

03062  
20/12

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Postgrado  
del CCH

Centro de Investigación Sobre Ingeniería Genética  
y Biotecnología  
Cuernavaca, Morelos

ESTUDIO Y CARACTERIZACION DE LA REGION FLANQUEADORA 5' DEL GENE  
QUE CODIFICA PARA LA ENZIMA GLUTAMATO DESHIDROGENASA EN  
Escherichia coli K-12

T E S I S

Que para obtener el titulo de:

MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

presenta

LAURA ESTELA RIBA RAMIREZ

1988

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis 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

NOTA ACLARATORIA .....	1
INTRODUCCION .....	2
MATERIALES Y METODOS .....	10
RESULTADOS .....	12
Summary .....	13
Introduction .....	14
Materials and Methods .....	17
Results and Discussion .....	23
Acknowledgements .....	36
Figures .....	38
Figure Legends .....	42
References .....	47
Tables .....	51
RESULTADOS ADICIONALES Y DISCUSION .....	58
PERSPECTIVAS .....	79
BIBLIOGRAFIA ADICIONAL .....	81

**NOTA ACLARATORIA:**

La mayor parte del trabajo realizado en este proyecto de tesis se estructuró en un escrito que fué enviado para su publicación a la revista Journal of Bacteriology. Dicho escrito está incluido en la presente tesis como la sección de Resultados. Es importante mencionar que parte del trabajo realizado para el escrito [Sección C (i y ii) de la parte de Resultados y Discusión] fué llevado a cabo por el M. en C. Fernando Valle Baheza y el Dr. Baltazar Becerril Luján.

La sección Resultados Adicionales y Discusión, de la presente tesis comprende datos adicionales del proyecto de tesis no incluidos en el escrito enviado a la mencionada revista, así como una discusión más amplia englobando la totalidad de los resultados.

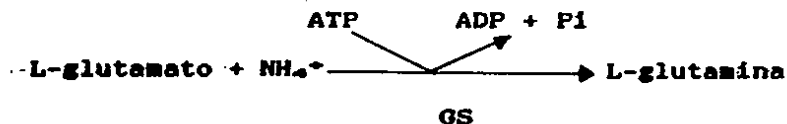
## INTRODUCCION

### Metabolismo Nitrogenado.

El nitrógeno ha sido seleccionado por la naturaleza como uno de los constituyentes esenciales de las moléculas orgánicas involucradas en el metabolismo intermediario de todo organismo. Por ello, es de fundamental importancia que los sistemas biológicos posean los mecanismos adecuados de asimilación y utilización de nitrógeno del medio circundante. En el caso de las enterobacterias, el ión amonio es la fuente de nitrógeno óptima para su crecimiento en un medio mínimo definido con glucosa como fuente de carbono:

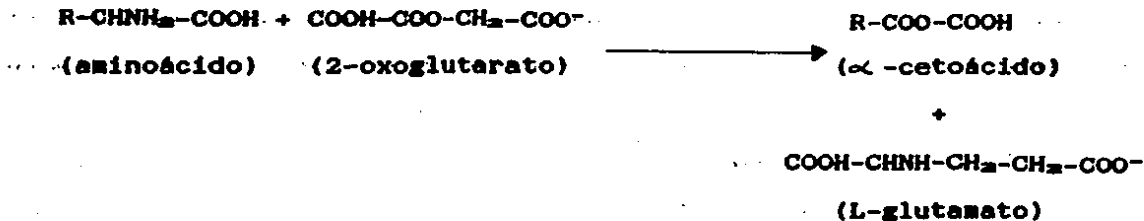
La totalidad del nitrógeno celular para la síntesis de macromoléculas en las bacterias entéricas se deriva del grupo amida de la glutamina, el grupo amino del glutamato, o bien directamente de la incorporación de amonio. El glutamato es el principal donador de grupos amino para la biosíntesis de aminoácidos por transaminación, mientras que el grupo amida de la glutamina es el donador directo de nitrógeno para algunos pasos de la biosíntesis de purinas, pirimidinas, azúcares aminadas, histidina, triptofano, asparagina, NAD y otros compuestos nitrogenados (Tyler, 1978).

La formación de glutamina se realiza mediante una sola vía catalizada por la enzima glutamino sintetasa (GS) (EC 6.3.1.2.). Esta enzima está sujeta a varias formas de regulación de gran complejidad. La reacción que cataliza es la siguiente:

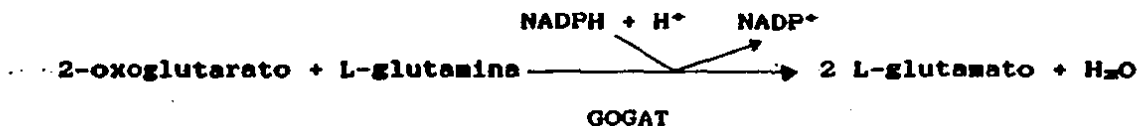


Por otra parte, la biosíntesis de glutamato se lleva a cabo por tres vías esenciales:

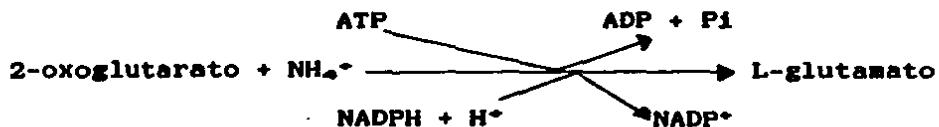
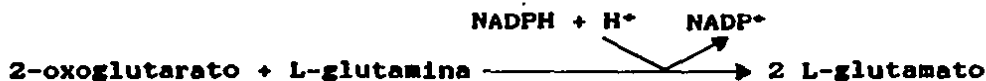
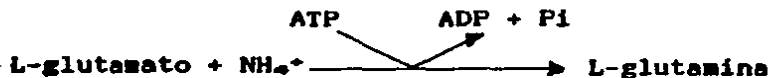
1. A partir de 2-oxoglutarato y los grupos amino de otros aminoácidos por transaminación. La reacción general es:



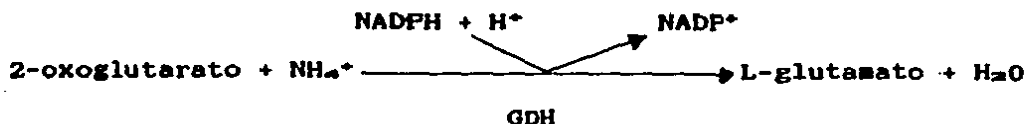
2. A partir de 2-oxoglutarato y L-glutamina. Esta reacción es catalizada por la enzima glutamato sintasa (GOGAT) (EC 1.4.1.3.) acoplada a la reacción ATP-dependiente catalizada por la enzima GS. La reacción catalizada por GOGAT es:



Al acoplar las reacciones catalizadas por la GS y la GOGAT tenemos:



3. A partir de amonio y 2-oxoglutarato, reacción catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) (EC 1.4.1.4.). La reacción que cataliza es la siguiente:



La reacción catalizada por GS es la única ruta conocida para la síntesis de glutamina. Mutaciones en glnA, el gene estructural que codifica para GS, generan una auxotrofia absoluta de glutamina. En el caso de la biosíntesis de glutamato, catalizada por GDH y GOGAT, se requiere de mutaciones simultáneas en los genes que codifican para ambas enzimas para generar una cepa auxótrofa para glutamato, como es el caso de las cepas CB100 y PA340 de Escherichia coli K-12 (Berberich, 1972).

La GDH está constituida por un hexámero con un peso de 290,000 y cada una de sus subunidades tiene un peso de 48,000 (Sakamoto et al., 1975). La importancia de esta enzima reside por una parte en el papel central que ocupa en el metabolismo celular, dado que su actividad está asociada a la interconversión de 2-oxoglutarato y glutamato. Esta interconversión se sitúa como un punto de intersección entre el metabolismo nitrogenado y el metabolismo del carbono. Como se mencionó anteriormente, el



glutamato es el donador primario de grupos amino para la biosíntesis de aminoácidos por transaminación, mientras que el 2-oxoglutarato entra al ciclo de Krebs, generando equivalentes reductores (Prusiner et al., 1972). Por otra parte, la reacción catalizada por GDH constituye un mecanismo de asimilación de nitrógeno eficiente ya que no requiere de energía proporcionada por ATP, mientras que la vía alterna GS-GOGAT comprende dos reacciones, catalizadas por dos enzimas en un mecanismo ATP-dependiente.

En Salmonella typhimurium se ha observado que la actividad específica de GDH es alta y constitutiva en células cultivadas en medios adicionados con exceso o limitación de amonio, aún cuando no se requiera de síntesis de glutamato (Brenchley et al., 1975; Dedinger et al., 1980; Dedinger y Brenchley, 1980; Rosenfeld et al., 1982). Asimismo, se ha demostrado que la actividad de GDH no es esencial mientras GOGAT sea funcional (Dedinger y Brenchley, 1980; Dedinger et al., 1980). Sin embargo, en Klebsiella aerogenes la regulación de esta enzima es diferente. Se ha demostrado una correlación entre los niveles de actividad de GS, y de la GDH y otras enzimas involucradas en el metabolismo nitrogenado (Brenchley et al., 1973; Prival et al., 1973; Streicher et al., 1976; Tyler, B., 1978).

Al cultivar células de K. aerogenes en un medio mínimo conteniendo glucosa y un exceso de amonio, la asimilación de éste y la biosíntesis de glutamato son llevados a cabo a través

de la GDH, y bajo estas condiciones, las actividades de la GS y la GOGAT son bajas (Brenchley et al., 1973; Prival et al., 1973). Si el suministro de amonio es bajo, la actividad de la GDH es baja, y el amonio es entonces incorporado por medio de las actividades acopladas de la GS y la GOGAT.

En Escherichia coli no hay un consenso en cuanto a la regulación de la GDH. Algunos reportes indican que no hay un efecto de regulación por nitrógeno en la actividad específica de la GDH (Streicher et al., 1976; Pahel et al., 1978). Sin embargo, se ha observado una disminución de la actividad de GDH en células cultivadas en medio mínimo con glucosa y amonia adicionado con glutamato (Halpern y Umbarger, 1960; Mecke y Holtzer, 1966; Varrichio, 1969). Por otro lado, hay publicaciones en las cuales se reporta que una limitación de nitrógeno sí afecta los niveles de actividad de la GDH (Senior, 1975; Liang y Houghton, 1981). Por lo tanto, aunque existen rutas similares de asimilación de amonio en diferentes organismos, los patrones de regulación parecen ser específicos para cada caso.

#### Antecedentes.

Existe una aparente diferencia en cuanto a la regulación de la GDH en diferentes enterobacterias. Por otro lado, un análisis crítico de la literatura referente a la regulación de esta enzima

en Escherichia coli, redonda en la escasez y el carácter contradictorio de la información sobre los mecanismos utilizados por la célula para regular la concentración final de la enzima activa. Debido a esto, se consideró justificable y necesario un proyecto de investigación que aportara conocimientos sobre estos mecanismos de regulación, sobre todo tomando en cuenta el papel central que juega esta enzima en el metabolismo celular, y la importancia que que ha adquirido últimamente en el campo de la biotecnología (Windass et al., 1980). La estrategia que inicialmente se formuló en nuestro laboratorio para desarrollar este proyecto de investigación fué la siguiente:

- I. Clonación del gene estructural gdhA, que codifica para la enzima GDH de Escherichia coli, y de las regiones que le flanquean.
- II. Determinación de la dirección de transcripción del gene, en el fragmento clonado.
- III. Secuenciación nucleotídica del gene gdhA y las regiones flanqueadoras 5' y 3'.
- IV. Identificación y caracterización de la o las regiones involucradas en la regulación de la expresión del gene gdhA.
- V. Regulación de la expresión de la enzima GDH por fuente

de nitrógeno y carbono.

Los tres primeros puntos han sido reportados en la literatura por nuestro laboratorio (Covarrubias et al., 1980; Sánchez-Pescador et al., 1982; Sanvicente et al., 1982; Valle et al., 1983, 1984). El cuarto punto fué tratado parcialmente por Valle, 1984.

El presente trabajo tuvo como objetivos: (a) la identificación y caracterización de la o las secuencias de DNA en la región flanqueadora 5' del gene involucradas en la regulación de la expresión del gene gdhA, y (b) la regulación de la expresión de la enzima GDH por fuente de nitrógeno, y de manera preliminar, por fuente de carbono.

