

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional  
y de Postgrado del Colegio de Ciencias  
y Humanidades

Organización Estructural y Regulación del Operón  
*glbDF* de *Escherichia coli* K-12

T E S I S

que para optar por el grado de  
Doctor en Investigación Biomédica Básica  
p r e s e n t a

IRENE BEATRIZ CASTAÑO NAVARRO

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno

1990

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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

## INTRODUCCION

Las enterobacterias son capaces de crecer en medio mínimo adicionado de una fuente de nitrógeno, y una de carbono; existe una gran variedad de compuestos orgánicos que pueden utilizarse como fuente de carbono (y de energía), así como varios compuestos orgánicos o inorgánicos nitrogenados que pueden servir como fuente de nitrógeno. La fuente de carbono preferida por *Escherichia coli* es la glucosa, y de nitrógeno es el amonio, puesto que es en estos compuestos en los que se observa la mayor velocidad de crecimiento. Las enzimas encargadas de asimilar el amonio son principalmente la glutamino sintetasa (GS), la glutamato deshidrogenasa (GDH), y la glutamato sintasa (GOGAT). La GS sintetiza glutamina a partir de glutamato y amonio para lo cual consume una molécula de ATP; las otras dos enzimas producen glutamato, la GDH lo hace a partir de  $\alpha$ -cetoglutarato y amonio con el consumo de una molécula de NADPH; la enzima GOGAT sintetiza glutamato a partir de glutamina y  $\alpha$ -cetoglutarato y también oxida una molécula de NADPH. Las actividades de GS y GOGAT resultan en la incorporación del amonio del medio en glutamato y glutamina. La glutamina a su vez se utiliza en la célula para la biosíntesis de nucleótidos, aminoazúcares, histidina, triptofano y asparagina; y el glutamato es el donador de su grupo amino para la biosíntesis del resto de los aminoácidos y del nitrógeno orgánico celular en general.

Cuando la concentración de amonio en el medio es alta (mayor de 1mM), éste se incorpora directamente en glutamato, glutamina y asparagina; sin embargo, si la concentración de amonio es menor de 0.1mM, la única enzima que puede incorporarlo es la GS puesto que tiene una alta afinidad por este compuesto. Así mismo, cuando no hay amonio en el medio, éste debe obtenerse por catabolismo de compuestos nitrogenados celulares como aminoácidos o urea; el crecimiento en estas fuentes alternativas de nitrógeno siempre es más lento por lo que se dice que éstos cultivos están limitados de nitrógeno. En condiciones de limitación de nitrógeno, la síntesis de GS está muy inducida, el mismo sistema que regula su transcripción, también controla la síntesis de las enzimas catabólicas y sistemas de transporte de estas fuentes limitantes de nitrógeno. A estos sistemas cuya síntesis se induce por limitación de nitrógeno, se les denomina Ntr. La síntesis de GS por

ejemplo, y muchas otras enzimas están sujetas a un control que depende de la accesibilidad de nitrógeno, lo que las identifica como miembros del regulón global regulado por nitrógeno (Ntr). En *Klebsiella aerogenes* (10, 33, 51), se ha demostrado que en condiciones limitantes de nitrógeno, las enzimas responsables de la asimilación de amonio son GS y GOGAT, cuya acción concertada resulta en la síntesis neta de glutamato; este dato llevó a proponer que el papel de GOGAT era la asimilación de nitrógeno en condiciones de limitación de éste; en condiciones de exceso, la GDH sintetiza el glutamato ya que la síntesis de GOGAT se encuentra reprimida. Estos experimentos realizados en *Escherichia coli* no han arrojado los mismos resultados; es decir, si bien la enzima GS sí está sujeta a control por nitrógeno (Ntr), tanto la GOGAT como la GDH se sintetizan a altos niveles independientemente de la accesibilidad de nitrógeno, es decir, estas dos enzimas no se comportan como miembros del regulón Ntr.

En *E. coli* y otras enterobacterias, mutaciones que se encuentran en el gen estructural de GS (*glnA*) resultan en auxotrofia por glutamina, ya que es la única enzima celular que la sintetiza (5, 30). La enzima GDH es totalmente dispensable; cepas que llevan mutaciones en el gen estructural (*gdhA*), no tienen fenotipo detectable ya que en este caso la síntesis de glutamato la lleva a cabo GOGAT (59). En el caso de cepas que contienen mutaciones en los genes estructurales de GOGAT (42), presentan 3 fenotipos: pérdida de actividad enzimática de GOGAT, incapacidad de desreprimir la síntesis de GS por crecimiento en glutamina como fuente de nitrógeno (fenotipo Gsd'), e incapacidad de utilizar fuentes alternativas (limitantes) de nitrógeno, como son arginina, prolina, serina, etc. cuyos productos de degradación son glutamato o amonio (fenotipo Ntr'). La razón por la cual estas mutaciones en la región *glt* causan los fenotipos Gsd' y Ntr' no se ha establecido con claridad. Así pues en *E. coli* y otras bacterias que posean ambas enzimas que biosintetizan glutamato, solamente son auxótrofas de este aminoácido cuando pierden por mutación tanto la actividad de GDH como de GOGAT.

#### Generalidades de las enzimas GS y GOGAT

La GS es una enzima de aproximadamente 600 000d de peso molecular (PM) compuesta por 12 subunidades iguales que tienen un PM de 50 000d cada una. Tanto la actividad enzimática como la síntesis de la proteína, están sujetas a un control muy

