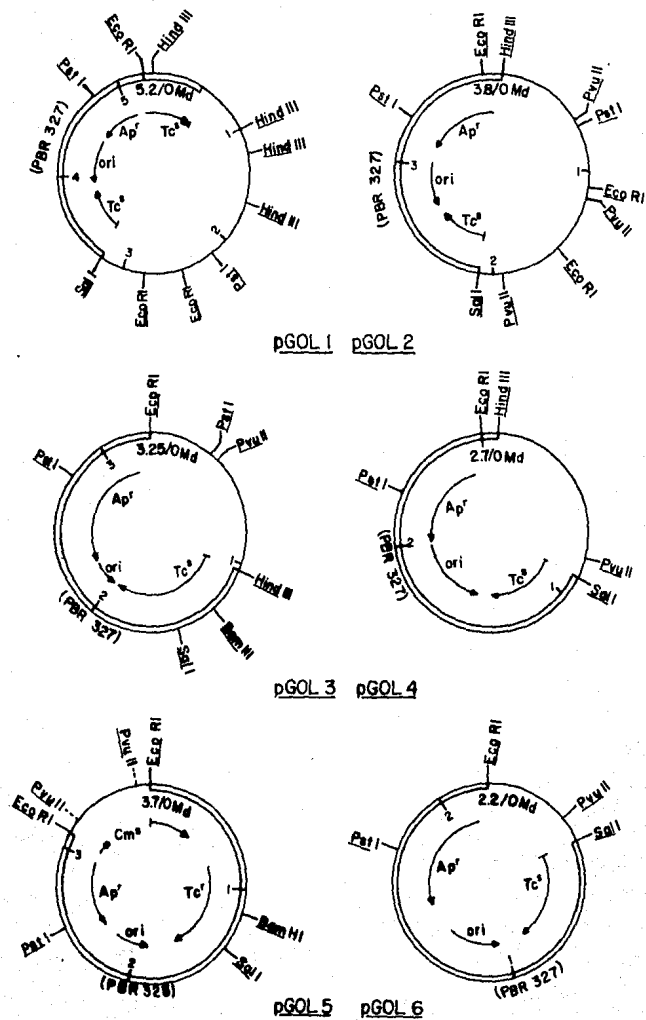


FIGURA 5

esto es posible ya que Bgl II y Bam III generan extremos cohesivos idénticos que pueden ligarse aunque no se regeneran ninguno de los dos sitios originales. De la misma forma descrita anteriormente, se trataron ambos plásmidos, pRSP 20 y pBR 327, con las enzimas correspondientes, se ligaron los fragmentos y se transformó a la cepa productora de minicélulas seleccionando ahora a las clonas que fueran Ap^r, Tc^s. El plásmido que se encontró en estas clonas denominado como pGOL 1, contiene insertado el fragmento de 3.1 Md de DNA cromosomal del pRSP 20 entre los sitios de Bam HI y Sal I del pBR 327. Como se observa en la Figura 5: el plásmido pGOL 1 posee cuatro sitios de la enzima Hind III. Por lo tanto, al digerir el pGOL 1 con esta enzima y resuspender el DNA digerido en un volumen adecuado se obtienen plásmidos provenientes de la recircularización del fragmento del pGOL 1 que contiene el origen de replicación del vehículo y 2.0 Md de DNA cromosomal. De esta forma se obtuvo el pGOL 2, después de transformar y seleccionar en Luria agar con ampicilina.

A partir del pGOL 2 se han construido otros tres plásmidos de la siguiente manera. Se realizó una doble digestión del pGOL 2 con las enzimas Eco RI y Hind III, los fragmentos generados se separaron en un gel de agarosa al 1% en electroforesis, se tiñó el gel con Bromuro de etidio, se cortaron las bandas superior e intermedia (2.2 Md y 1.0 Md respectivamente) y se purificaron los fragmentos de DNA. El fragmento mayor (2.2 Md), que contiene el DNA del vehículo y parte del DNA cromosomal, se recircularizó y transformó en la cepa productora de minicélulas. Al purificar plásmido de las transformantes se encontró un plásmido que -

tenía un sitio único de Eco R1 : este plásmido se denominó pGOL 6. El fragmento intermedio (1.0 Md) constituido únicamente por DNA cromosomal, se clonó entre los sitios de Hind III y Eco R1 del pBR 327; este plásmido se denominó pGOL 3.