## MATERIALES Y METODOS

El material utilizado en este trabajo se describe en la escrito que se anexa en la sección de Resultados. Las cepas de Escherichia coli K-12 que no se reportan en la Tabla 1 del mencionado escrito, se describen en la Tabla 1A. Los métodos que se enlistan a continuación también se describen en dicho escrito:

- Determinación de actividades específicas de las enzimas GDH y GS
- Purificación de RNA total
- Extensión de primero
- Mapeo por nucleasa S1
- Hibridizaciones tipo Northern
- Subclonación de la región flanqueadora 5' del gene gdhA
- Determinaciones de resistencia a tetraciclina
- Deleciones por nucleasa Bal31
- Análisis de secuencias nucleotídicas por computadora

Tabla 1A. Cepas de Escherichia coli K-12 adicionales a las utilizadas en la sección de Resultados.

CEPA	GENOTIPO	OBSERVACIONES
PA340	F <sup>-</sup> <u>recA<sup>-</sup></u> <u>thr-1</u> <u>leu-6</u> <u>thi-1</u> <u>lacY1</u> <u>mb1A1</u> $\lambda^+$ <u>xy1-2</u> <u>ara-13</u> <u>mt1-2</u> <u>tonA2</u> <u>gal-6</u> <u>his-1</u> <u>argH1</u> <u>str-2</u> $\lambda^-$ <u>gltB31</u> <u>gdh-1</u> <u>supE44</u>	B. Bachmann
MX848	$\Delta$ ( <u>pro-lac</u> ) <u>galE</u> <u>glnF73</u> :: Tn5 <u>ilv-680</u> <u>thi-1</u>	F. Bastarrachea
MX902	$\Delta$ ( <u>pro-lac</u> ) <u>galE</u> <u>ilv-680</u> <u>thi-1</u> <u>glnG74</u> :: Tn5	"
MX1178	$\Delta$ ( <u>pro-lac</u> ) <u>galE</u> <u>ilv-680</u> <u>thi-1</u> <u>gltB225</u> :: $\Omega$	"

**RESULTADOS****THE Escherichia coli gdhA GENE IS REGULATED BY NITROGEN AVAILABILITY. IDENTIFICATION OF A FUNCTIONAL PROMOTER AND CHARACTERIZATION OF ITS 5' FLANKING REGION**

Riba, L., Becerril, B., Servin-González, L., Valle, F.  
and Bolivar, F.\*

Departamento de Biología Molecular.  
Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
Apartado Postal 510-3  
Cuernavaca, Morelos  
62270 México  
Tel. 52 (73)17 23 99

Running title: E. coli gdhA gene regulation by nitrogen availability

Key words: characterization of the promoter region\  
identification of a promoter\ site directed mutagenesis\  
mRNA levels

**SUMMARY**

Glutamate dehydrogenase (GDH) catalyzes the synthesis of L-glutamate from 2-oxoglutarate and ammonia. The complete nucleotide sequence of the Escherichia coli gdhA gene as well as its 5' and 3' flanking regions has been previously reported (46, 47). In this paper we present evidence about the regulation of this enzyme by nitrogen availability, using excess or limiting ammonia, as well as a variety of aminoacids as nitrogen sources. In the cases of excess and limiting ammonia as nitrogen sources, this regulation takes place at the transcriptional level. We have identified a single and apparently invariant transcript for several metabolic growth conditions. We also report the identification of a functional promoter and its corresponding transcription start site for several growth conditions. Finally, possible regulatory sequences located at the 5' flanking region of the gdhA gene are discussed.



## INTRODUCTION

Glutamate dehydrogenase (GDH) (E.C. 1.4.1.4.) synthesizes L-glutamate from 2-oxoglutarate and ammonia through the NADPH-dependent reaction:



An alternative glutamate biosynthetic pathway is catalyzed by an ATP-dependent coupled reaction involving glutamate synthase (GOGAT) (E.C. 1.4.1.13.) and glutamine synthetase (GS) (E.C. 6.3.1.2): In enteric bacteria, mutations eliminating both GDH and GOGAT activities are necessary to produce a glutamate auxotrophy such as in Escherichia coli K-12 CB100 and PA340 strains (3).

GDH is widely distributed among prokaryotic and eukaryotic microorganisms (43, 49). This enzyme plays an important role in the cell as it provides one of the few routes for the incorporation of ammonia into organic compounds, and thus, a link between carbohydrate and nitrogen metabolism.

In Salmonella typhimurium, cells grown in either excess or limiting ammonia, exhibit high GDH activities even when there is no need for glutamate synthesis (6, 13, 14, 39). It has also been shown that GDH activity is not essential as long as GOGAT is

functional (13, 14). In Klebsiella aerogenes, however, the regulation of this enzyme appears to be different. It has been reported that GDH specific activity decreases in cells grown in a limiting nitrogen source (2, 7).

In the case of Escherichia coli there seems to be no agreement as to the regulation of this enzyme. Some reports indicate that there is no effect of nitrogen regulation on GDH activity (35, 44). However, a decrease of GDH specific activity has been observed in cells grown in glucose-ammonia medium supplemented with glutamate (19, 31, 48). On the other hand, there are reports in which nitrogen limitation does affect GDH activity (26, 41). Therefore, although similar glutamate biosynthetic routes exist in a number of organisms, the regulation patterns seem to be particular for each case.

The apparent differences in regulatory mechanisms for GDH has lead us to consider that the information on the promoter and regulatory regions of the structural genes coding for GDH in these gram negative microorganisms should be of special interest.

In the present paper, we demonstrate that GDH activity in Escherichia coli K-12 is regulated by the availability and quality of the nitrogen source in the growth medium. We also show that in the case of excess and limiting ammonia as nitrogen

source, this regulation takes place at the transcriptional level, and that there is a single and apparently invariant transcript present in all the metabolic growth conditions tested.

Our group has previously reported the complete nucleotide sequence of the Escherichia coli gdhA structural gene as well as of its 5' and 3' flanking regions. We have also shown that a functional gdhA promoter is located in the first 200 bp preceding the gdhA structural gene, as part of a 360 bp HpaII restriction fragment (46, 47). In this paper, we also report the identification of a functional promoter and its transcription start site for several growth conditions. Finally, we describe possible regulatory sequences located at the 5' region of this gene.

## MATERIALS AND METHODS

Abbreviations: aa: aminoacid(s); Ap<sup>r</sup> and Ap<sup>s</sup>: ampicillin resistance and sensitivity, respectively; b: bases; bp: base pairs; BSA: bovine serum albumin; cAMP: adenosine 3': 5'-cyclic monophosphate; cpm: counts per min; CRP: cAMP receptor protein; gp: gene product; GDH: glutamate dehydrogenase; GOGAT: glutamate synthase; GS: glutamine synthetase; LB: Luria broth; NN: no nitrogen; Tc<sup>r</sup> and Tc<sup>s</sup>: tetracycline resistance and sensitivity, respectively; SDS: sodium-dodecyl-sulfate; SSC: saline sodium citrate; wt: wild type.

a) Bacterial strains and plasmids. Bacterial strains and plasmid constructions used in this work are listed in Table I.

b) Culture media. The NN minimal medium has been previously described (11). Media were supplemented with 15mM or 0.5 mM NH<sub>4</sub>Cl as excess or limiting nitrogen sources respectively. Other nitrogen and carbon sources were added to a final concentration of 0.2% unless otherwise indicated.

c) Glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase specific activity determinations. For glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase assays, cells from exponentially growing cultures were used. Assays were performed according to

Covarrubias et al. (11). GDH specific activity determinations were carried out in a Beckman DU-8 spectrophotometer. Protein determinations for both assays were carried out by the method of Lowry (27) using BSA as a standard. In order to measure the effect of glutamate on the GDH specific activity, varying concentrations of glutamate (pH 7.6) were added directly into the reaction mixtures before adding NADPH. Where indicated, half of the volume of the samples were dialyzed against 5 l of sonication buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.6 and 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol for 12-14 hrs at 4 °C. Standard cellulose dialysis tubing (m.w. cutoff: 12,000-14,000) was used.

d) Enzymes, radiochemicals and oligonucleotides. Some restriction enzymes were purified using the method described by Greene et al. (18). Other enzymes were obtained from New England Biolabs Inc. ( $\gamma$ - $^{32}$ P)dATP and ( $\alpha$ - $^{32}$ P)dCTP were obtained from the Radiochemical Center (Amersham). The nick-translation kit (Cat. NEK 004Z) was purchased from New England Nuclear Inc. The oligonucleotide used as primer in the extension reactions and both BamHI and EcoRI decanucleotide linkers were synthesized by the phosphotriester method in solid phase as described by Hirataka et al. (22).

e) Total RNA purification and primer extension reactions. Total RNA was extracted from exponentially growing cultures as described by León et al. (25). Primer extension reactions were

routinely performed by using 50 ug of total RNA and 1 pmole of the gdhA specific primer. Hybridizations and extension reactions were performed according to León et al. (25).

f) S1 Nuclease mapping. The mapping of the promoter by S1 nuclease was performed as described by Berk and Sharp (4) and Manley et al. (30). The 360 bp HpaII fragment (coordinates -191\169, Fig. 1), carrying the 5' flanking region of the gdhA gene and the region coding for the first 57 aminoacids was used as the probe for the hybridization reaction.

g) Northern blots. Total RNA (60 ug\lane) was fractionated in agarose gels (1.5 %) using  $\text{CH}_3\text{HgOH}$  as denaturing agent, according to Bailey & Davidson (1). RNA was then transferred by electrophoretic blotting onto Zeta-Probe membranes (Bio-Rad Laboratories) according to the manufacturer's instructions, and baked at 80 °C for 2 hrs. Filters were hybridized to the TagI-HpaII fragment (coordinates -71\169, Fig. 1) labeled by nick-translation according to the procedure described by Rigby et al. (38), using  $^{32}\text{P}$ -deoxycytidine-triphosphate.

Prehybridizations were carried out in 50 % formamide, 5X SSC, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 10X Denhardt's solution and 150 ug\ml denaturated calf thymus DNA, for 1 hr at 42 °C. Hybridizations were carried out in the same mixture adding the labeled probe ( $10^6$  cpm\lane), 1 mM EDTA pH 8 and 0.1% SDS for

12-20 hrs at 42 °C. The hybridized filters were then washed as follows: after rinsing the filters twice inside the hybridization bag with 2 vols of 2 X SSC and 0.1 % SDS at room temperature, the filters were taken out and washed once with the same solution for 10 min at room temperature; three times with 80 ml of 0.1 X SSC and 0.1 % SDS for 10 min each at 50 °C; and finally rinsed with 0.1 X SSC at room temperature. The dried filters were then exposed overnight or for longer periods depending on the intensity of the signals.

h) Subcloning of the *gdhA* 5' flanking DNA region. The 5' flanking region of the gene was isolated from plasmid pSAE4 in a 360 bp HpaII fragment (coordinates -191\169, Fig. 1). Half the amount of this fragment was stored and the rest was further digested with TaqI, rendering two fragments: a 120 bp HpaII-TaqI fragment and a 240 bp TaqI-HpaII fragment (coordinates -191\ -71 and -71\169, respectively, Fig. 1). The three fragments were separately cloned in the ClaI site of plasmid vector pBR327. The six resulting plasmids: pH1a, pH1b, pH2a, pH2b, pH3a and pH3b, are presented in Table 1.

i) Tetracycline resistance determinations. The  $Tc^r$  levels for strain HB101 carrying different plasmids were calculated through the minimal inhibitory concentration (MIC) procedure as follows: Assay tubes containing 2 ml of LB were prepared using varying concentrations of the antibiotic (from 0 to 40 ug/ml) prepared from a 2 mg/ml stock solution. Tubes were inoculated

with 20 ul of full grown cells from a culture of the strain to be tested, and incubated (with shaking) for 7 hours at 37 °C. Optical densities of the samples were determined at 420 nm. MIC values were obtained calculating the minimal Tc concentration needed to inhibit 50 % of culture growth compared to the Tc-free culture.

j) Bal31 nuclease deletions. Plasmid pHis was linearized with EcoRI and then treated with Bal31 exonuclease under the following reaction conditions: 10 ug of EcoRI digested pHis plasmid were treated with 2.5 units of Bal31 exonuclease in a final volume of 50 ul of buffer containing 12 mM CaCl<sub>2</sub>, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8 and 1 mM EDTA. The reaction mixture was incubated at 2 °C and aliquots were taken at 2, 4, 6, 8, 10 and 15 min. These samples were phenol extracted and ethanol precipitated. Half of each sample was digested with BamHI and loaded in a 7.5% acrylamide gel to screen the length of deletions. The rest of each sample was treated with 1 unit of S1 nuclease to remove cohesive ends in a final volume of 10 ul of buffer containing 5% glycerol, 250 mM NaCl, 30 mM sodium acetate pH 4.5 and 1mM ZnSO<sub>4</sub>. The reactions were incubated 30 min at 30 °C and the DNA was once more phenol extracted and ethanol precipitated. Finally, the DNA was treated with ligase in the presence of BamHI synthetic linkers in a final volume of 20 ul of buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM dithiothreitol, 1 mM ATP and 50 ug/ml BSA. The products of the ligase reactions were used to transform strain HB101.



k) DNA nucleotide sequence analysis. A computer search for likely promoter sequences was performed using the method described by Mulligan et al. (33). The same method was modified in order to find putative CRP binding sites using the consensus sequence reported by de Crombrughe et al. (12).