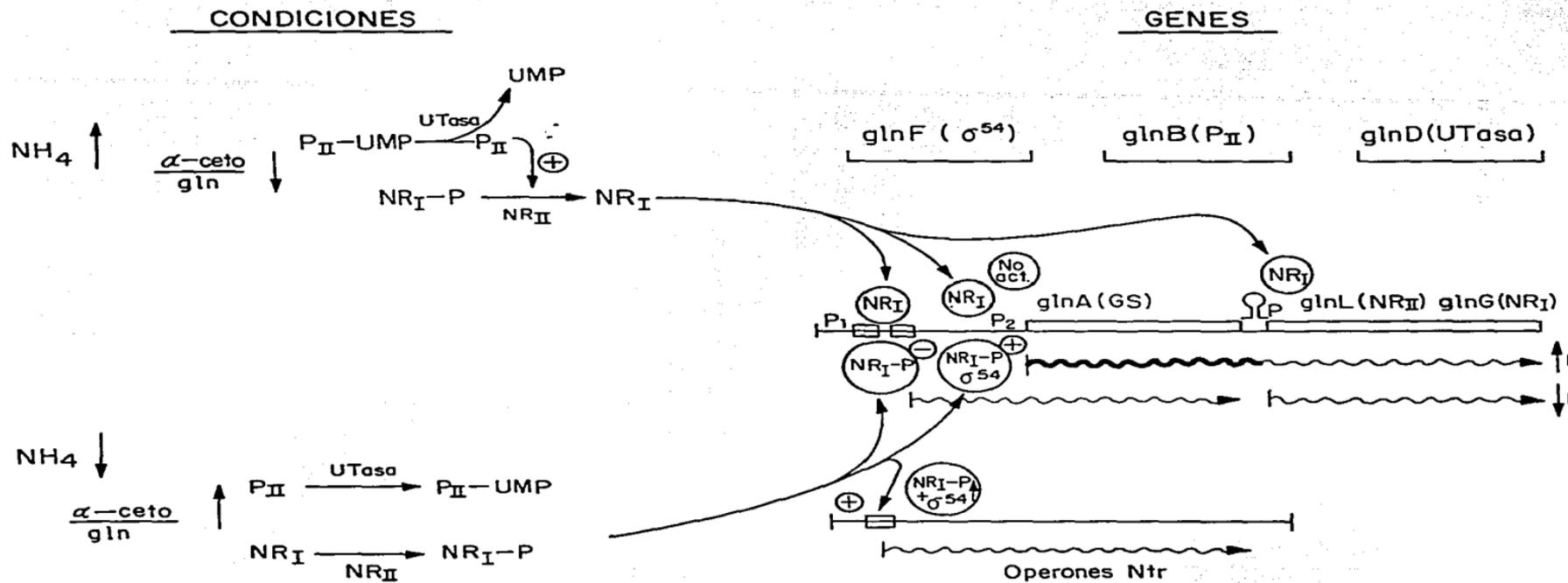
riguroso. Un primer mecanismo de control está dado por inhibición acumulativa de la actividad enzimática por algunos productos del metabolismo de la glutamina (23). Tal vez el mecanismo más importante de regulación de la actividad de GS, es la adenilación reversible de un grupo tirosilo de cada subunidad de la GS. Este mecanismo responde a la disponibilidad de nitrógeno en el medio y la enzima va perdiendo actividad a medida que aumenta su grado de adenilación (23, 29, 51). El sistema enzimático que cataliza la adenilación y desadenilación de GS es bastante complejo y también interviene en la regulación a nivel de transcripción no sólo de GS, sino de las demás enzimas sujetas a control por Ntr, y a esto me referiré más adelante.

La enzima GOGAT (glutamina-amida-2-oxoglutarato aminotransferasa oxidorrreductasa, NADP) de *Escherichia coli* es una flavoproteína que contiene hierro y azufre; tiene un PM de 800 000d y está compuesta por 4 dímeros activos catalíticamente y cada uno formado a su vez por 2 subunidades de diferente PM: la subunidad pesada tiene un PM de 166 000d aproximadamente (39) y la ligera de 53 000d (39, 35); la enzima tiene una alta afinidad por sus sustratos, las Km aparentes son 7.7  $\mu$ M por NADPH, 7.3  $\mu$ M para  $\alpha$ -cetoglutarato, y 250  $\mu$ M para glutamina (35). Se ha descrito que la subunidad pesada tiene el sitio de unión a glutamina y que tiene actividad residual de glutaminasa (31); por otro lado se sabe que la subunidad ligera tiene una actividad muy pequeña (aproximadamente 5% de la actividad con glutamina) de síntesis de glutamato en presencia de amonio; y aparentemente, esta subunidad es capaz de unir  $\alpha$ -cetoglutarato (35, 49).

#### Organización física de los genes que codifican para las enzimas GS y GOGAT

##### Operón *glnALG*

El gen estructural de la enzima glutamino sintetasa (*glnA*) se encuentra situado en el mín 86 del mapa cromosómico de *E.coli* y se encuentra formando un operón complejo (40) con los genes *glnL* y *glnG* que codifican para las proteínas NR<sub>II</sub> y NR<sub>I</sub> respectivamente (ver esquema 1). La región reguladora de *glnA* posee dos promotores de los cuales el más cercano al gen estructural (*glnAp2*) está sujeto a control por Ntr; para lo cual requiere de una subunidad  $\sigma$  específica para genes regulados por nitrógeno ( $\sigma^{54}$ ), que es el producto del gen *glnF* (que no se encuentra ligado en el mapa cromosómico), así como de la proteína NR<sub>I</sub> activada por fosforilación (ver más adelante), que forma parte del mismo operón. El promotor lejano al gen *glnA* (*glnAp1*) se transcribe en presencia de RNA polimerasa



ESQUEMA 1: REGULACION GENERAL DE LA TRANSCRIPCION DEL OPERON GLN<sub>ALG</sub> Y LOS OPERONES NTR

asociada al factor  $\sigma^{70}$  comunmente utilizado por los promotores de *E.coli* y además se reprime por  $NR_1$ . Existe además otro promotor (*glnLp*) en este operón que se encuentra entre los genes *glnA* y *glnL* que también se reprime por la proteína  $NR_1$ . El producto de *glnL* ( $NR_{II}$ ) es una cinasa de proteínas que cataliza la modificación covalente, reversible, por fosforilación (dependiente de ATP) de la proteína  $NR_1$  (producto de *glnG*) (37). En condiciones de limitación de nitrógeno, la síntesis de GS se desreprime, y resulta en alta actividad enzimática porque la enzima se encuentra desadenilada completamente. En estas condiciones el transcrito de *glnA* se inicia en el promotor más fuerte del operón que es *glnAp2*. Para esto se requiere la RNA polimerasa asociada a  $\sigma^{54}$  y la proteína  $NR_1$  fosforilada por  $NR_{II}$ ; este transcrito puede continuarse hasta el último gen del operón que es *glnG* y de esta forma es cuando mayores cantidades intracelulares de  $NR_1$  se encuentran (47, 48) (ver esquema 1). Cuando la cantidad de amonio extracelular es elevada, la GS ya presente en la célula se inactiva por adenilación de cada una de sus subunidades y la transcripción de *glnA* iniciada en *glnAp2* se reprime porque la cinasa ( $NR_{II}$ ), cataliza la desfosforilación de  $NR_1$  que es esencial para la transcripción a partir de éste promotor; y ahora el transcrito se inicia en el promotor más débil *glnAp1*. En este caso los niveles intracelulares de  $NR_1$  son muy bajos y, principalmente, se sintetizan a partir del promotor *glnLp* (46, 47, 48, 54). Estos niveles bajos de  $NR_1$  son suficientes para activar la síntesis de *glnA* a partir de *glnAp2* si las condiciones de amonio se vuelven limitantes; esto se debe a que existen en la región de control dos sitios de alta afinidad de unión a  $NR_1$ ; sin embargo, estos niveles de  $NR_1$  no son suficientes para activar la transcripción de los operones catabólicos sujetos a control por Ntr (40, 41, 48, 54), solamente cuando la transcripción se inicia en el promotor fuerte, *glnAp2*, se alcanzan las concentraciones intracelulares suficientes de  $NR_1$  para activar, junto con la RNA polimerasa que lleva el factor  $\sigma^{54}$ , los sistemas Ntr; esto probablemente se debe a que el resto de los operones Ntr, no tienen más que un sitio de unión a  $NR_1$  en sus regiones de control. Como se mencionó anteriormente, se requiere de la fosforilación de  $NR_1$  por  $NR_{II}$  para que  $NR_1$  fosforilado ( $NR_1$ -P) pueda activar la transcripción de los promotores sujetos a control por Ntr, así como el de *glnA* (30, 36, 37, 48).