En el pGOL 2 se encontraron tres sitios de la enzima Pvu II (Figura 5): al digerir el plásmido con esta enzima , ligar los fragmentos generados y transformar se encontró el pGOL 4 que es la recircularización del fragmento de 2.7 Md aproximadamente del pGOL 2 al que se le han eliminado los fragmentos de DNA cromosomal que contiene los sitios de Eco R1 y el sitio de Pst 1. De esta forma, el pGOL 4 contiene ahora un sitio único para las enzimas Pvu II, Eco R1, Hind III y Pst 1. En la Figura 5 se esquematizan las diversas estrategias utilizadas y los plásmidos obtenidos según se describió anteriormente.

B) Pruebas de complementación.

Como se ha mencionado la cepa PA 340 (gdh-1, glt B31) es auxótrofa para glutamato. Se sabe que al transformar esta cepa con el plásmido pRSP 20 se complementa esta auxotrofia quedando ahora glt⁺ (16). Esta cepa se transformó con los siguientes plásmidos derivados del pRSP 20 : pGOP 1, pGOP 3, pGOL 1, pGOL 2 y pBR 327 como control; en ninguno de estos casos se observó complementación . Al medir la actividad enzimática de GOGAT (16) en los extractos crudos de estas cepas, solo se encuentra en la cepa PA 340/pRSP 20; en los demás casos no se detectó actividad.

C) Proteínas codificadas por los plásmidos derivados del pRSP 20.

Para determinar las proteínas que codifican los plásmidos derivados, se utilizó el sistema de minicélulas conteniendo los diversos plásmidos permitiendo la incorporación de S^{35} -metionina según se ha descrito anteriormente (16).

En la Figura 6 se presenta la autorradiografía del gel de poliacrilamida-SDS conteniendo los extractos de estas minicélulas con los plásmidos pGOP 1 (carril B) y pGOP 3 (carril C): estos dos plásmidos codifican para un polipéptido que comigra con la subunidad pesada de GOGAT (135,000 d). El carril D corresponde a minicélulas con el pRSP 20, donde se observan las dos subunidades de la enzima. En el carril B, que tiene el extracto del pGOP 1 se observa además un polipéptido de 39,000 d que no aparece en el pRSP 20. Posteriormente se discute la posibilidad de que este polipéptido sea un híbrido entre la subunidad ligera de la GOGAT y la transacetilasa de cloramfenicol del pBR 328.

Los carriles E, F y G corresponden a los extractos de minicélulas con los plásmidos pGOL 2, pGOL 3 y pBR 328 respectivamente y puede observarse que solamente el pGOL 2 presenta un polipéptido que comigra con la subunidad ligera de GOGAT (53,000 d). En el extracto con el pGOL 3 se observa un polipéptido de aproximadamente 26,000 d que no aparece en el pBR 328, aparentemente esta proteína corresponde a la parte amino-terminal de la subunidad ligera de GOGAT.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