## RESULTS AND DISCUSSION

## A) GDH SPECIFIC ACTIVITY DETERMINATIONS

- 1) Glutamate dehydrogenase is regulated by nitrogen availability.

There is a lack of agreement concerning whether the E. coli glutamate dehydrogenase enzyme is regulated or not by nitrogen availability. In order to determine the effect of excess or limiting nitrogen growth conditions in the enzyme specific activity, we measured this activity in the wild type strains strains MX614 and CS520 grown in excess (15 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) and limiting (0.5 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) nitrogen conditions (Table 2). We also determined GDH and GS activities of strain MX614 using a variety of aa as nitrogen sources (Table 3).

The results, shown in Tables 2 and 3, demonstrate that in both E. coli strains, there is a decrease on the GDH specific activity in cells growing in limiting nitrogen conditions. Table 3 shows the effect of various nitrogen sources on the GDH and GS specific activities from strain MX614. Even though these aa are considered as limiting sources (37), there seems to be a gradation in their limiting properties, as can be seen for the GS specific activity values. Aminoacids such as glutamate, aspartate and proline seem to be as poor nitrogen sources

as 0.5mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , to support GDH activity, whereas glutamine, arginine, serine and a combination of aspartate, serine, proline and arginine do not affect GDH specific activity in a significant manner. This could be explained by the way in which different aa can be metabolized to yield ammonia, such as serine; or glutamate, such as proline and aspartate (37). In the case of serine, it can be degraded to ammonia efficiently (24), so that it provides enough of this substrate to maintain a high GDH specific activity. This is supported by the fact that the GS specific activity is low in this growth condition.

ii) Aspartate inhibits GDH specific activity in vivo.

As it is shown in Table 3, glutamate inhibits GDH specific activity. Aspartate and proline, which can yield glutamate, also decrease the enzyme specific activity. However, it is important to notice that the effect of glutamate, as nitrogen source, might be due to its poor ability to enter the cell, whereas the uptake of aspartate and proline are more efficient (45, 17). In order to assess the possible inhibitory effects of these aa in the GDH specific activity, GDH and GS specific activities were determined in glucose NN media supplemented with excess nitrogen in the presence of the different aa. The results, shown in Table 4, indicate that only aspartate and the combination of aspartate, serine, proline and arginine maintain a significant inhibition of GDH specific activity in the excess of ammonia. The specific

activity inhibition by the mixture of aa and by aspartate alone, has already been reported for Salmonella typhimurium (6). The results obtained with serine, proline and arginine, shown in Table 4, strongly suggest that aspartate is the only responsible aa in the inhibition of GDH specific activity. The effect of aspartate in the GDH specific activity may be indirect as it is metabolized yielding glutamate which may be the real responsible of the observed inhibition. If this is the case, we would expect proline (which also gives glutamate) to cause the same effect. However, the utilization of this aa is under nitrogen control (28), so that it would be repressed in excess ammonia growth conditions.

iii) In vitro effect of glutamate on the GDH specific activity.

Thinking in glutamate as a possible inhibitor of the GDH activity, we determined GDH specific activities of strain MX614 grown in excess and limiting nitrogen, and glucose or glycerol as carbon sources. Half of each sample was dialysed in order to eliminate glutamate from the extracts (See Materials and Methods). The results showed that there is no difference between dialysed and non-dialysed extracts for any condition (data not shown). On the other hand, we determined the GDH activity of dialysed extracts of cells grown in the same conditions as above, except that increasing concentrations of glutamate (0, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 1 mM and 20 mM) were added to the

reaction mixture during activity determinations (See Materials and Methods). As mentioned above, there is no variation whatsoever in the measured activities (Results not shown). These results indicate that if glutamate is responsible for GDH inhibition it does not act directly at the protein level.

## B) NORTHERN EXPERIMENTS

In order to demonstrate the presence of gdhA specific transcripts, total RNA was extracted as described (Materials and Methods), from gdhA<sup>+</sup> strains CS520 and MX614, grown in NN media supplemented with excess or limiting nitrogen and glucose or glycerol as carbon sources.

Total RNAs were fractionated by agarose gel electrophoresis under denaturing conditions, and then electrotransferred to Z-Probe filters. The blotted filters were then hybridized to the nick-translated 360 bp HpaII fragment (coordinates -191\+169, Fig. 1) which carries 200 bp from the 5' flanking region of the gdhA gene and the DNA that codes for the first 57 aa residues of the GDH monomer (See Materials and Methods). Results are shown in Fig. 3.

Several facts can be drawn from these results: a) In all conditions, a single and similar transcript of approximately 1,500 b was found in both strains. b) There is a higher concentration of specific mRNA in strain CS520 compared to strain MX614. These results agree with the values obtained for the GDH specific activities in both strains (Table 2). c) There is also a clear difference in the transcript levels between excess and limiting nitrogen in both strains. These results indicate that the regulation of the gdhA gene by nitrogen availability occurs at the transcriptional level. It is interesting to note that even though these results agree with the values obtained for enzyme specific activities presented in Table 2, the observed differences seem to be greater at the mRNA level. This difference might be due to additional regulatory mechanisms. d) Finally, in both strains, there seems to be a slight difference in the transcript levels between glucose and glycerol as carbon sources, at least in the case of excess nitrogen growth condition.

### C) IDENTIFICATION AND MAPPING OF A gdhA FUNCTIONAL PROMOTER

In vivo minicells experiments have shown that the 360 bp HpaII restriction fragment (Coordinates -191\+ 169, Fig. 1), that carries the first 200 bp from the 5' end of the gdhA gene and the DNA that codes for the first 57 aa residues of the GDH monomer,

when cloned in either orientation in pBR327, is capable of directing the synthesis of the expected 57 aa polypeptide (46).

These results strongly suggest that this HpaII fragment carries a gdhA functional promoter.

From the analysis of the 200 bp preceding the gdhA structural gene, we were able to identify 3 putative promoters through consensus sequence comparison analysis. These sequences were referred as P1, P2 and P3 respectively, according to their relative position to the ATG initiation codon (46). Further analysis of these sequences based on more recent reports of consensus promoter sequences in Escherichia coli (20, 16), indicate that P3 (indicated at Fig. 1) is the most probable sequence for a functional promoter.

Several experiments were performed in order to verify that this putative promoter is, in fact, a functional promoter.

1) Bal31 nuclease deletions.

In order to define the promoter region more precisely, the Bal31 nuclease was utilized to generate a collection of different deletions of the HpaIF-HpaII fragment (coordinates -191\169, Fig. 1) that carries the promoter. This DNA fragment was cloned in pBR327 at the ClaI site. As expected for a fragment that carries a functional promoter, in one of the two possible orientations

(plasmid pH1a), the cloned fragment restored the Tc<sup>r</sup> phenotype of the cloning vector.

Fig. 2 shows the strategy used in the Bal31 deletion experiments using plasmid pH1a (See Materials and Methods). Several deletions extending from the EcoRI site of pH1a were obtained (the extension of such deletions is depicted in Fig. 1); among them, pH14 and pH16 still confer Tc<sup>r</sup>, whereas plasmid pH122 does not. In this last deletion, the TagI site (located at coordinate -71 in pSAE4, in Fig. 1) is no longer present.

ii) Subcloning experiments.

The above results suggest that the DNA region located between the EcoRII and the TagI sites (coordinates -119 and -71, respectively, Fig. 1), is required for promoter activity. Therefore, we decided to subclone the HpaII-TagI fragment (coordinates -191 and -71, respectively, Fig. 1) and the TagI-HpaII fragment (coordinates -71 and 169, respectively, Fig. 1) at the ClaI site of pBR327, in order to determine whether they could restore the Tc<sup>r</sup> phenotype, as the original HpaII-HpaII fragment does. As expected, four different clones (plasmids pH2a, pH2b, pH3a and pH3b, Table 1) were obtained; however, none of them was capable of restoring the Tc<sup>r</sup> phenotype. Furthermore, none of these clones was capable to direct the synthesis of the first 57 aa of the protein, as the original HpaII-HpaII fragment does in pH1a (46) (data not shown). All



these subcloning experiments indicate that the integrity of the TagI site, which is located at the P3 putative promoter, is important for promoter activity.

iii) Primer extension and S1 nuclease mapping.

The fine mapping of the functional promoter was accomplished through primer extension and S1 nuclease mapping techniques.

For primer extension, total RNA was extracted from strains CS520, and PA340\pSAE4. Both strains were grown in NN media supplemented with excess or limiting nitrogen and glucose or glycerol as carbon sources.

A 21 bases oligonucleotide was synthesized as described (Materials and Methods). This primer carries the complementary sequence of the specific gdhA mRNA from coordinates +34 to +54 (Fig. 1) relative to the translation start point. This synthetic primer was hybridized to purified total RNAs and used for the reverse-transcriptase runoffs.

The results of one of such experiments are shown in Fig. 4. Although the cDNA products are the same in all assayed conditions, there are around three main cDNA products separated one or two bases from each other. This suggests that there is more than one transcription start site as it has been reported

for other genes (9, 32, 36). However, the most prominent band corresponds to a 117 b fragment. These results locate the main transcription start site around 8 bp downstream the -10 region of P3 and 63 bp upstream the translation start point (Fig. 1). No cDNA products suggesting transcription start sites corresponding to other putative promoters were observed. These results strongly indicate that the original P3 promoter (46) is a functional promoter, at least for the assayed conditions.

For S1 nuclease mapping, total RNAs were extracted as described, and the 360 bp HpaII fragment was used as a probe. After S1 nuclease digestion, there was a major 235 b protected fragment, which again indicates that P3 is the functional promoter in all assayed conditions (data not shown).

iv) Promoter site specific mutagenesis in plasmid pSAE422.

In order to confirm that P3 is a functional promoter, a series of different insertion mutations (most of them using EcoRI decanucleotide linkers) were generated at the TagI site, i.e., between the -10 region of the promoter and the putative transcription start site (Fig. 5).

Since the consensus for a transcription start site is from 8 to 10 bp downstream the -10 sequence of the promoter, and predominantly at purines (more frequently in A than in G) (20),

insertions of 2, 12 and 22 bp in the sequence immediately following the -10 region are expected to modify such start site depending on the length and the base content of the insertion.

This would be reflected in the size of the cDNA obtained from primer extension assays.

The insertion mutations at the TagI site were made in plasmid pSAE422 which is a derivative of the pSAE4 that carries the DNA that codes for the first third of the enzyme monomer (Table I and Fig. 5). Strain PA340 was transformed with the resulting plasmids. Total RNAs were extracted from cells grown in minimal medium supplemented with excess nitrogen, and glucose as carbon source. The results of one of such assays is shown in Fig. 6. As expected, the size of the obtained cDNA products increased according both to the length of each insertion and the position of the most suitable nucleotide (A or G) for the transcription start site.