Operon *gltBD*

Los genes que codifican para la enzima GOGAT de *Escherichia coli* ya se han clonado (16) y están contenidos en un fragmento de DNA cromosomal de 8.55 Kb que codifica para las dos subunidades, por lo que se sabe que se encuentran muy ligados (22). En *Salmonella typhimurium* se identificaron los genes que codifican para la subunidad pesada y para la ligera y se les denominó *gltB* y *gltD* respectivamente, y aparentemente se encuentran formando un operón en el min 69 del mapa cromosómico (27). Por analogía con los genes de *Salmonella typhimurium* también a los genes de *E.coli* se les denominó *gltB* y *gltD*. Estudios realizados con los genes clonados de *E.coli* han revelado que ambos genes se transcriben en el mismo sentido desde *gltB* hacia *gltD* (análogo a lo descrito para *S. typhimurium*), y se sugirió que probablemente existe un promotor entre ambos genes ya que plásmidos en los que se tiene subclonado el gen *gltD* en cualquier orientación con respecto al vehículo, dirigen la síntesis de la proteína en un sistema de minicélulas (22).

En *Bacillus subtilis*, los genes que codifican para las subunidades pesada (*gltA*), y ligera (*gltB*), de GOGAT ya se han clonado (6, 7), y se encuentran separados en el genoma; también se describió que la transcripción de éstos genes se regula por la fuente de nitrógeno utilizada durante el crecimiento: la mayor expresión se obtiene en cultivos hechos en amonio, existe una expresión intermedia cuando la fuente de nitrógeno es glutamina, y finalmente los genes se encuentran reprimidos por crecimiento en glutamato. Se sabe que el gen *gltA* se encuentra contiguo al gen *gltC* el cual se transcribe de forma divergente con respecto a *gltA*, y es un regulador positivo de la transcripción de este último; además el producto de *gltC* reprime su propia síntesis.

Tanto en *Escherichia coli* (42) como en *Klebsiella aerogenes* (10), y en *Salmonella typhimurium* (17, 20, 27) se han descrito mutaciones que afectan la síntesis de GOGAT y que simultáneamente confieren un fenotipo anteriormente denominado *Asm<sup>-</sup>* que significa incapacidad de crecer en fuentes limitantes de nitrógeno como son arginina (fenotipo *Aur<sup>-</sup>*), prolina (fenotipo *Put<sup>-</sup>*), histidina en el caso de *K. aerogenes* (fenotipo *Hut<sup>-</sup>*) etc. Actualmente a este fenotipo se le conoce como *Ntr<sup>-</sup>* que se refiere a la incapacidad de regular adecuadamente la inducción de los sistemas catabólicos de utilización de fuentes limitantes de nitrógeno. Como se mencionó anteriormente, además del fenotipo *Ntr<sup>-</sup>* característico de cepas mutantes en la región *glt*, existe otro fenotipo asociado: *Gsd<sup>-</sup>* que se refiere a la incapacidad de desreprimir la síntesis de GS por crecimiento en glutamina como fuente de

nitrógeno. La glutamina se considera una fuente limitante porque cultivos de cepas silvestres hechos en este aminoácido como única fuente de nitrógeno, produce una inducción de GS y de las demás enzimas sujetas a control por nitrógeno, independientemente de que permita un crecimiento casi tan rápido como el amonio (10, 29). El fenotipo Gsd<sup>r</sup> que confieren las mutaciones en la región *glt* se ha explicado suponiendo que en cepas que no presentan actividad de GOGAT, se acumularía glutamina intracelular, lo que resultaría en represión del operón *glnALG* y por lo tanto no existiría inducción de GS (29).

También se ha reportado (42) que algunas supresoras del fenotipo Ntr<sup>r</sup> de mutantes en región *glt*, se localizan en el gen *glnL* que además ocasionan una síntesis elevada de GS independientemente de la fuente de nitrógeno utilizada. Esto sugiere una relación entre los sistemas de control de GS y de GOGAT aunque no se refleje en una síntesis coordinada de ambas enzimas en las condiciones de crecimiento descritas.

Con respecto a la regulación de la síntesis de GOGAT de *Escherichia coli*, no se han hecho suficientes estudios, pero ya se ha descrito (9, 10, 51) que se reprime por cultivo en glutamato como fuente de nitrógeno, pero no se altera por crecimiento en ninguna otra fuente limitante. Aparentemente existe un activador de la síntesis de GOGAT que está ligado al operón *gltBDF* (I. Castaño Tesis de Maestría); y por datos recientes que se presentarán en la sección de Resultados Adicionales, aparentemente existe también un represor de éste operón.

#### Transducción de la señal de nitrógeno en el medio.

El estudio genético de las respuestas adaptativas celulares a variaciones en el medio que las rodea, como cambios en osmolaridad, quimiotaxis, accesibilidad de nitrógeno etc., se ha mostrado que las respuestas están mediadas por sistemas de dos componentes (1, 30, 50, 53): el primero es generalmente una cinasa de proteínas que se fosforila en un residuo de histidina, y el segundo es un regulador asociado, que media la respuesta, generalmente por activación, de la transcripción de los genes involucrados en la misma. La transducción de la señal ocurre cuando el grupo fosforilo del ATP se transfiere al residuo de histidina de la cinasa (que generalmente es un sensor), y posteriormente, del grupo fosfohistidina se transmite a un residuo de ácido aspártico en el regulador. Por estudio de la secuencia de aminoácidos tanto de los sensores como de los reguladores clonados (alrededor de 20 en

procariotes), se sabe que existe una alta homología entre cada uno de los dos componentes de un sistema específico (1, 53); aparentemente, durante la evolución de los procariotes, se seleccionaron sistemas regulatorios de dos componentes para detectar cambios en el medio y transmitir la información al aparato transcripcional. En general, las regiones carboxilo-terminal de los sensores son homólogas entre sí, y generalmente son proteínas transmembranales. Una excepción a esto, interesantemente es el sensor del regulón Ntr: la proteína NR<sub>II</sub>, que se encuentra en citoplasma; también uno de los sensores del sistema regulatorio de la quimiotaxis, el producto de *cheA*, es citoplásmico. Los reguladores por lo general, presentan una región conservada en la región amino-terminal, y otra en la zona carboxilo-terminal, donde suele encontrarse la estructura hélice-vuelta-hélice característica de proteínas regulatorias que se unen a DNA.