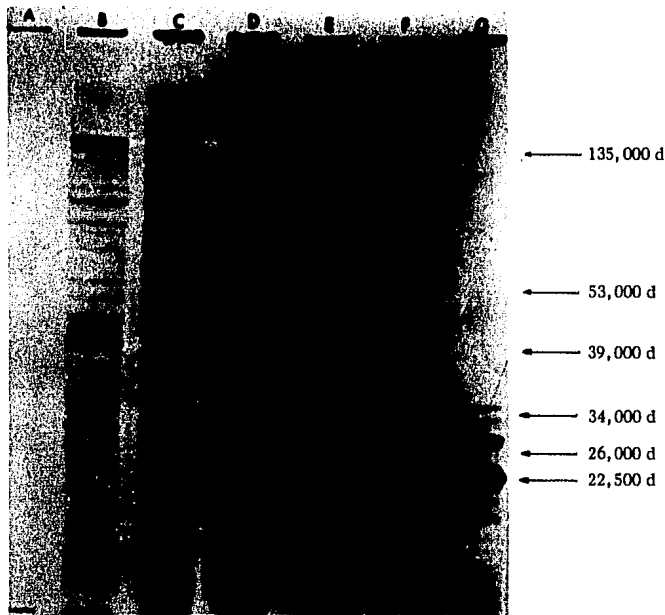


FIGURA 6

Autorradiografía de un gel de acrilamida conteniendo los extractos de minicélulas con los siguientes plásmidos:

- A) Sin plásmido.
- B) pGOP 1
- C) pGOP 3
- D) pRSP 20
- E) pGOL 2
- F) pGOL 3
- G) pBR 328

El plásmido pGOL 1 presenta el mismo patrón de proteínas que el pGOL 2 y los plásmidos pGOL 4, pGOL 5 y pGOL 6 presentan únicamente los polipéptidos que corresponden al vehículo pBR 327 (datos no mostrados).

D) Dirección de transcripción del gene que codifica para la subunidad ligera de GOGAT.

El patrón de polipéptidos que presentan estos plásmidos sugiere la dirección de transcripción de la subunidad ligera de la siguiente forma.

Al interrumpir la secuencia de DNA cromosomal entre los sitios reconocidos por la enzima Eco R1 del pRSP 20 (plásmido pGOP 1), por inserción del pBR 328, se observa la desaparición de la subunidad ligera y la aparición de un polipéptido de 39,000 d el cual podría tratarse de un polipéptido híbrido formado por la porción amino-terminal de la subunidad ligera y la porción carboxi-terminal de la transacetilasa de cloramfenicol del pBR 328. Esta suposición se basa en el hecho de que la cantidad de DNA comprendida entre el sitio de Eco R1 y la región de terminación del gene de Cm^R del pBR 328 consta de 440 pb aproximadamente lo que significa que esta información puede codificar para un polipéptido de aproximadamente 16,000 d. En el pGOP 1 la dirección de la transcripción del gene de Cm^R está en el sentido de las manecillas del reloj, por lo tanto, si existe algún promotor de origen cromosomal colocado en la misma orientación

del gene de Cm^R y localizado en algún sitio del DNA cromosomal anterior al sitio de Eco R1, la transcripción podría iniciarse a partir de ese promotor y quedar en fase con la fracción del gene de Cm^R del pBR 328 terminando en el sitio correspondiente de este gene.

Al sustraer los 16,000 d (polipéptido de Cm^R) de los 39,000 d del polipéptido presente en pGOP 1 quedan 23,000 d de polipéptido que podrían corresponder a la parte amino-terminal de la subunidad ligera de GOGAT. Esto coincide con el hecho de que en el pGOL 3 se observa un polipéptido de aproximadamente 26,000 d el cual podría iniciar su transcripción a partir de este promotor cromosomal que deberá estar localizado a 600 pb aproximadamente del sitio de Eco R1 cercano a Pst I y Pvu II en el DNA cromosomal (0.3-0.0 Md). La traducción terminaría al inicio del gene de Ap^R en el pBR 327 ya que en esta región de DNA se encuentran codones de terminación en las tres fases. Actualmente se están realizando experimentos para confirmar la presencia del promotor de la subunidad ligera de GOGAT en la región de DNA cromosomal antes descrita.

DISCUSION.

Los resultados iniciales indican que el plásmido pRSP 20 -- lleva un fragmento de DNA cromosomal en donde se localizan los genes -- que codifican para las dos subunidades de la GOGAT. Esto se demostró -- utilizando una serie de pruebas bioquímicas (electroforesis uni- y bidimen -- sional, inmunoprecipitación específica e inmunoelectroforesis cuantitativa) y pruebas de complementación genética (16) .