Fig. 7 shows the nucleotide sequence of the wt promoter region as well as those for the insertion derivatives. The putative start site(s) are indicated for each case. EcoRI linkers were used as mutagens not only because they provided an easy way to screen for such insertions (the pSAE422 has no other EcoRI sites) but also because an insertion of a fragment at the TagI site, which overlaps the -10 region; and at the EcoRII

site, which is located 17 bp upstream the -35 region, provided a way to delete the whole promoter region generating plasmid pSAEΔ442 as a negative control.

It is interesting to note that in plasmid pSAE442, that carries EcoRI linkers at the TagI and EcoRII sites, the transcription start site is modified as in the pSAE432 case, in which this plasmid only carries a linker at the TagI site. However, in pSAE422 there is a clear decrease in the intensity of the band corresponding to the cDNA product. This could suggest that the sequence preceding the promoter might play a role either in promoter function or at the level of transcription regulation. It should be emphasized that this EcoRII site lies among an imperfect mirror image sequence which is described in section (D).

#### D) NUCLEOTIDE SEQUENCE ANALYSIS OF THE 5' FLANKING REGION OF THE gdhA GENE

The previous results clearly indicate that the P3 putative promoter is in fact a functional promoter for the gdhA gene. This promoter is located at coordinates -102 to -71 in Fig. 1. In this case, as in many other E. coli promoters, this

regulatory sequence is part of a high A/T content DNA region.

However, something that is worth mentioning, is that in this DNA region, there is a change in the A and T contents in the coding strand which seems to be delineated by the TagI site which is located immediately after the promoter. In the HpaII-TagI fragment, there is a 70\30 AT, whereas in the TagI-HpaII fragment the A/T ratio is 35\65. The possible significance of this difference, if any, is presently unclear.

Another interesting sequence that has been identified in this flanking region is a putative CRP binding site (Fig. 1) which overlaps the -35 region of the promoter, and which keeps close similarity with the consensus (12, 29). It should be noticed that in this case, such site lies in the non-coding strand of the sequence. However, this type of orientation in functional CRP binding sites has been reported for other genes (12).

Another outstanding feature of this region is a 42 bp imperfect palindromic sequence which overlaps both the -10 and -35 identities of the functional promoter and the putative CRP binding site. Its length and the fact that it overlaps the promoter could suggest that this identity might play a role in the regulation of the gdhA gene. Also overlapping this palindromic sequence, we identified an imperfect mirror image sequence (coordinates -166\40, Fig. 1) which keeps certain homology with similar identities found in the argTr regulatory

region and the dhuA regulatory sequence of the histidine transport operon of Salmonella typhimurium by Higgins and Ferro-Luzzi Ames (21). These authors have also found this type of sequences in the neighborhood of the promoters of the histidine and tryptophan biosynthetic operons and the lacI gene, and in the regulatory region of the glnALG operon of Escherichia coli and Salmonella typhimurium. In the case of argTr and dhuA in S. typhimurium, these sequences have been proposed as possible interaction sites for a dimeric protein with regulatory implications. It is worth noticing that in these cases, as in gdhA, the promoters are overlapped by palindromic sequences as well as by mirror image identities.

Fig. 1 also shows several direct repeated sequences throughout the 5' flanking region. It is interesting to note that none of these types of sequences are found in the structural gene, and also that there are six of such sequences, each of them found twice. Valle et al. (46) previously reported five of these sequences. These repeats could also play a role in the regulation of this gene.

During the nucleotide sequence analysis we also considered the fact that since GDH is one of the main enzymes involved in nitrogen metabolism, it might share some regulatory features with other genes and operons of this pathway. In this regard, we specifically searched for nitrogen promoters, this is, specific recognition sites for the glnE product which has been identified

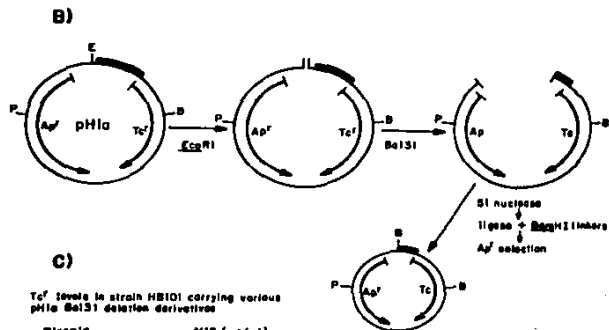
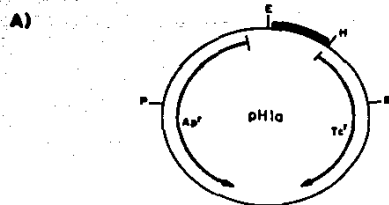
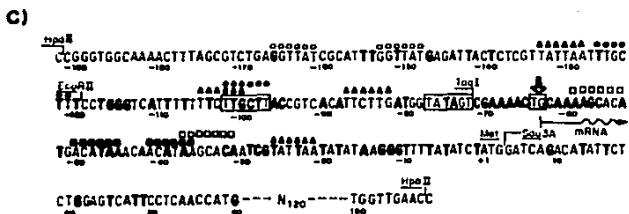
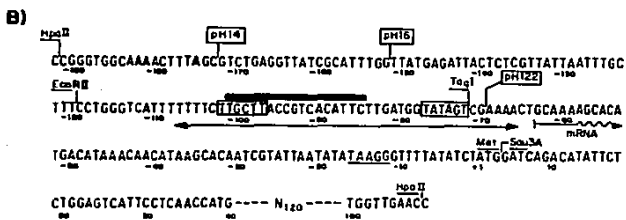
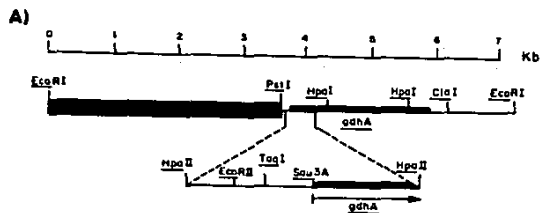
as a sigma subunit ( $\sigma$  60), and that is specific for the transcription initiation of genes and operons under nitrogen control (8, 23). We also searched for NRI (gp glnG) binding sites (15, 34). This protein has been identified as both a positive and negative regulatory protein depending on its position relative to the promoter sequence. However, we could not find any sequence in the gdhA 5' DNA flanking region showing significant homology with this type of sequences.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Irma Vichido from the Unit of Protein Purification, for some of the restriction enzymes used in this work and Mario Alberto Cuevas from the Unit of Chemical Synthesis of Macromolecules from the Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Mexico, for the oligonucleotides used in this work. We are indebted with Enrique Merino for the elaboration of the computer programs used in the search of specific sequences. This work was supported

partially by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico,  
Grant PCCBNAL-122584. Laura Riba is a recipient of a fellowship  
from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico.





**C)**  
 Tc<sup>r</sup> levels in strain HB101 carrying various pHIa SalI deletion derivatives

Plasmid	MIC (µg/ml)
-----	2
pHIa	23
pHI4	21
pHI5	19
pHI22	3

1

2

3

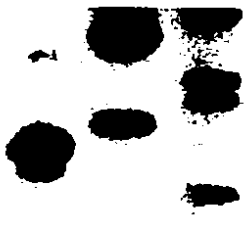
4

5

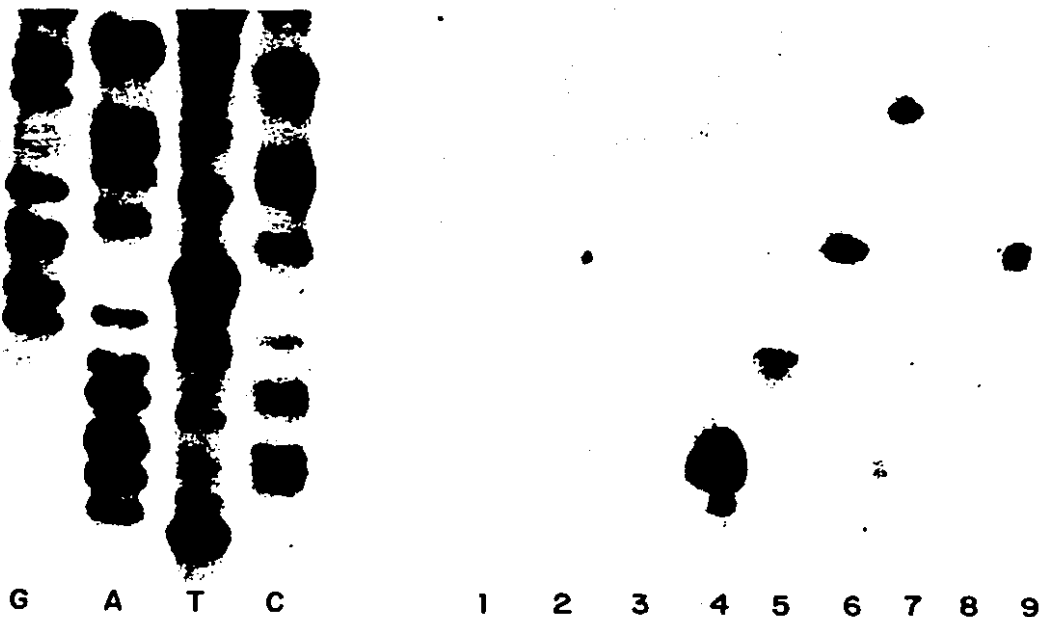
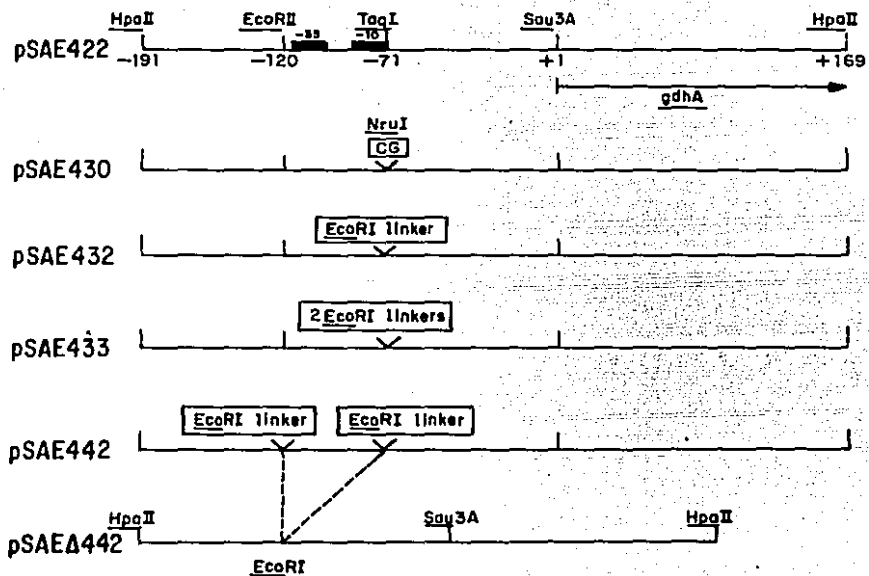
6

7

8



G A T C 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



A)

<sup>EcoRI</sup>  
 TTTCTGGGTCATTTTTTCTTGCTTACC<sup>-38</sup>GCACATTCTTGATGG<sup>-10</sup>TATAGT<sup>TagI</sup>CGAAACTGCAAAGCACA  
<sup>-180</sup> <sup>-160</sup> <sup>-90</sup> <sup>-80</sup> <sup>-70</sup> <sup>-60</sup>  
 mRNA

B)

	-10	TagI	
pSAE422	TATAGT	CGAAACTGC	AAAA
		NruI	
pSAE430	TATAGT	CGCGAAACTGC	AAAA
		EcoRI linker	
pSAE432	TATAGT	CGCCGAATTCGG	CGAAACTG
		EcoRI linkers	
pSAE433	TATAGT	CGCCGAATTCGGCCGAATTCGG	CGAA
		EcoRI linker	
pSAE442	TATAGT	CGCCGAATTCGG	CGAAACTG

A

1            2            3            4            5            6            7            8

B



## FIGURE LEGENDS

Fig. 1. (A) Restriction map of recombinant plasmid pSAE4 (40). The positions of the restriction sites are drawn to scale. The thick bar represents the pBR322 vector. The thin bar represents the *gdhA* structural gene. The expanded section details the 360 bp *Hpa*II fragment carrying the 5' flanking region of the gene and the sequence coding for the amino terminal of the protein (57 aa). The arrow denotes the direction of transcription of the *gdhA* gene. (B) Nucleotide sequence of the *Hpa*II fragment shown in A. -10 and -35 regions of the putative promoter (P3) (46) are boxed. The filled bar above the sequence denotes a putative CRP binding site. The double headed arrow beneath the sequence indicates an imperfect palindromic sequence. The putative transcription start site is denoted as mRNA. The ribosome binding site (Shine-Dalgarno sequence) is underlined; Met, translation initiation codon. pH14, pH16 and pH122 stand for the approximate extension of the Bal31 generated deletion derivatives from plasmid pH1a (See Fig. 2). (C) Same nucleotide sequence as above showing other outstanding features of the 5' DNA flanking region of the *gdhA* gene. The promoter sequence, the putative transcription start site and the translation initiation codon are indicated as in B. Open and filled circles, triangles and squares indicate different direct repeated sequences (46). The arrow above the sequence denotes the center of an imperfect mirror image sequence indicated in bold characters.