El sensor recibe directamente la señal del medio, o bien la recibe otra molécula y se genera otra señal que puede detectar el sensor del sistema, esto es, en algunos casos la cinasa no es el sensor directo, aunque en general sí son las cinasas las que funcionan como receptores membranales que detectan los cambios en el medio. Si bien se ha llamado sistemas de dos componentes, esto es una simplificación, puesto que en general, los sistemas contienen componentes adicionales de transmisión de la señal y en algunos casos hay más de un sensor y/o más de un regulador.

Para el caso del regulón global de nitrógeno, en el cual los operones forman parte de él están controlados por reguladores comunes, también se sabe que muchos de ellos están sujetos a controles particulares independientemente de Ntr.

La expresión de los operones Ntr depende en forma absoluta de solamente 2 reguladores: 1) el producto del gen *glnF* que codifica para la subunidad  $\sigma^{54}$  de la RNA polimerasa, cuya presencia es indispensable para el reconocimiento de los promotores sujetos a control por la accesibilidad de nitrógeno. (ver esquema 1); y 2) el producto del gen *glnG* (proteína NR<sub>I</sub>) que se une a DNA. Es necesario tener una concentración intracelular elevada de esta proteína para que haya inducción de todos los operones Ntr, excepto el caso del promotor *glnAp2* que al tener dos sitios de alta afinidad por NR<sub>II</sub>, se induce aún en bajas concentraciones relativas de esta proteína.

Otro regulador importante, aunque no indispensable para la regulación de la transcripción de *glnA* y los demás operones Ntr, es el producto del gen *glnL* (NR<sub>II</sub>) (3, 11). Esta

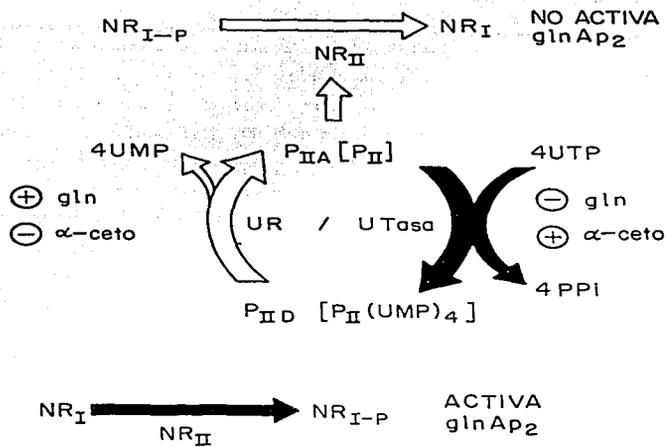
proteína es una cinasa que cataliza la fosforilación y desfosforilación de  $NR_1$ .  $NR_1$  fosforilado ( $NR_1-P$ ), es la forma activa de  $NR_1$  para estimular la transcripción de *glnAp2* (37),  $NR_1$  no fosforilado es incapaz de iniciar la transcripción de *glnAp2* (ver esquema 1). El mecanismo de fosforilación es igual al descrito para la cinasa del sistema de quimiotaxis, y se ha demostrado que ambas cinasas pueden fosforilar, aunque con mucho menor eficiencia, a los reguladores de los sistemas heterólogos (36).

$NR_{II}$  no se requiere para la activación de la transcripción a partir de *glnAp2 in vivo*, y de hecho, mutaciones en *glnL* no afectan los niveles de expresión de GS es decir, ésta enzima se reprime y desreprime casi igual que la silvestre (los niveles de GS son dos veces mayores en cepas que llevan una delección del gen *glnL* solamente en condiciones de exceso de amonio), aunque esta respuesta adaptativa se realiza a menor velocidad. Estos estudios indican que existe un mecanismo independiente capaz de regular por fosforilación, estos sistemas; y que en células silvestres bajo ciertas condiciones, la cinasa principal del sistema es  $NR_{II}$  (53). De esta forma,  $NR_{II}$  es una cinasa que actúa tanto como regulador positivo como negativo de la transcripción de *glnAp2* (37) ya que controla el grado de fosforilación de  $NR_1$  a través de catalizar tanto la fosforilación como la desfosforilación de  $NR_1$ .

En cultivos limitados de nitrógeno, la inducción del operón *glnALG* resulta en 2 efectos importantes; por una parte, la inducción de GS para poder utilizar bajas concentraciones de amonio, y por otra, incrementar las concentraciones intracelulares de  $NR_1$ , lo cual es indispensable para la inducción de los demás operones sujetos a control por  $Ntr$  (ver esquemas 1 y 2).

La actividad de  $NR_{II}$  está modulada a su vez por todo un sistema que involucra una cascada de transmisión de información en el que aparentemente el balance entre el metabolismo de carbono y nitrógeno es la señal crítica; este balance se refleja en la relación de la concentración intracelular de glutamina y  $\alpha$ -cetoglutarato (51, 53). Esta relación controla la actividad de una enzima: Uridiltransferasa (Utasa) (que es el producto del gen *glnD*), que cataliza la uridilación y desuridilación de otra proteína regulatoria ( $P_{II}$ ) (que es el producto del gen *glnB*) (4, 11, 21, 29) (ver esquema 2). Las actividades enzimáticas de uridilación y desuridilación de la Utasa, responden diferencialmente a la presencia de  $\alpha$ -cetoglutarato y glutamina:  $\alpha$ -cetoglutarato estimula la uridilación de  $P_{II}$ , y la