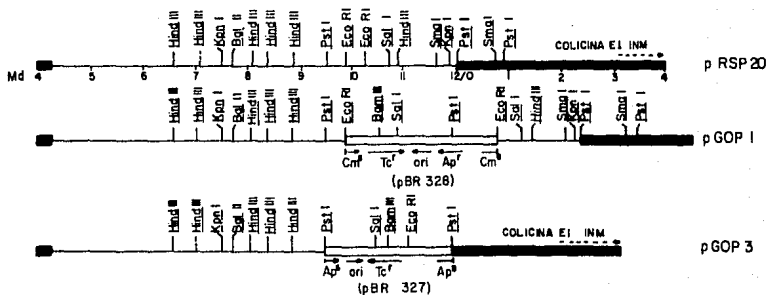
Los resultados finales presentados sugieren fuertemente que se tienen clonados los genes que codifican para las dos subunidades de GOGAT de manera independiente. Esto implica la posibilidad de que cada uno de -- estos genes tenga una región de DNA propia que regula la expresión del -- gene estructural. Tomando en cuenta los pesos moleculares de la subuni -- dad pesada (135,000 d) y de la subunidad ligera (53,000 d) de GOGAT, -- parece difícil que los polipéptidos producidos por los plásmidos derivados y que comigran con estas subunidades , sean péptidos diferentes de ellas. Sin embargo, se está tratando actualmente de confirmar la identidad de -- los péptidos codificados por esta colección de plásmidos derivados del -- pRSP 20.

Es importante resaltar que resulta poco probable que la -- expresión de los genes que codifican para las dos subunidades esté contro -- lada a partir de promotores propios de los vehículos. En el caso del plás -- mido pGOP 1 , la probabilidad de que algún promotor presente en el pBR -- 328 se encuentre localizado en una posición adecuada para permitir la ex--

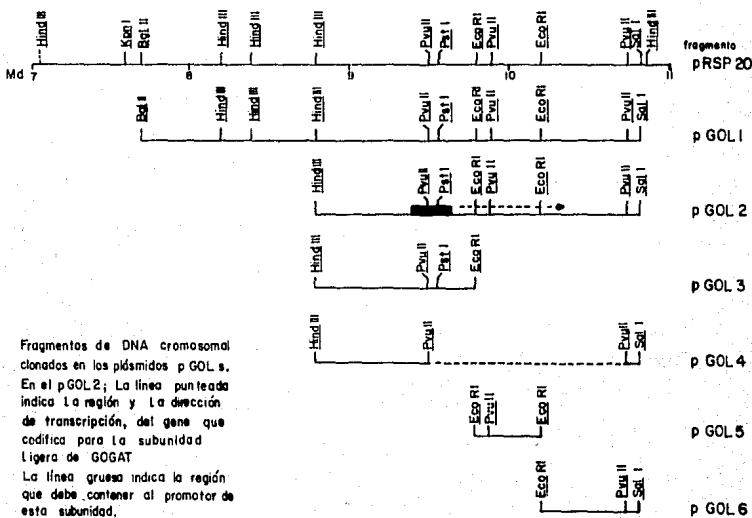
presión de un péptido del mismo peso molecular que el de la subunidad pesada de GOGAT resulta baja. Además en el caso del pGOP 3, el vehículo utilizado (pBR 327), debería contener un promotor dentro de la región de DNA correspondiente al gene estructural de la β -lactamasa (cerca del sitio de la enzima Pst 1): sin embargo no se ha reportado algo semejante -- hasta el momento (20).