Fig. 2. (A) pBR327 derivative pH1a plasmid, in which the 5' DNA flanking region of the gdhA gene and the DNA that codes for the first 57 aa, carried in a 360 bp HpaII fragment, was cloned at the Clal site of the vector as the promoter region for the  $Tc^r$  gene. E, EcoRI; P, PstI; H, HindIII; B, BamHI. (B) Simplified strategy for the obtention of Bal31 deletion derivatives from pH1a (See Materials and Methods). (C)  $Tc^r$  levels in strain HB101 carrying various pH1a deletion derivatives. The approximate extensions of the deletions within the 5' flanking region of the gene, are indicated in Fig. 1B.

Fig. 3. (A) Northern blot analysis of gdhA transcripts using total RNA from strains MX614 (lanes 1, 2, 5 and 6), and CS520 (lanes 3, 4, 7 and 8). RNAs were extracted from cells grown in NN media supplemented with the following nitrogen and carbon sources: excess nitrogen - glucose (lanes 1 and 3); excess nitrogen - glycerol (lanes 2 and 4); limiting nitrogen - glucose (lanes 5 and 7); and limiting nitrogen - glycerol (lanes 6 and 8). Hybridization bands can be seen in lanes 5 to 8 only in overexposed autoradiograms (2 weeks of exposure).

Fig.4. Primer extension mapping of the transcription start site of the gdhA gene using total RNAs from strain PA340 carrying plasmid pSAB422 (lanes 1-4) and CS520 (lanes 5-8). Total RNAs were extracted from cells grown in NN media supplemented with the following nitrogen

and carbon sources: excess nitrogen - glucose (lanes 1 and 5); limiting nitrogen - glucose (lanes 2 and 6); limiting nitrogen - glycerol (lanes 3 and 7); and excess nitrogen - glycerol (lanes 4 and 8). Lanes 9-11, control essays using tRNA instead of total RNA (lane 9); no primer (lane 10); and no total RNA (lane 11). Lanes labeled GATC correspond to an M13 phage sequence used as marker. Autoradiograms were overexposed in order to appreciate cDNA in all the lanes.

Fig. 5. Restriction maps of the 5'DNA flanking region of plasmid pSAE422 and its insertion derivatives. The important restriction sites are indicated at the top of the figure and numbers in pSAE422 denote the coordinates of such sites which are the same as in pSAE4 (Fig. 1). The arrow shows the direction of transcription and the position of the translation initiation codon. Plasmid pSAE430 was obtained by the insertion (using Klenow enzyme) of 2 bp at the TagI site; this event generated a NruI site. Plasmids pSAE432 and pSAE433 were obtained by inserting one and two EcoRI decanucleotides respectively at the NruI site of plasmid pSAE430. Plasmid pSAE442 is a derivative of pSAE432 in which an EcoRI linker was inserted at the EcoRII site located 17 bp upstream the -35 region of the promoter. Finally, plasmid pSAEΔ442 is a deletion derivative of pSAE442 in which the whole promoter was deleted through an EcoRI digestion.

Fig. 6. Primer extension mapping of the transcription start sites of the gdhA gene using total RNAs from strain PA340 carrying plasmid pSAE422 and its insertion mutation derivatives. Cells were grown in glucose minimal media. Lanes labeled GATC correspond to an M13 phage sequence used as marker. Lanes 1-3, same control assays as in Fig. 4. Lanes 4 to 9, RNA extracted from PA340 cells carrying different plasmids: Lane 4, plasmid pSAE422; lane 5, plasmid pSAE430; lane 6, plasmid pSAE432; lane 7, plasmid pSAE433; lane 8, plasmid pSAE $\Delta$ 442; lane 9 plasmid pSAE442 (three times as much sample was loaded in the lane).

Fig. 7. (A) Nucleotide sequence of the promoter region of the gdhA gene, coordinates -122 / -67 relative to the translation start site (+1). -10 and -35 regions of the promoter are boxed; mRNA denotes the transcription start site. (B) Nucleotide sequence of the insertion mutations present in pSAE422 derivatives. The -10 region of the promoter is indicated by open boxes. Bold characters denote inserted nucleotides. The putative transcription start sites are underlined.

Alternative figure legend for Fig. 3.



Fig. 3. (A) Northern blot analysis of gdhA transcripts using total RNA from strains MX614 (lanes 1, 2, 5 and 6), and CS520 (lanes 3, 4, 7 and 8). RNAs were extracted from cells grown in NN media supplemented with the following nitrogen and carbon sources: excess nitrogen - glucose (lanes 1 and 3); excess nitrogen - glycerol (lanes 2 and 4); limiting nitrogen - glucose (lanes 5 and 7); and limiting nitrogen - glycerol (lanes 6 and 8). (B) Overexposure of the same gel in which gdhA transcripts can be clearly appreciated in lanes 5 to 8.

## REFERENCES

1. Bailey, J.M. and N. Davidson. 1976. Methylmercury as a reversible denaturing agent for agarose gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 70:75-85.
2. Bender, R.A., A. Macaluso and B. Magasanik. 1976. Glutamate dehydrogenase genetic mapping and isolation of regulatory mutants in Klebsiella aerogenes. *J. Bacteriol.* 127:141-148.
3. Berberich, M.A. 1972. A glutamate dependent phenotype of Escherichia coli K-12: the result of two mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47:998-1503.
4. Berk, A. and P. Sharp. 1978. Spliced early mRNA of simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:1274-1278.
5. Bolivar, F., R.L. Rodriguez, P.J. Greene, M.C. Betlach, H.L. Heyneker, H.W. Boyer, J.H. Cross and S. Falkow. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles, II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2:95-113.
6. Brenchley, J., C.A. Baker and L.C. Patil. 1975. Regulation of the ammonia assimilatory enzymes in Salmonella typhimurium. *J. Bacteriol.* 114:666-673.
7. Brenchley, J., M. Prival and B. Magasanik. 1973. Regulation of the enzymes responsible for glutamate formation in Klebsiella aerogenes. *J. Biol. Chem.* 248:6122-6128.
8. Buck, M. 1986. Deletion analysis of the Klebsiella pneumoniae nitrogenase promoter: Importance of spacing between conserved sequences around positions -12 and -24 for activation by the nifA and ntrC (glnG) products. *J. Bacteriol.* 166:545-551.
9. Cannistraro, V.J. and D. Kennell. 1985. The 5' ends of Escherichia coli lac mRNA. *J. Mol. Biol.* 182:241-248.
10. Clarke, L. and J. Carbon. 1975. Biochemical construction and selection of hybrid plasmids containing specific segments of the Escherichia coli genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72:4361-4365.
11. Covarrubias, A., R. Sánchez-Pescador, A. Osorio, F. Bolivar and F. Bastarrachea. 1980. ColE1 hybrid plasmids containing Escherichia coli genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine. *Plasmid* 3:150-164.
12. de Crombrughe, B., S. Busby and H. Buc. 1984. Cyclic AMP receptor protein: Role in transcription activation. *Science* 224: 831-838.
13. Dedinger, S.M. and J.E. Brenchley. 1980. Temperature sensitive glutamate dehydrogenase mutants of Salmonella typhimurium. *J. Bacteriol.* 144:1043-1047.

14. Dedinger, S.M., L.G. Patil and J.E. Brenchley. 1980. Salmonella typhimurium mutants with altered glutamate dehydrogenase and glutamate synthase activities. *J. Bacteriol.* 141:190-198.
15. Ferro-Luzzi Ames, G. and K. Nikaido. 1985. Nitrogen regulation in Salmonella typhimurium. Identification of an ntnC protein binding-site and definition of a consensus binding sequence. *EMBO J.* 4:539-547.
16. Galas, D.J., M. Eggert and M.S. Waterman. 1985. Rigorous pattern-recognition methods for DNA sequences. *J. Mol. Biol.* 186:117-128.
17. Graham, S.B., J.T. Stephenson and J.M. Wood. 1984. Proline dehydrogenase from Escherichia coli K-12. *J. Biol. Chem.* 259:2656-2661.
18. Greene, P.J., H.L. Heyneker, F. Bolivar, R.L. Rodriguez, M.C. Betlach, A.A. Covarrubias, K. Backman, D. Russel, R.C. Tait and H.W. Boyer. 1978. A general method for the purification of restriction enzymes. *Nucl. Acids Res.* 5:2373-2380.
19. Halpern, Y.S. and H.E. Umbarger. 1960. Conversion of ammonia to amino groups in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 80:285-288.
20. Hawley, D.K. and W. McClure. 1983. Compilation and analysis of Escherichia coli promoter DNA sequences. *Nucl. Acids Res.* 11:2237-2255.
21. Higgins, C.F. and G. Ferro-Luzzi Ames. 1982. Regulatory regions of two transport operons under nitrogen control: nucleotide sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70:1083-1087.
22. Hirataka, I., I. Yoshimasa, I. Satoshi and K. Itakura. 1982. Solid phase synthesis of polynucleotides. VI. Further studies on polystyrene copolymers for the solid support. *Nucl. Acids Res.* 10:1755-1769.
23. Hirschman, J., P.K. Wong, K. Sei, J. Keener and S. Kustu. 1985. Products of nitrogen regulatory genes ntxA and ntnC of enteric bacteria activate glnA transcription in vitro: Evidence that the ntxA product is a factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 7525-7529.
24. Isenberg, S. and E.B. Newman. 1974. Studies on L-serine deaminase in Escherichia coli K-12. *J. Bacteriol.* 118:53-58.
25. León, P., D. Romero, A. Garcarrubio, F. Bastarrachea and A. Covarrubias. (1985). Glutamine synthetase constitutive mutation affecting the glnALG upstream promoter of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 164:1032-1038.