ESQUEMA 2: Sistema de la uridilación-desuridilación de la proteína P<sub>II</sub>



glutamina estimula la desuridilación; de esta manera, cuando las condiciones de crecimiento no están limitadas de nitrógeno, la relación de  $\alpha$ -cetoglutarato a glutamina es relativamente baja y  $P_{II}$  está predominantemente sin uridilarse; y cuando la relación de  $\alpha$ -cetoglutarato a glutamina es elevada por limitación de nitrógeno, la proteína  $P_{II}$  tiende a estar uridilada. Por una parte, la relación de  $P_{II}$  a  $P_{II}$ -UMP, controla la adenilación de GS por la enzima Adeniltransferasa (Atasa), que se estimula por  $P_{II}$  no modificada para la reacción de adenilación (11, 19, 21).  $P_{II}$  también actúa en la regulación de la transcripción del operón *glnALG* (11) de la siguiente manera:  $P_{II}$  no modificada tiene un efecto negativo en la transcripción del promotor controlado por nitrógeno de *glnA* (*glnAp2*), mientras que la forma uridilada de  $P_{II}$  parece ser inocua para este efecto. La evidencia genética indica que la proteína  $P_{II}$  no modificada, actúa a través de controlar la actividad de  $NR_{II}$  (3, 11, 15). La regulación negativa se debe a que  $P_{II}$  estimula la desfosforilación de  $NR_{I-P}$  por  $NR_{II}$ . En experimentos *in vitro* cuando se añade  $P_{II}$  a mezclas que contienen  $NR_{I-P}$  y  $NR_{II}$  se observa una rápida desfosforilación de  $NR_{I-P}$  dependiente de ATP (24, 37), para lo cual es esencial la presencia de  $NR_{II}$ . Por último, la activación de la transcripción de *glnAp2* requiere de  $NR_I$ , ya sea que esté o no  $NR_{II}$  (3, 11), por lo que parece probable que otras cinasas donen sus grupos fosforilo a  $NR_I$ .

La RNA polimerasa de *Escherichia coli* asociada al factor  $\sigma^{54}$  se asocia al promotor *glnAp2* en ausencia de otros factores, y resulta en la formación de un complejo cerrado de transcripción (38); cuando la polimerasa y la región del promotor se incuban junto con  $NR_I$ ,  $NR_{II}$  y ATP, se obtienen complejos estables que aparentemente es el complejo abierto de iniciación de la transcripción (38, 43); todos estos datos indican que el papel de  $NR_{I-P}$  es estimular la transición del complejo cerrado al complejo abierto.

Como se mencionó anteriormente, se han descrito sitios de alta afinidad de unión a  $NR_I$  en las regiones regulatorias de varios operones regulados por Ntr, que funcionan como "aumentadores" (enhancers) bacterianos, es decir que su efecto estimulador puede observarse a distancia de los promotores sobre los que actúan (48). Se ha propuesto un modelo en el que  $NR_{I-P}$  unido a su sitio en el DNA hace contacto directo con la RNA polimerasa que lleva el factor  $\sigma^{54}$ , para lo cual se requiere que haya un doblamiento del DNA, ya que puede existir una distancia relativamente grande entre los sitios de unión a  $NR_{I-P}$  y el promotor (43).  $NR_{I-P}$  solamente activa los promotores que utilizan la RNA polimerasa

asociada a  $\sigma^{54}$  por lo que es posible que haya una estructura asociada a esta forma de la RNA polimerasa que sea la que reconoce NR<sub>1</sub>-P (53).

En resumen, existen varias enzimas celulares que estan sujetas a control por el sistema global Ntr. Los reguladores últimos de la respuesta a la accesibilidad de nitrógeno, son los productos de *glnF* ( $\sigma^{54}$ ), *glnL* y *glnG* (NR<sub>n</sub> y NR<sub>1</sub>), donde la cinasa es NR<sub>n</sub> y el regulador es NR<sub>1</sub>. La actividad de NR<sub>n</sub> está modulada por otra proteína (P<sub>n</sub>) que a su vez responde (a través de la actividad enzimática de otra proteína: Uta<sub>s</sub>), a las concentraciones intracelulares de  $\alpha$ -cetoglutarato y glutamina que reflejan el estado del metabolismo celular de carbono y nitrógeno. Dado que la ausencia (por delección) de la proteína NR<sub>n</sub> no ocasiona fenotipo Ntr<sup>-</sup> y presenta desrepresión normal, aunque más lenta de la síntesis de GS, debe haber otra proteína con actividad de cinasa que sustituya eficientemente a NR<sub>n</sub> para la inducción de los sistemas Ntr. La hipótesis de que hay al menos otra proteína que actúe sobre NR<sub>1</sub> para activar los sistemas Ntr, también se ve apoyada por el hecho de que existen mutaciones que se localizan en región *glt* que ocasionan fenotipo Ntr<sup>-</sup>; esto pudiera deberse a que para que este sistema de transducción de señales general, funcione adecuadamente requiera de un sensor o cinasa diferente a NR<sub>n</sub>, y/o de otras moléculas moduladoras.

## ANTECEDENTES

En el laboratorio estamos interesados en el metabolismo nitrogenado de *Escherichia coli*, en particular en la regulación de la síntesis de la enzima GOGAT y la relación que tiene con el control de los sistemas regulados por nitrógeno (Ntr).

Nuestro interés por la organización estructural del operón que codifica para esta enzima, surgió a partir de la construcción de una cepa que lleva una mutación por inserción del fragmento  $\Omega$  en el gen *gltB*. La caracterización de esta cepa mostró que no presentaba actividad detectable de GOGAT, que era incapaz de crecer en arginina como única fuente de nitrógeno (fenotipo Ntr<sup>-</sup>), y no desreprimía la síntesis de la enzima GS por crecimiento en limitación de nitrógeno (fenotipo Gsd<sup>-</sup>); al complementarla con un plásmido que lleva el gen *gltB*<sup>+</sup> se recuperó aproximadamente la mitad de la actividad de GOGAT de la cepa silvestre, sin embargo conservaba el fenotipo Ntr<sup>-</sup> (I. Castaño, Tesis de Maestría). Este dato sugirió que el fenotipo Ntr<sup>-</sup> no se debe a acumulación intracelular de glutamina ni a la ausencia de la actividad enzimática de GOGAT; y planteó la posibilidad de la existencia de un tercer gen hacia abajo de *gltD*, sobre el cual fuera polar la inserción del fragmento  $\Omega$  insertado en *gltB*. Este tercer gen del operón *glt* estaría involucrado en la regulación de los sistemas Ntr.

El único plásmido que complementó a la cepa que lleva el alelo *gltB225::\Omega* fue el aislado originalmente, pRSP21, que contiene clonado un fragmento de DNA cromosomal de 8.55 Kb que abarca todo el operón de GOGAT, la cepa entonces presentó alta actividad de GOGAT (debido a que el plásmido está en multicopia), fue capaz de crecer en arginina como única fuente de nitrógeno (fenotipo Ntr<sup>+</sup>), y fue capaz de desreprimir la síntesis de la enzima GS por crecimiento en una fuente de nitrógeno limitante (fenotipo Gsd<sup>+</sup>).