Para el polipéptido codificado por los plásmidos pGOL 1 y pGOL 2 que comigra con la subunidad ligera de GOGAT, también es poco probable que la expresión provenga de promotores presentes en el vehículo pBR 327. El único promotor que tendría esa opción es el que corresponde al gene de resistencia a tetraciclina. Sin embargo, al construir el pGOL 2 esta posibilidad queda descartada ya que al clonar en el sitio de Hind III se inactiva este promotor y aún así, ambos plásmidos, pGOL 1 y pGOL 2, siguen codificando para un polipéptido del mismo peso molecular. En el pGOL 3 se clonó en los sitios Eco R1 y Hind III del pBR 327 y, como en el pGOL 2, no existe ahora un promotor funcional del gene de resistencia a tetraciclina. Así la posibilidad más viable es que los polipéptidos codificados por los plásmidos pGOL 1 y pGOL 2 de 53,000 d y pGOL 3 de 26,000 d de PM, sean expresados a partir de un promotor localizado en el fragmento de DNA cromosomal que llevan clonado.

Según los datos que se han presentado aquí, este promotor debería estar localizado aproximadamente a 600 pb (Figura 7) del sitio de Eco R1 en el pGOL 3 y cercano a los sitios de reconocimiento de las enzi



PLASMIDOS DERIVADOS DEL pRSP 20 QUE CODIFICAN PARA LA SUBUNIDAD PESADA DE GOGAT.



Fragmentos de DNA cromosomal clonados en los plásmidos pGOL s. En el pGOL 2; La línea punteada indica la región y la dirección de transcripción, del gene que codifica para la subunidad ligera de GOGAT. La línea gruesa indica la región que debe contener al promotor de esta subunidad.

FIGURA 7

mas Pst I y Pvu II del DNA cromosomal. Actualmente se están realizando experimentos para definir si este promotor corresponde a la subunidad ligera de GOGAT como parecen sugerirlo los resultados aquí presentados .

En la Figura 7 se indica la probable localización de este promotor y la dirección de transcripción así como el tamaño del DNA necesario para contener el gene de la subunidad ligera.

Con respecto al péptido que comigra con la subunidad pesada de GOGAT podemos decir hasta el momento que debe estar codificado por aproximadamente 3,600pb y que este fragmento de DNA se encuentra entre la región de Inmunidad a colicina del vehículo Col E1 y el sitio de Pst I localizado a 9,4 Md del pRSP 20 sin que pueda establecerse aún la posición o la dirección de transcripción del gene correspondiente, se continúa sobre esta línea de investigación.

Es interesante también el hecho de que los plásmidos derivados del pRSP 20 no complementan la mutación glr B31 de la cepa PA 340. Se ha propuesto que esta mutación es puntual por la frecuencia de reverción que presenta (12) entonces, la hipótesis de que esta mutación estuviera en un gene activador de las dos subunidades de GOGAT , no concuerda con nuestros resultados ya que si este supuesto gene activador estuviera presente en el plásmido pRSP 20 , implicaría que al construir los plásmidos derivados, alguno o algunos de ellos deberían contener este gene activador y podría entonces producirse la enzima a partir de los genes en

el cromosoma , pero como no se encontró complementación, las alternativas quedan abiertas y es necesario formular otra teoría que corresponda a los datos conocidos.

Una posibilidad interesante sería la presencia de una misma región que funcione como promotor para los genes de las dos subunidades y que la transcripción a partir de esta región sea divergente de tal manera que una mutación en este sitio afecte la expresión de las dos subunidades de la enzima . Para el caso de los plásmidos pGOP 1 y pGOP 3 , la transcripción correspondiente a la subunidad pesada quedaría completa dando así el polipéptido correspondiente : la dirección en este caso sería partiendo del sitio de Pst I a 9.5 Md del plásmido pRSP 20 hacia el sitio de Bgl II a 7.7 Md.

Para los plásmidos pGOL 1 y pGOL 2 , la transcripción del gene de la subunidad pesada quedaría truncada y esto podría generar un polipéptido pequeño que posteriormente fuera degradado por la célula ya que no se observa ningún polipéptido adicional en la autorradiografía de los geles que contienen los extractos de las minicélulas transformadas con estos plásmidos.