26. Liang, A. and R.L. Houghton. 1981. Coregulation of oxidized nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) transhydrogenase and glutamate dehydrogenase activities in enteric bacteria during nitrogen limitation. *J. Bacteriol.* 146:997-1002.
27. Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr and R.J. Randall. (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
28. Magasanik, B. 1982. Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Ann. Rev. Genet.* 16:135-168.
29. Magasanik, B. and F.C. Neidhardt. 1987. Regulation of carbon and nitrogen utilization, p. 1318-1325. In F.C. Neidhardt (ed.), Escherichia coli and Salmonella typhimurium cellular and molecular biology, Vol. II. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
30. Manley, I., P. Sharp and M. Gefter. 1979. RNA synthesis in isolated nuclei: In vitro initiation of adenovirus 2 major late mRNA precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:160-164.
31. Mecke, D. and H. Holzer. 1966. Repression und inaktivierung von glutamine synthetase in Escherichia coli durch  $\text{NH}_4^+$ . *Biochem. Biophys. Acta* 122:341-351.
32. Miles, J.S. and J.R. Guest. 1984. Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene (manA) of Escherichia coli. *Gene* 32:41-48.
33. Mulligan, M.E., D.K. Hawley, R. Entriken and W.R. McClure. 1984. Escherichia coli promoter sequences predict in vitro RNA polymerase selectivity. *Nucl. Acids Res.* 12:780-800.
34. Ninfa, A.J. and B. Magasanik. 1986. Covalent modification of the glnG product, NRI, by the glnL product, NRII, regulates the transcription of the glnALG operon in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:5909-5913.
35. Pahel, G., A. Zelenetz and B. Tyler. 1978. gltB gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 133:134-148.
36. Plamann, M.D. and G.V. Stauffer. 1983. Characterization of the Escherichia coli gene for serine hydroxymethyltransferase. *Gene* 22:2-18.
37. Reitzer, L.J. and B. Magasanik. 1987. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine L-alanine and D-alanine, p. 302-320. In F.C. Neidhardt (ed.), Escherichia coli and Salmonella typhimurium cellular and molecular biology, Vol I. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

38. Rigby, P.W.J., M. Dieckmann, C. Rhodes and P. Berg. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113:237-251.
39. Rosenfeld, S.A., S.M. Dedinger, E.H. Murphy and J.E. Brenchley. 1982. Genetic characterization of the glutamate dehydrogenase gene (gdhA) of Salmonella typhimurium. *J. Bacteriol.* 150:795-803.
40. Sánchez-Pescador, R., E. Sanvicente, F. Valle and F. Bolivar. 1982. Recombinant plasmids carrying the glutamate dehydrogenase structural gene from Escherichia coli K-12. *Gene* 17:1-8.
41. Senior, P.J. 1975. Regulation of nitrogen metabolism in Escherichia coli and Klebsiella aerogenes: Studies with the continuous culture technique. *J. Bacteriol.* 123:407-418.
42. Soberón, X., L.R. Covarrubias and F. Bolivar. 1980. Construction and characterization of new cloning vehicles, IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325. *Gene* 9:287-305.
43. Stewart, G.R., A.F. Mann and P.A. Fentem. 1980. Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase, p. 271-327. In Mifflin, B.F. (ed.), *The biochemistry of plants: a comprehensive treatise*. Vol. 5. Academic Press, New York.
44. Streicher, S.A., A.B. Deleo and B. Magasanik. 1976. Regulation of enzyme formation in Klebsiella aerogenes by episomal glutamine synthetase in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 127:184-192.
45. Tyler, B. 1978. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 47:1127-1162.
46. Valle, F., E. Sanvicente, P. Seeburg, A. Covarrubias, R.L. Rodriguez and F. Bolivar. 1983. Nucleotide sequence of the promoter and amino terminal region of the glutamate dehydrogenase structural gene of Escherichia coli. *Gene* 23:199-209.
47. Valle, F., B. Bacerril, E. Chen, P. Seeburg, H. Heyneker and F. Bolivar. 1984. Complete nucleotide sequence of the glutamate dehydrogenase gene from Escherichia coli K-12. *Gene* 27:193-199.
48. Varrichio, F. 1969. Control of glutamate dehydrogenase synthesis in Escherichia coli. *Biochem. Biophys. Acta* 177:560-564.
49. Wotton, J.C. 1983. Reassessment of ammonium ion affinities of NADP-specific glutamate dehydrogenases: activation of the Neurospora crassa enzyme by ammonium and rubidium ions. *Biochem. J.* 209:527-531.

TABLE 1. Bacterial Strains and Plasmid Constructions.

STRAIN	GENOTYPE	SOURCE\COMMENTS
CG520	<u>HfrC trpA58 metB1 glyV50 supF58</u> <u>relA1</u>	Clarke & Carbon (10) The <u>gdhA</u> gene was isolated from this strain [Covarrubias et al. (11)]
PA340	F <sup>-</sup> <u>thr-1 leuB6 gdh-1 hisG1 gltB31</u> <u>argH1 thi-1 ara-14 lacY1 gal-6</u> <u>malA1 xyl-2 mtl-2 tonA2 λ<sup>+</sup></u> λ <sup>-</sup> <u>rpsL supE44</u>	F. Jacob via J. Bachman glutamate auxotroph
MX614	Δ ( <u>pro-lac</u> ) <u>galE ilv690 thi-1</u>	F. Bastarrachea
HB101	F <sup>-</sup> <u>hsdS20 (r<sub>s</sub>, m<sub>s</sub>) recA13 ara14</u> <u>proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5</u> <u>mtl-1 supE44 λ<sup>-</sup></u>	H. Boyer
PLASMIDS	GENOTYPE	SOURCE\COMMENTS
pBR327	Apr <sup>r</sup> Tcr <sup>r</sup>	Deletion derivative of pBR322 that lacks the

bam site (5, 42).

pSAE4	<u>gdhA</u> <sup>+</sup> Tc <sup>r</sup>	Carries the complete <u>gdhA</u> gene and flanking regions (40, 46).
pSAE422	<u>gdhA</u> <sup>-</sup> Tc <sup>r</sup>	Deletion derivative of pSAE4 carrying the 5' flanking region and the coding region for the first 102 aminoacids of the protein (40).
pSAE430		
pSAE432	<u>gdhA</u> <sup>-</sup> Tc <sup>r</sup>	A set of insertion derivatives of pSAE422 (Fig. 4, this paper).
pSAE433		
pSAE442		
pSAE442	<u>gdhA</u> <sup>-</sup> Tc <sup>r</sup>	60 bp (original coordinates -120\ -71, Fig. 1) deletion derivative of pSAE442 in which the whole promoter sequence was deleted (This paper).
pH1a	Tc <sup>r</sup> Apr <sup>r</sup>	pBR327 derivative carrying the <u>gdhA</u> 5' flanking region in a 360 bp <u>Hpa</u> II fragment from pSAE4 (coordinates -191\169, Fig. 1), cloned at the <u>Cla</u> I site of the vector as the promoter region for the Tc <sup>r</sup> gene (46).
pH1b	Tc <sup>r</sup> Apr <sup>r</sup>	Same as pH1a, except that the fragment was cloned in the opposite orientation (46).

pH2a	Tc <sup>r</sup> Apr <sup>r</sup>	pBR327 derivative carrying a <u>HpaII</u> - <u>IaqI</u> fragment from pSAE4 (coordinates -191\ -71, Fig. 1), cloned at the <u>ClaI</u> site as the promoter region of the Tc <sup>r</sup> gene (This paper).
pH2b	Tc <sup>r</sup> Apr <sup>r</sup>	Same as pH2a, except that the fragment was cloned in the opposite orientation (This paper).
pH3a	Tc <sup>r</sup> Apr <sup>r</sup>	pBR327 derivative carrying the <u>IaqI</u> - <u>HpaII</u> fragment from pSAE4 (coordinates -71\ 169, Fig. 1), cloned at the <u>ClaI</u> site as the promoter region of the Tc <sup>r</sup> gene (This paper).
pH3b	Tc <sup>r</sup> Apr <sup>r</sup>	Same as pH3a, except that the fragment was cloned in the opposite orientation (This paper).
pH14	Tc <sup>r</sup> Apr <sup>r</sup>	A set of <u>Bal31</u> deletion derivatives of pH1a (See Fig. 2, this paper).
pH16	Tc <sup>r</sup> Apr <sup>r</sup>	
pH122	Tc <sup>r</sup> Apr <sup>r</sup>	



TABLE 2. GDH sp act<sup>a</sup> determinations of two *E. coli* K-12 strains grown with excess and limiting ammonia<sup>b</sup> in glucose minimal media<sup>c</sup>.

STRAIN	EXCESS NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	LIMITING NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
MX614	400	100
C6520	700	300

- (a) The results shown in all Tables are the average of at least 2 (in some cases 5-7) separate and duplicate experiments.
- (b) excess and limiting ammonia were supplied to a final concentration of 15 mM and 0.5 mM respectively.
- (c) sp acts are expressed as nanomoles of NADPH oxidized per mlr per mg\protein at 37 °C.

**TABLE 3. Effect of various nitrogen sources in the GDH and GS sp acts from strain MX614 grown in glucose NN media.**

Nitrogen Source*	GDH sp act <sup>b</sup>	GS sp act <sup>c</sup>
1. Excess NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	100	135
2. Limiting NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	25	1 350
3. Glutamate	19	920
4. Glutamine	70	1 100
5. Aspartate	25	1 190
6. Arginine	82	1 140
7. Proline	33	560
8. Serine	100	648
9. Combination (Asp + Arg + Pro + Ser)	118	98

- (a) NH<sub>4</sub><sup>+</sup> was supplied as in Table 2. All aa were supplied to a final concentration of 0.2 % except for the combination (9) where each aa was supplied to a final concentration of 0.05 %.
- (b) GDH sp acts are expressed as percentages taking the value for excess NH<sub>4</sub><sup>+</sup> as 100 %.
- (c) GS sp acts are expressed as nanomoles of  $\gamma$ -glutamyl-hydroxamate

formed per min per mg\protein at 37 °C. Activities were determined without  $Mg^{+2}$  in the reaction mixture.

**TABLE 4. Effects of different aa supplemented to glucose ammonia (15 mM) media on the GDH and GS sp acts<sup>a</sup> from strain HX614.**

b Aminoacid	As sole Nitrogen Source		Added to glucose-ammonia minimal media	
	GDH sp act	GS sp act	GDH sp act	GS sp act
1. No addition	--	---	100	135
2. Glutamate	19	920	90	ND
3. Aspartate	25	1 190	59	96
4. Arginine	73	1 140	113	85
5. Proline	33	560	99	74
6. Serine	100	648	113	123
7. Combination (Asp, Arg, Pro, Ser)	126	98	67	74

(a) Sp acts are expressed as in Table 3.

(b) Aminoacids were supplemented as in Table 3.

(ND) Not determined.

## RESULTADOS ADICIONALES Y DISCUSION

Como se menciona en el escrito presentado como parte principal de esta tesis, existe una falta de consenso en cuanto a los mecanismos celulares que regulan la expresión de la GDH, y en particular, falta de información sobre la regulación del gene gdhA, en Escherichia coli. Los datos reportados en la literatura tienden a ser escasos y contradictorios. En este sentido, los resultados obtenidos a lo largo de este proyecto de tesis, han permitido tener un panorama más amplio, si bien no del todo claro sobre la expresión de esta enzima por fuentes de nitrógeno y de carbono.

Las determinaciones de actividad específica de la GDH se iniciaron con la cepa silvestre CS520, básicamente debido a que fué a partir de un banco de genes de esta cepa que se aisló el gene gdhA (ver Tabla 1). Sin embargo, esta cepa lleva una mutación en el gene relA denominada relA1. Se ha reportado que mutaciones en este gene afectan la expresión de enzimas involucradas en la síntesis de glutamina y glutamato en Salmonella typhimurium, posiblemente a causa de alteraciones en los niveles de ppGpp (Sales and Brenchley, 1982). Debido a esto, la determinación de actividades de las enzimas GDH y GS se llevaron a cabo en la cepa silvestre MX614 (Tabla 1), frecuentemente utilizada para el estudio de enzimas involucradas en el metabolismo nitrogenado de Escherichia coli.

Regulación de la expresión de la GDH por niveles de amonio.

Las actividades específicas de la GDH en condiciones de crecimiento de exceso y limitación de amonio (ver Tabla 1) muestran que si bien la diferencia registrada no es drástica, en cuanto a que no hay un cambio del orden de magnitud, si existe una regulación de la actividad de la enzima por disponibilidad de amonio. La regulación observada en las cepas MX614 y CS520 concuerda en cuanto a que se observa una disminución de la actividad de la enzima en limitación de amonio. Sin embargo, por un lado, la CS520 presenta niveles de actividad más altos que la MX614 en ambas condiciones, y además, la diferencia de actividades entre exceso y limitación de amonio se reduce en la primera. Si bien esta diferencia pudiera estar relacionada con la mutación relA1, también pudiera deberse a una mutación de pocas consecuencias en la región del promotor de alguna de las cepas, entre otras causas. Sin embargo, para eliminar la posibilidad de que esta diferencia fuera debida al fondo genético de la cepa CS520, las determinaciones de actividad subsiguientes, se efectuaron en la cepa MX614.

### Expresión de la GDH en fuentes limitantes de nitrógeno.

La bacteria Escherichia coli puede crecer en medios de cultivo complementados con una variedad de aminoácidos como fuentes orgánicas de nitrógeno. En estos casos, el crecimiento es invariablemente más lento que con amonio, por lo que estas fuentes se han definido como limitantes de nitrógeno (Reitzer y Magasanik, 1987). Sin embargo, las actividades específicas de la GDH y la GS obtenidas a partir de células cultivadas en medios con distintos aminoácidos como fuentes de nitrógeno (Tabla 2), indican que existe una aparente gradación en cuanto a las propiedades limitantes de los diferentes aminoácidos. Esta gradación se ve reflejada en los niveles de actividad de la GS que funcionan como indicadores de la limitación de nitrógeno, ya que es esta limitación la que eleva sus niveles de expresión.