Este dato apoyó la hipótesis de que en el plásmido pRSP21 se encuentran clonados todos los genes necesarios para complementar todos los fenotipos ocasionados por el alelo *gltB225::\Omega*

## OBJETIVOS

Tomando en cuenta los datos mencionados en la sección anterior, se planteó la hipótesis de que los genes que codifican para la enzima GOGAT se encuentran formando un operón con un tercer gen de carácter regulatorio necesario para la inducción de los sistemas Ntr. El objetivo general del trabajo es conocer la organización estructural y fisiológica del operón propuesto, así como su participación en la regulación de los sistemas Ntr.

Los objetivos particulares son:

1. Demostrar la existencia de un gen cuya expresión es necesaria para la inducción de los sistemas Ntr.
2. Demostrar que los genes que codifican para la enzima GOGAT se encuentran formando un operón con el tercer gen involucrado con la regulación Ntr.
3. Aislar mutaciones en el gen regulatorio y caracterizar su fenotipo.
4. Aislar y caracterizar mutaciones en el gen *gluD*.

## RESULTADOS

## *gltBDF* Operon of *Escherichia coli*

IRENE CASTAÑO,<sup>1</sup> FERNANDO BASTARRACHEA,<sup>2</sup> AND ALEJANDRA A. COVARRUBIAS<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca Morelos México,<sup>2</sup> and Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México 04510<sup>2</sup>

Received 15 June 1987/Accepted 26 October 1987

A 2.0-kilobase DNA fragment carrying antibiotic resistance markers was inserted into the *gltB* gene of *Escherichia coli* previously cloned in a multicopy plasmid. Replacement of the chromosomal *gltB*<sup>+</sup> gene by the *gltB225::Ω* mutation led to cells unable to synthesize glutamate synthase, utilize growth rate-limiting nitrogen sources, or derepress their glutamine synthetase. The existence of a *gltBDF* operon encoding the large (*gltB*) and small (*gltD*) subunits of glutamate synthase and a regulatory peptide (*gltF*) at 69 min of the *E. coli* linkage map was deduced from complementation analysis. A plasmid carrying the entire *gltB*<sup>+</sup>*D*<sup>+</sup>*F*<sup>+</sup> operon complemented cells for all three of the mutant phenotypes associated with the polar *gltB225::Ω* mutation in the chromosome. By contrast, plasmids carrying *gltB*<sup>+</sup> only complemented cells for glutamate synthase activity. A major ribonucleic mRNA molecule was detected from Northern (RNA blot) DNA-RNA hybridization experiments with DNA probes containing single genes of the operon. A 30,200-dalton polypeptide was identified as the *gltF* product, the lack of which was responsible for the inability of cells to use nitrogen-limiting sources associated with *gltB225::Ω*.

In many microorganisms undergoing nitrogen limitation, the concerted action of two enzymes, glutamine synthetase (EC 6.3.1.2) and glutamate synthase (EC 2.6.1.53), leads to net synthesis of L-glutamate from α-ketoglutarate and ammonia. In enteric bacteria, another enzyme, glutamate dehydrogenase (EC 1.1.1.1) also functions in the biosynthesis of L-glutamate by catalyzing the reductive amination of α-ketoglutarate with ammonia. Loss of both glutamate dehydrogenase and glutamate synthase, but not either enzyme alone, renders the cells auxotrophic for glutamate (4).

Glutamate synthase of *Escherichia coli* catalyzes the formation of two glutamate molecules from glutamine and α-ketoglutarate. The *E. coli* enzyme is composed of four dimers, each dimer consisting of two different subunits with molecular masses of 135 and 53 kilodaltons (20a, 24). In *Salmonella typhimurium*, the structural genes for the large and small glutamate synthase subunits have been termed *gltB* and *gltD*, respectively; both genes are contiguous and probably form an operon at 69 min of the linkage map (18). In *E. coli*, two genes, apparently analogous to and having the same genetic organization as *gltB* and *gltD* of *S. typhimurium* have been cloned (12, 17). *gltB* mutations affecting biosynthesis of glutamate synthase in *E. coli* simultaneously impose the Ntr<sup>-</sup> phenotype (26) on the cells, i.e., the inability to utilize substrates such as arginine or proline, whose degradation yields either NH<sub>4</sub><sup>+</sup> or glutamate. *gltB* cells also display the Gsd<sup>-</sup> phenotype, which is the inability of the cells to derepress glutamine synthetase when they are cultured on glutamine, an N-limiting amino acid that supports sustained growth (8, 19). A relationship between glutamate synthase biosynthesis and the Ntr network is further suggested by the finding that the Ntr<sup>-</sup> phenotype of *gltB* mutants can be suppressed by mutations in *glnL* (*ntrB*) (19, 26) which result in a high concentration of glutamine synthetase regardless of the nitrogen source of the medium (GlnC phenotype).

In this work, we established the existence in *E. coli* of a

*gltBDF* operon comprising genes coding for the large (*gltB*) and small (*gltD*) glutamate synthase subunits and a third downstream gene, *gltF*, the product of which appears to be involved in Ntr regulation.

### MATERIALS AND METHODS

Bacteria and bacteriophage strains. All of the bacterial strains used were derivatives of *E. coli* K-12, except RR1, which is an *E. coli* K-12-B hybrid (Table 1). Strain PA340 carries a  $\Delta$ *gltBDF* mutation in addition to an unapparent mutation that affects the level of expression of the wild-type *gltBDF* operon, as in plasmid pRSP21, when introduced into PA340 cells by transformation. A strain carrying only the deletion was obtained by transducing the *argG31* derivative MX971 with P1 propagated on PA340. Among *argG*<sup>+</sup> transductants unable to make glutamate synthase activity, one was isolated and termed MX988. Inheritance of the  $\Delta$ (*gltBDF*) mutation by this strain was confirmed by colony hybridization with plasmid pGOP3 or pRSP21 (which contain *gltB* and *gltBDF* genes, respectively, see Fig. 1) as a probe. *ipoN73::Tn5* was formerly known as *glnF73::Tn5* (9).

Culture media. Complex LB broth and NN minimal medium have been previously described (11). The additions to NN (final concentrations) were 0.2% glucose as the carbon source and 15 mM NH<sub>4</sub>Cl for N excess medium or 1 mg of L-glutamine per ml for N-limiting medium. Other nutritional requirements were satisfied by adding the filter-sterilized compounds at predetermined concentrations (1). The final concentrations of antibiotics were as follows: kanamycin, 30 μg/ml; spectinomycin, 20 μg/ml; streptomycin, 100 μg/ml; tetracycline, 10 μg/ml; ampicillin, 100 μg/ml.