BIBLIOGRAFIA

1. Lehninger, A.L., *Biochemistry*, 2nd ed., (1975), Worth Publ. Inc., New York, USA.
2. Tyler, B., (1978), Regulation of the assimilation of nitrogen compounds., *Ann. Rev. Biochem.*, 47: 1127-62.
3. Tempest, D.W., Meers, J.L. and Brown, C.M., (1973), "The Enzymes of Glutamine Metabolism", Prusiner, S. and Stadtman, E.R. eds., pp. 167-82, Academic Press, New York.
4. Nagatani, H., Shimizu, M. and Valentine, R.C., (1971), The mechanism of ammonia assimilation in nitrogen fixing bacteria., *Arch. Mikrobiol.*, 79: 164-75.
5. Miller, R.E., (1973), "The Enzymes of Glutamine Metabolism", Prusiner, S. and Stadtman, E.R. eds., pp. 183-205, Academic Press, New York.
6. Mäntsälä, P., and Zalkin, H., (1976), Active Subunits of Escherichia coli Glutamate Synthase., *J. Bacteriol.*, 126: 539-41.

7. Geary, L.E. and Meister, A., (1977), On the mechanism of glutamine-dependent reductive amination of α -ketoglutarate catalyzed by Glutamate Synthase, *J. Biol. Chem.*, 252: 3501-08.
8. Meers, J.L., Tempest, D.W. and Brown, C.M., (1970), "Glutamine (amide): 2-oxoglutarate amino transferase" synthesis of glutamate by some bacteria., *J. Gen. Microbiol.*, 64: 187-94.
9. Brenchley, J.E., Prival, M.J. and Magasanik, B., (1973), Regulation of the synthesis of the enzymes responsible for glutamate formation in Klebsiella aerogenes., 248: 6122-28.
10. Brenchley, J.E., Baker, C.A. and Patil, L.G., (1975), Regulation of the ammonia assimilatory enzymes in Salmonella typhimurium., *J. Bacteriol.*, 124: 182-89.
11. La Pointe, J., Delcuve, G. and Duplain, L., (1975), Derepressed levels of Glutamate Synthase and Glutamine Synthetase in Escherichia coli mutants altered in Glutamil-transfer ribonucleic acid Synthetase., *J. Bacteriol.*, 123: 843-50.
12. Pahel, G., Zelenetz, A. and Tyler, B., (1978), glt B gene and regulation of nitrogen metabolism by Glutamine Synthetase in Escherichia coli., *J. Bacteriol.*, 133: 139-48.

13. Covarrubias, A., Sánchez-Pescador, R., Osorio, A., Bolívar, F. and Bastarrachea, F., (1980), Col E1 hybrid plasmids containing -- Escherichia coli genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine., *Plasmid*, 3: 150-64.
14. Clarke, L. and Carbon, J., (1975), Biochemical construction and selection of hybrid plasmids containing specific segments of the Escherichia coli genome., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 72: 4361-65.
15. Covarrubias, A., Sánchez-Pescador, R., Lozoya, E., Bastarrachea, F. and Bolívar, F., (1980), "Glutamine: Metabolism, Enzymology - and Regulation"., Mora, J. and Palacios, R. eds., pp. 123-37, Academic Press, New York.
16. Lozoya, E., Sánchez-Pescador, R., Covarrubias, A., Vichido, I. and Bolívar, F., (1980), Tight linkage of genes that encode the two Glutamate Synthase subunits of Escherichia coli K-12., *J. Bacteriol.*, 144: 616-21.
17. Hummelt, G. and Mora, J., (1980), NADH-Dependant Glutamate Synthase and nitrogen metabolism in Neurospora crassa., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92: 127-33.

18. Mifflin, B.J., Lea, P.J. and Wallsgrave, R.M., (1980), "Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation", Mora, J. and Palacios, R. eds., pp. 213-34, Academic Press, New York.
19. Soberón, X., Covarrubias, L. and Bolívar, F., (1980), Construction and characterization of new cloning vehicles , IV. Deletion derivatives of pBR 322 and pBR 325., *Gene.*, 9: 287-305.
20. Stüber, D. and Bujard, H., (1981), Organization of transcriptional - signal in plasmids pBR 322 and pACYC 184., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78: 167-71.