Por otro lado, considerando únicamente las actividades de ambas enzimas en exceso y limitación de amonio, pareciera que sus actividades son reguladas de manera inversa, es decir, que en exceso de amonio los niveles de la GDH son altos, y los de la GS bajos, invirtiéndose los niveles de actividad en limitación de amonio. Sin embargo, si bien es este el caso con algunos aminoácidos como fuente de nitrógeno (glutamato, aspartato y la mezcla de aspartato, arginina, prolina y serina), aminoácidos tales como la glutamina y la arginina generan altos niveles de GS y no se ve una disminución significativa en los niveles de GDH. De la misma manera el uso de prolina o serina tampoco siguen un

patrón definido ya que los niveles de GS no se encuentran muy elevados, mientras que los niveles de GDH son bajos en el primer caso, y altos en el segundo. Estos datos pudieran ser explicados por la generación de amonio y/o glutamato a partir de la degradación de estos aminoácidos, y por la eficiencia con que estos productos puedan ser generados. Un ejemplo es la serina, que es degradada generando amonio de manera muy eficiente (Isenberg y Newman, 1974) lo cual establece una condición de exceso de este compuesto elevando los niveles de la GDH. Como sería de esperarse, en este caso los niveles de la GS no son altos. Compuestos como la prolina y el aspartato generan glutamato al ser degradados (Reitzer y Magasanik, 1987), el cual ha sido reportado como inhibidor de la GDH y como uno de los efectores de la desrepresión de la GS. Por último, compuestos como la arginina generan amonio y glutamato al ser degradados. En este caso, las actividades de ambas enzimas son elevadas.

Los datos y consideraciones anteriormente expuestos parecen indicar que la GDH no se regula de manera inversa a la GS, ni los niveles de ésta última ejercen efecto en su expresión. El papel de la GDH parece ser el de una especie de modulador o amortiguador de los niveles de ciertos metabolitos como pudieran ser el amonio, el glutamato y aún el 2-oxoglutarato que actúan como efectores de la regulación de la asimilación de nitrógeno en la bacteria. Este posible papel de la GDH no excluye la posibilidad de que esta enzima pudiera estar regulada a su vez por la interacción directa o indirecta de alguno de estos



metabolitos o un intermediario que actuara como sensor de la disponibilidad de nitrógeno en el medio, o aún de las pozas de dichos metabolitos en el medio intracelular.

### El glutamato como posible inhibidor de la expresión de la GDH.

El glutamato ha sido reportado en la literatura como un inhibidor de la actividad de la GDH y la GOGAT (Halpern y Umbarger, 1960; ; Mecke y Holzer, 1966; Varrichio, 1969). El aspartato y la prolina, que son metabolizados en glutamato al entrar a la célula también reducen los niveles de actividad de la GDH (Tabla 3). Si bien la actividad de esta enzima disminuye al usar la célula glutamato como única fuente de nitrógeno, es importante hacer notar que esto puede deberse a que el transporte de glutamato al citoplasma es poco eficiente (Tyler, 1978), mientras que el transporte de prolina y aspartato se lleva a cabo con mayor eficiencia (Tyler, 1978; Graham et al., 1984).

Los resultados presentados en la Tabla 4 indican que solamente el aspartato, y una mezcla de aminoácidos que incluya al aspartato, mantienen una inhibición significativa de la actividad de la GDH en condiciones de exceso de amonio. La prolina, aunque también es metabolizada a glutamato, no exhibe este efecto. Esto probablemente se deba a que las enzimas que

transportan y degradan prolina se encuentran sujetas a regulación por nitrógeno (Magasanik, 1982), por lo que es de esperarse que en condiciones de exceso de amonio estén reprimidas.

De ser el glutamato un efector en la regulación de la GDH, un posible mecanismo por medio del cual pudiera ejercer su efecto sería a través de una inhibición por producto final a nivel de la actividad de la enzima. Sin embargo, los estudios *in vitro* sobre el efecto del glutamato en la actividad de la enzima indican que no se registran cambios significativos al eliminar el glutamato de los extractos celulares, o al adicionarlo en concentraciones crecientes [Ver sección A (iii) de Resultados]. Estos datos sugieren que de ser el glutamato un efector de la regulación de la GDH, no actúa a nivel de la actividad de la enzima.

#### Análisis del producto de transcripción del gene *gdhA*.

Un análisis de los transcritos del gene *gdhA* detectados en condiciones de crecimiento de exceso y limitación de amonio, y utilizando glucosa o glicerol como fuentes de carbono, indican que la regulación por disponibilidad de amonio parece darse a nivel de la transcripción del gene (ver Fig. 3). Se detectó un solo transcrito del tamaño esperado considerando el tamaño del gene estructural (1.500 pb), en todas las condiciones metabólicas ensayadas.

La cepa CS520 registró niveles más elevados de transcrito comparada con la cepa MX614, lo cual concuerda con los niveles de actividad registrados en ambas cepas. Al igual que en las actividades específicas, se observa una disminución en los niveles de transcrito en condiciones de limitación de amonio en ambas cepas. Sin embargo, la diferencia registrada es más drástica a nivel de concentración de transcrito, lo cual sugiere que posiblemente se den mecanismos adicionales de regulación posteriores a la transcripción.

Efecto multicopia de la región regulatoria 5' del gene *gdhA* y del gene completo, en la actividad de la enzima

La detección de una notoria diferencia entre las concentraciones de transcrito en las diferentes condiciones de crecimiento (exceso y limitación de amonio), sugiere fuertemente que la regulación de la expresión de la GDH se da a nivel de transcripción. Con el objeto de determinar si la región regulatoria 5' es portadora de alguna secuencia como sitio de unión a alguna proteína reguladora, se estudió el efecto multicopia de esta región sobre la actividad de la enzima codificada por el gene cromosomal de la cepa MX614 (Tabla 5). De existir alguna proteína reguladora que interactuara con la región reguladora 5' del gene, se esperaría que la presencia de esta región en multicopia ejerciera un efecto de titulación de dicha proteína. Cabría la posibilidad, sin embargo, de que

ésta no fuera titulada por la presencia de la región de control del gene gdhA en multicopia debido a mecanismos inherentes a su regulación, como sería el caso de una proteína auto-regulada, o bien a que se expresara constitutivamente en altas concentraciones.

Con este propósito, la cepa MX614 fué transformada con el plásmido pSAE422, que lleva la región 5' del gene intacta y la región del gene estructural que codifica para los primeros 57 aa de la proteína (Tabla 1). Así mismo, la cepa fué transformada con los derivados de este plásmido que llevan inserciones en la región localizada entre el -10 del promotor funcional y el sitio de inicio de transcripción (Fig. 7). Esto se llevó a cabo con el objeto de determinar si mutaciones en esta región podrían afectar de alguna manera los niveles de la enzima que pudieran ser modificados por el efecto multicopia de la región 5' silvestre.

Tabla 5. Efecto multicopia de la región regulatoria 5' del gene gdhA en la actividad de la enzima codificada por el gene cromosomal de la cepa MX614 de Escherichia coli K-12.

CEPA	PLASMIDO	Actividad específica de GDH <sup>+</sup>	
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 15 mM	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 0.5 mM
MX614	-----	442	90
MX614	pSAE422	559	130
MX614	pSAE430	543	135
MX614	pSAE432	505	145
MX614	pSAE433	552	126
MX614	pSAE442	512	135
MX614	pSAEΔ442	527	156

- (a) Los resultados mostrados en esta sección son el promedio de por lo menos dos experimentos efectuados en días distintos, cada uno por duplicado.
- (b) La actividad específica está expresada como nanomoles de NADPH oxidado por mg de proteína por min a 37°C.

Los resultados mostrados en la Tabla 5 indican que no se observa una diferencia significativa en las actividades específicas de la cepa MX614 transformada con los diversos plásmidos.

Los datos obtenidos, no excluyen, sin embargo, la posibilidad de que sí exista una proteína que interactúe con esta región, como ya se indicó anteriormente. Estos resultados podrían ser explicados si se tratara de una proteína que estuviera auto-regulada. De esta manera, aunque el posible sitio de unión estuviera en multicopia, los niveles de esta proteína hipotética en el citoplasma no serían suficientes para reprimir su propia síntesis. Alternativamente, esta proteína pudiera expresarse constitutivamente y en altas concentraciones, lo cual no permitiría su titulación.

Por otro lado, se estudió el efecto multicopia del gene completo, clonado en el plásmido pSAE4, en la actividad de la GDH en la misma cepa, y en la cepa PA340 ( $gdh^-$ ) (Tabla 1A). Los resultados se muestran en la Tabla 6.

**TABLA 6. Efecto multicopia del gene gdhA en la actividad específica de la GDH en las cepas MX614 y PA340 de Escherichia coli K-12.**

CEPA	Actividad específica de GDH <sup>a</sup>	
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 15 mM	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 0.5 mM
MX614\pSAE4	9,470	1,690
PA340\pSAE4	1,900	4,700

(a) La actividad específica está expresada como nanomoles de NADPH oxidado por min por mg de proteína a 37°C.

Los datos mostrados en la Tabla 6 son de gran interés debido a que, en primera instancia, los aumentos registrados en la actividad de la GDH en ambas cepas no pueden ser explicados únicamente por el efecto de la multicopia, ya que si bien la cepa MX614 debe tener la actividad específica correspondiente a la enzima codificada por el gene cromosomal, esto no explica por sí solo la diferencia de actividad global que presenta con respecto a la cepa PA340. Por otro lado, es claro que parece haber una inversión en la regulación de la expresión de la enzima en la cepa PA340, registrándose actividades de más del doble en condiciones de limitación de amonio. Es importante hacer notar que esta cepa, además de ser gdh<sup>-</sup>, lleva la mutación gltB31 que

ha sido caracterizada como una delección del operón gltBDF que codifica para las dos subunidades de la enzima glutamato sintasa (GOGAT), así como para una proteína de aproximadamente 30,200 daltones con posibles funciones regulatorias en el sistema global del metabolismo nitrogenado (sistema Ntr) (Castaño et al., en prensa). Se han encontrado evidencias de que el producto protéico del gene gltF está involucrado en la regulación global del sistema Ntr, debido a que cepas con mutaciones en este gene, o bien, con mutaciones polares que lo afectan, no responden a condiciones de limitación de nitrógeno, no solo impidiéndose la desrepresión de la GS, sino de otros operones bajo el control Ntr, presentando los fenotipos  $Gsd^-$ ,  $Ntr^-$  (Castaño et al., en prensa).

Un análisis de los fondos genéticos de las cepas MX614 y PA340 podría explicar los resultados presentados en la Tabla 6, en el sentido de que en la MX614, en condiciones de limitación de amonio, la asimilación de éste, por medio de la biosíntesis de glutamato, puede ser llevada a cabo por medio de la acción coordinada de las enzimas GS y GOGAT. En el caso de la PA340, al haber una delección del operón gltBDF, no puede haber asimilación de amonio por medio del mecanismo GS-GOGAT, ni la asimilación de nitrógeno por medio de la degradación de aminoácidos potencialmente utilizables, ya que la ausencia del producto génico de gltF da lugar a un fenotipo  $Ntr^-$ . Debido a esto, es



probable que el aumento en la actividad de la GDH en la cepa PA340 se dé como respuesta a la incapacidad de la célula de asimilar amonio por la vía normal. Sin embargo, es importante hacer notar que en este caso, el gene que codifica para la GDH se encuentra en multicopia lo cual podría amplificar o modificar de manera importante el efecto del fondo genético en los niveles de actividad de la enzima.

Efecto de mutaciones en genes involucrados en la regulación del sistema Ntr sobre la actividad específica de la GDH.