Plasmids. All of the plasmids used are shown in Table 1. Plasmid DNA was purified as described by Betlach et al. (5). The recombinant plasmids constructed were derived from pBR322 (6), pBR327, or pBR328 (31).

Enzyme activity determinations. Glutamine synthetase activity was determined by the γ-glutamyltransferase assay (11); specific activities are expressed as nanomoles of γ-glutamyl hydroxamate formed per minute per milligram of protein at 37°C. Glutamate synthase and glutamate dehydro-

\* Corresponding author.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids

<i>E. coli</i> strain or plasmid	Relevant genotype or phenotype	Source or reference
<b>Strains</b>		
RR1	<i>hsd-20 (hsdR hsdM)<sub>6</sub></i>	6
P678-54	<i>F lac<sup>+</sup> thi-1 supE lacY tonA gal mal xyl ara int1 min</i>	21
PoAT	<i>poA24(Ts)</i>	15
PA340	<i>glbB1 gdh-1</i>	B. Bachmann
MX614	$\Delta$ <i>pro-lac</i> galE <i>tlv-680 thi-1</i>	3
MX848	<i>rpoN73::Tn5</i>	9
MX971	Same as MX614 but <i>argG31</i>	9
MX1172	Same as MX614 but <i>gdh-1</i>	This work
MX1176	Same as MX614 but <i>glbB225::<math>\Omega</math></i>	This work
MX1178	Same as MX614 but <i>glbB225::<math>\Omega</math></i>	This work
<b>Plasmids</b>		
pRSP20	<i>glbB<sup>+</sup> D<sup>+</sup> F<sup>+</sup></i> derivative of ColE1	12
pRSF21	<i>glbB<sup>+</sup> D<sup>+</sup> F<sup>+</sup></i> Cm <sup>r</sup> derivative of pRSP20	This work
pGOP1	<i>glbB<sup>+</sup> glbB::pBR328 glbF<sup>+</sup> Ap<sup>r</sup> Tc<sup>r</sup></i> derivative of pRSP20	12
pGOP3	<i>glbB<sup>+</sup> Tc<sup>r</sup></i> derivative of pBR327	12
pGOL2	<i>glbD<sup>+</sup> Ap<sup>r</sup></i> derivative of pBR327	12
pGOP3:: $\Omega$	<i>glbB225::<math>\Omega</math> Tc<sup>r</sup> Spe<sup>r</sup> Spm<sup>r</sup></i> derivative of pGOP3	This work
pGOG1	<i>glbF<sup>+</sup> Ap<sup>r</sup></i> derivative of pGOP1	This work
pGOG2	Same as pGOG1 but <i>glbF1::<math>\Omega</math> Ap<sup>r</sup> Spe<sup>r</sup> Sm<sup>r</sup></i>	This work
pGOG3	<i>glbF<sup>+</sup> Tc<sup>r</sup></i> derivative of pBR322	This work

genase activities were determined by the methods of Meers et al. (22); specific activities are expressed as nanomoles of NADPH oxidized per minute per milligram of protein at room temperature. Protein was measured by the method of Lowry et al. (16), with bovine serum albumin as the standard.

**Reagents.** Enzymes were obtained from P-L Biochemicals, Inc. (St. Goar, Federal Republic of Germany). Amino acids, vitamins, and antibiotics were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.). Radiochemicals were from Amersham Corp. (Arlington Heights, Ill.). LB medium ingredients were from Difco Laboratories (Detroit, Mich.), and other reagents were of analytical grade.

**Phenotypic characterization.** The pleiotropic Ntr phenotype was scored as cell growth on 0.2% L-arginine as the only nitrogen source (Aut). The ability of cells to derepress their glutamine synthetase under nitrogen-limiting conditions of growth (Gsd) is another Ntr-associated phenotype (13, 14, 29). Thus, the specific activity of glutamine synthetase of cells grown with L-glutamine as the sole nitrogen source is a quantitative measure of the Ntr function. The enzyme made under this condition is fully active biosynthetically, i.e., unadenylated. In fact, glutamine synthetase derepression is more sensitive to low levels of the general Ntr activator NR, than are other Ntr-associated phenotypes, such as Aut (27). Certain *E. coli* mutants, for instance, may weakly derepress their glutamine synthetase, clearly indicating Ntr functionality, yet insufficient to make them Aut<sup>+</sup> (see Table 2).

Throughout this paper, a distinction between the Gsd and Ntr phenotypes is kept only for the eventuality that an additional regulatory factor (i.e., the *glbF* product [see Results and Discussion]) could directly derepress glutamine synthetase without activating the entire Ntr system.

**Genetic and recombinant DNA procedures.** Preparation of P1 *virA* lysates and transduction protocols were as described by Miller (23). *E. coli* cells were prepared for transformation as described by Cohen et al. (10).

For construction of the *glbB225:: $\Omega$*  insertion, plasmid pGOP3 (12), which contains the complete *glbB* gene for the

large glutamate synthase subunit (Fig. 1), was cut at the *Bgl*II site, which interrupts this gene at 1.3 kilobases from its 5' end. On the other hand, DNA of plasmid pHP451 (28) was digested with enzyme *Bam*HI, which generates two fragments of 2.3 and 2.0 kilobases. The 2.0-kilobase DNA fragment has been shown to contain the gene which confers resistance to streptomycin and spectinomycin (Sm<sup>r</sup> Spe<sup>r</sup>), in addition to transcription and translation termination sequences (28). This so-called  $\Omega$  fragment was ligated to pGOP3 previously linearized with *Bgl*II, and the ligation mixture was used to transform RR1 competent cells (Table 1). Selection was performed on LB plates supplemented with streptomycin. The Sm<sup>r</sup> colonies that appeared upon incubation were tested for the accompanying Spe<sup>r</sup> and Tc<sup>r</sup> phenotypes. Restriction enzyme mapping of one of the resulting plasmids confirmed the insert at the *Bgl*II site of pGOP3, thus interrupting *glbB* within the 5' half of the gene.

To subclone the *glbF* gene, plasmid pGOP1 (13; Fig. 1) was digested with *Sma*I, and *Bam*HI linkers were added. After *Bam*HI digestion, the mixture was ligated and used to transform *E. coli* RR1 cells; selection was done for Ap<sup>r</sup> (Tc<sup>r</sup>) to allow for recircularization from the *Bam*HI site in pBR328 to the *Sma*I site (to which *Bam*HI linkers had been added) in pGOP1 without interruption of *glbF*. Ap<sup>r</sup> Tc<sup>r</sup> transformants were screened for the presence of the desired plasmid by restriction enzyme analysis. The resultant plasmid, pGOG1 (Fig. 1), contained a 1.8-kilobase chromosomal fragment immediately downstream of *glbD*.