Debido al carácter regulatorio atribuido al producto protéico de gltF, otra posibilidad para explicar los resultados de la Tabla 5 sería que el gene gdhA pudiera estar regulado directa o indirectamente por esta proteína. Con el objeto de ahondar un poco más en esta posibilidad, se observó el comportamiento de la actividad específica de la GDH codificada por el cromosoma en condiciones de exceso y limitación de amonio en cepas con mutaciones en genes que codifican para proteínas regulatorias del sistema Ntr, tales como glnF (cepa MX848) y glnG (cepa MX902), así como en la MX1178 (gogat<sup>-</sup>), que es una cepa derivada de la MX614 que lleva una inserción en gltB (gltB225 ::  $\Omega$ ). Los genotipos completos de estas cepas se muestran en la Tabla 1A. Los resultados de estas determinaciones se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Efecto del exceso y limitación de amonio en la actividad específica de la GDH en cepas derivadas de la MX614.

CEPA	Genotipo o Fenotipo Relevante	Actividad específica de GDH <sup>a</sup>	
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 15 mM	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 0.5 mM
MX614	silvestre	325	70
MX1178	<u>gltB225</u> :: $\Omega$	281	200
MX848	glnF <sup>-</sup>	262	201
MX902	glnG <sup>-</sup>	300	200

(a) La actividad está expresada como nanomoles de NADPH oxidados por min por mg de proteína a 37°C.

Como se puede observar en la Tabla 7, la cepa MX614 presenta, en condiciones de limitación de amonio un 21 % de la actividad registrada en exceso de amonio. En el caso de la cepas

MX1178, MX848 y MX902, la actividad específica tiende a bajar, aunque de manera no muy significativa en exceso de amonio. Sin embargo, se observa un aumento significativo en los niveles de actividad en limitación de amonio con respecto a los niveles correspondientes en exceso de amonio, siendo ahora de un 66 % a un 76 % con respecto a los últimos. Cabe hacer notar que en el caso de las dos últimas cepas, no existen mutaciones en el operón gltBDF, y que los niveles de actividad de GOGAT no son afectados (Covarrubias, comunicación personal). Sin embargo, estas tres cepas mutantes exhiben los fenotipos  $Ntr^-$  y  $Gsd^-$ , lo cual impide que se lleve a cabo una asimilación de nitrógeno al haber limitación de amonio. El crecimiento de estas cepas en condiciones de limitación de amonio es muy pobre, y solamente se obtiene complementando el medio con glutamina en el caso de las cepas MX848 y MX902. Sin embargo, es posible que el aumento de actividad de la GDH en estas condiciones se dé como un medio para asimilar el poco amonio disponible en el medio. Las mutaciones en glnF y glnG, por un lado, y mutaciones en gltF por el otro dan lugar a los fenotipos  $Ntr^-$  y  $Gsd^-$ . Sin embargo, no se ha podido determinar si estos dos tipos de mutaciones ejercen su efecto de manera separada o están ligados por medio de un mecanismo común a ambos.

Los resultados presentados a lo largo de este trabajo en cuanto a la expresión de la GDH utilizando diversas fuentes de nitrógeno así como cepas mutantes y transformadas, permiten formular una hipótesis sobre el papel de la GDH en la asimilación

de nitrógeno en Escherichia coli K-12. Aparentemente, como se mencionó anteriormente, la GDH pudiera funcionar como una especie de modulador de los niveles de ciertos metabolitos en la célula básicamente en condiciones de limitación de nitrógeno. En esta condición, sobre todo al tratarse de fuentes fácilmente degradables para generar amonio intracelular, los niveles de la GDH aumentan. En este sentido se podría pensar en la GDH como una alternativa preferente sobre la vía GS-GOGAT debido a que esta última involucra dos enzimas y un gasto de energía dado su carácter ATP dependiente. En el caso de fuentes más drásticamente limitantes, se activa un sistema más complejo y versátil que incluye no solamente la activación de la GS, sino de toda una serie de genes y operones destinados a la utilización de los compuestos potencialmente degradables para generar nitrógeno.

En condiciones de exceso de amonio, la GDH podría funcionar como una vía más económica de asimilación de amonio, ya que no requiere de ATP, y en este caso es importante considerar el hecho de que su actividad pareciera no estar regulada por el sistema Ntr. En este sentido, pudiera funcionar como una vía paralela que no involucra la activación coordinada de un sistema tan complejo en condiciones donde la fuente de nitrógeno no es una limitante para el crecimiento de la célula.

Identificación del promotor funcional del gene *gdhA* y otras secuencias aledañas posiblemente involucradas en la regulación de este gene.

Las evidencias mostradas en la Sección C de la parte de Resultados indican que en las diversas condiciones ensayadas, la secuencia inicialmente denominada P3 (Valle et al., 1983) es el promotor funcional del gene *gdhA*. Con base en este hecho, se pudieron obtener una serie de mutaciones por medio de inserciones que permitieron efectuar una evaluación a priori en cuanto a su efecto sobre el sitio de inicio de transcripción del gene. Estas predicciones se basaron en lo reportado, en cuanto a la distancia y el tipo de nucleótido óptimos para un sitio de inicio de transcripción (Hawley y McClure, 1983). Los resultados obtenidos eliminan la posibilidad de que los tamaños de los transcritos identificados por medio de extensión de primero se debieran a un procesamiento de un mensajero de mayor tamaño, y confirman que P3 es el promotor funcional del gene *gdhA*.

El promotor funcional, localizado en las coordenadas -71\ -102, con respecto al sitio de inicio de traducción (Fig. 1), presenta varios aspectos de interés con respecto a la secuencia consenso reportada para promotores típicos en *Escherichia coli* (Hawley y McClure, 1983): la región -10 difiere en solo un

nucleótido de la secuencia consenso, si bien se trata de una de las posiciones más conservadas. La región -35, en cambio, difiere en 3 de los nucleótidos, aunque en este caso, no se trata de las posiciones más conservadas. Por otro lado, la distancia entre ambas regiones es de 19 pb, siendo 17 óptimo reportado para promotores fuertes. Estos dos últimos aspectos han sido considerados como característicos de promotores que requieren de un activador para el inicio de transcripción, tales como promotores reportados para los operones lac, ara y gal (de Crombrugge et al., 1984). En estos y otros casos de activación por el complejo CRP-AMPC, el sitio de unión a CRP varía en cuanto a su posición con respecto al promotor (-107 a -41 con respecto al sitio de inicio de transcripción). En el caso de ghdA se identificó un posible sitio de unión a CRP en la cadena no codificadora del DNA (coordenadas -84\ -101, Fig. 1). Sin embargo, en este caso, dicho sitio se encuentra sobrelapado a la región -35 del promotor funcional. Se ha reportado que si bien el papel principal del complejo CRP-AMPC es el de activar el inicio de la transcripción, puede también en algunos casos reprimirlo, como en el promotor denominado P2 de gal, y en los promotores de ompA y crp. En estos casos, al igual que en ghdA, el sitio de unión se encuentra sobrelapando al promotor funcional. Se ha propuesto que al estar sobrelapado a la región -35 de estos promotores, el complejo CRP-AMPC bloquea la interacción de esta región con la RNA polimerasa, inhibiendo, de esta manera, el inicio de la transcripción (de Crombrugge, 1984).

Datos preliminares no incluidos en esta tesis (Riba et al., sin publicar), sugieren que de tener algún papel en la regulación del gene gdhA, el complejo CRP-AMPC inhibe parcialmente la transcripción del gene. La actividad específica de la GDH se reduce a un 75% utilizando glicerol en lugar de glucosa como fuente de carbono en condiciones de exceso de amonio. Sin embargo, se ha reportado que el glicerol no relaja totalmente la represión catabólica ejercida por la glucosa, mientras que fuentes más limitantes de carbono, como el succinato, ejercen un efecto más completo (Magasanik y Neidhart, 1987). La actividad específica de la GDH utilizando succinato como fuente de carbono, es de un 50% con respecto a la obtenida con glucosa. Por otro lado, en los niveles de transcrito de gdhA (Fig. 3) se observa una ligera disminución en condiciones de crecimiento con glicerol con respecto a glucosa como fuentes de carbono. Estos datos, si bien no son concluyentes, sugieren que gdhA pudiera estar regulado por fuente de carbono. Este hecho no sería sorprendente, ya que como se mencionó en un principio, la reacción catalizada por la GDH se localiza en un punto de intersección de los metabolismos globales de asimilación de nitrógeno y carbono. De hecho, el 2-oxoglutarato, sustrato de la GDH, es por un lado, un intermediario del ciclo de ácidos tricarbónicos, donde genera equivalentes reductores, y, por otro, un factor determinante, junto con la glutamina, en la regulación global del sistema Ntr.

Los datos aportados en cuanto a la posible regulación negativa por el complejo CRP-AMPC parecen ser contradecir el hecho de que el promotor funcional de gdhA presenta características propias de un promotor que requiere de activación para el inicio de transcripción. Sin embargo, el posible sitio de unión a CRP no es la única secuencia que pudiera estar involucrada en la regulación de este gene. La presencia de una secuencia palindrómica y una secuencia tipo imagen especular imperfectas sobrelapando ambas al promotor, sugieren que pudiera darse otro tipo de regulación independiente al de la fuente de carbono. Si bien el que estas secuencias sobrelapen al promotor pudiera sugerir un mecanismo de bloqueo a la polimerasa similar al propuesto para el complejo CRP-AMPC, este tipo de secuencias han sido reportadas para genes involucrados en el sistema Ntr (argTr y la región dhuA en Salmonella typhimurium). En ambos casos se trata de genes que presentan activación de la transcripción en condiciones de limitación de nitrógeno. Por otro lado, también se identificaron pares de secuencias repetidas directas a lo largo de la región flanqueadora 5' del gene. Este tipo de secuencias es exclusivo de esta región, no habiéndose encontrado en el gene estructural, lo cual sugiere que pudieran asimismo tener un papel en la regulación del gene. De esta manera, se podría especular sobre el papel de diferentes efectores sobre la regulación de este gene.



Los datos presentados a lo largo de esta tesis sugieren que si bien el gene gdhA parece no estar regulado como parte integral del sistema Ntr en Escherichia coli K-12, tampoco carece de regulación como ha sido reportado por algunos autores en la literatura. Los resultados de actividades específicas, así como el análisis de la región flanqueadora 5' del gene sugieren que la regulación de este gene pudiera estar dada por más de un efector. Es probable que dicha regulación forme parte de más de un metabolismo global, en principio el de nitrógeno y el de carbono, dado que como se mencionó anteriormente, su actividad está asociada con la interconversión de 2-oxoglutarato en glutamato, siendo estos metabolitos protagonistas importantes en ambas redes de regulación global.

## PERSPECTIVAS

Las perspectivas de este proyecto están encaminadas a la identificación y caracterización de mutantes en la región flanqueadora 5' del gene gdhA que puedan contribuir a dilucidar su o sus mecanismos de regulación a nivel transcripcional. Así mismo se contempla la incorporación de estas mutaciones obtenidas en plásmidos, al cromosoma bacteriano.

Con el objeto de aislar los fenómenos inherentes a la regulación transcripcional de este gene, se llevó a cabo una construcción en plásmido en la cual se utilizó la región flanqueadora 5' del gene gdhA incluyendo el sitio de unión a ribosoma como región regulatoria de los genes estructurales del operón lac. Esta fusión permite utilizar al sustrato cromogénico de la B-galactosidasa conocido como X-gal para detectar la expresión de esta enzima en función de la región de control de gdhA.

Una vez obtenida la fusión, con la colaboración del Dr. Luis Servín González, se montó la técnica de mutagénesis al azar de la región regulatoria 5' del gene. Posteriormente, dicha región mutagenizada fué asimismo fusionada a los genes estructurales del operón lac, y los plásmidos resultantes fueron transformados en la cepa HB101 (lacY1). Actualmente, se tienen alrededor de 500 colonias transformantes, muchas de las cuales exhiben expresión

alterada reflejada en la actividad de la B-galactosidasa. Un análisis de estas colonias permitirá la identificación y caracterización de mutaciones de interés en la región de control del gene gdhA.

## BIBLIOGRAFIA ADICIONAL

Castañó, I., Bastarrachea, F. and Covarrubias, A.A. 1988. The gltBDF operon of Escherichia coli. Submitted to J. Bacteriol.

Covarrubias, A.A. Comunicación personal. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos.

Sales, M. and Brenchley, J.E. 1982. The regulation of the ammonia assimilatory enzymes in Rel<sup>+</sup> and Rel<sup>-</sup> strains of Salmonella typhimurium. Mol. Gen. Genet. 186:263-268.