To construct the *glbF1:: $\Omega$*  insertion, plasmid pGOG1 was cut at the *Hind*III site that interrupts *glbF* (Fig. 1) and ligated with the  $\Omega$  DNA fragment carrying *Hind*III ends. The ligation mixture was used to transform RR1 competent cells with selection for Ap<sup>r</sup> Sm<sup>r</sup> Spe<sup>r</sup> transformants. Restriction enzyme mapping of the resultant plasmid, pGOG2, confirmed that the  $\Omega$  fragment was inserted at the unique *Hind*III site.

With the purpose of constructing a plasmid in which *glbF* was transcribed from the anti-*tet* promoter of pBR322, we subcloned the chromosomal fragment of pRSP20 (12; Fig. 1) from its second *Eco*RI site immediately downstream of *glbD*

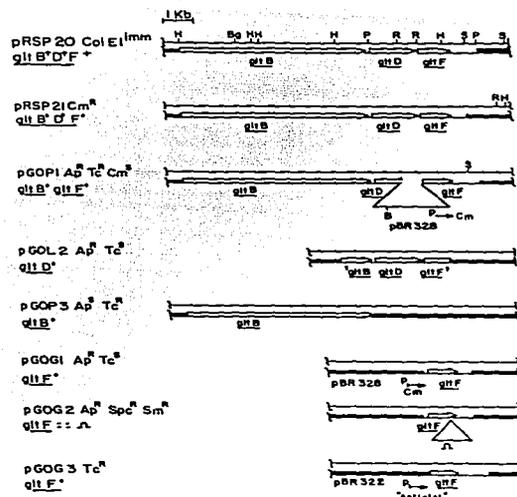


FIG. 1. Schematic representation of the plasmids used. The arrowheads indicate direction of transcription. Vector DNA is not drawn to scale. Only relevant restriction enzyme sites are shown in pRSP20 (12), pRSP21, and pGOP1. Abbreviations: B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; H, *Hind*III; P, *Pst*I; R, *Eco*RI; S, *Sma*I. In plasmid pGOP1, the small *Eco*RI fragment that makes up the *gltD* 3' end was substituted by *Eco*RI-linearized pBR328 (12). In pGOG2, the  $\Omega$  fragment (*Spe*<sup>r</sup> *Sm*<sup>r</sup>) was inserted at the *Hind*III site. Relevant vehicle promoters (P Cm and P anti-*tet*) and their direction of transcription are indicated (2). Superscripts R and S indicate resistance and sensitivity, respectively, to the antibiotic. Prime symbols, as in '*gltB*' and '*gltF*', indicate discontinuity at the 5' and 3' ends, respectively. In pGOL2, only *gltD* is complete. The carboxy terminus of *gltF* was deleted during the construction of this plasmid. Symbols: —, chromosomal DNA; |,  $\Omega$ ;  $\blacksquare$ , vector DNA.

up to the *Pst*I site of the vector. This fragment of approximately 2.8 kilobases was cloned into plasmid pBR322 previously digested with *Eco*RI and *Pst*I. Transformation of RR1 competent cells led to Tc<sup>r</sup> (Ap<sup>r</sup>) clones carrying plasmid pGOG3 in which *gltF* is transcribed from the anti-*tet* promoter.

Northern (RNA) blot RNA-DNA hybridizations. Total cellular RNA was isolated as described by Aiba et al. (2). Agarose gels containing 2.2 M formaldehyde were prepared, and the RNA preparations were electrophoresed as described before (20), except that 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> were added to all of the buffers (pH 6.0). Gel transfers and nitrocellulose filter hybridizations were carried out as described before (33).

Polypeptide synthesis by minicells. Minicells were purified, by three sequential sucrose gradient centrifugations (21),

from strain P678-54 (Table 1) previously transformed with the different plasmids. The minicells were suspended in methionine assay medium (Difco) and incubated with <sup>35</sup>S-labeled L-methionine (50  $\mu$ Ci/ml) for 30 min at 37°C with shaking. Radioactively labeled minicells were centrifuged and suspended in 50  $\mu$ l sample buffer (10% glycerol, 2.5% sodium dodecyl sulfate, 0.625 M Tris [pH 6.8], 5%  $\beta$ -mercaptoethanol) and boiled for 2 to 4 min before 25- $\mu$ l samples were subjected to electrophoresis on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels.

## RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of the *gltB225:: $\Omega$*  mutation. The *gltB225:: $\Omega$*  insertion was constructed as described in Materials and Methods. We induced homologous recombination of the *gltB225:: $\Omega$*  allele into the chromosome by transforming a *polA*(Ts) strain with plasmid pGOP3 (*gltB225:: $\Omega$* ) at 30°C. Since this strain bears a temperature-sensitive DNA polymerase I, it is unable to replicate ColE1-type plasmids at 42°C (15). After 5 h at 42°C, the cell suspension was spread on LB-streptomycin-spectinomycin plates. Independent colonies that appeared upon incubation at 37°C were screened for tetracycline sensitivity. Of 800 colonies tested, 2 had the desired Tc<sup>r</sup> Sm<sup>r</sup> Spe<sup>r</sup> phenotype. P1 *vir*a was propagated on one of these strains, and the resulting lysate was used to transduce strain MX1172 (*gdtH-1*) to Sm<sup>r</sup> and Spe<sup>r</sup>. P1 *vir*a grown on one of the transductants, MX1176, was then used to transduce strains MX614 (wild type), MX848 (*rpoN73::Tn5*), MX971 *argG31*, and MX1172 (*gdtH-1*) to Sm<sup>r</sup> and Spe<sup>r</sup> (Table 1). Counterselection was done for Aut<sup>r</sup>, Km<sup>r</sup>, Gln<sup>r</sup>, Arg<sup>r</sup>, Aut<sup>r</sup>, and Glt<sup>r</sup>, respectively. The results showed *gltB225:: $\Omega$*  cotransduction with *argG31* (40%) and *rpoN73::Tn5* (95%) but not with *gdtH-1*.

To check whether the recombined chromosomal mutation was the same as that in plasmid pGOP3, DNA-DNA hybridization was carried out with pGOP3 DNA as the probe. The results confirmed that homologous recombination had occurred in the transductants (data not shown).

Transcription of *gltBDF* as an operon. Bulk RNAs from four different strains were purified from cultures grown on either 15 mM NH<sub>4</sub>Cl or 0.2% glutamate as the sole nitrogen source. The search for *gltBDF*-specific mRNA transcripts was carried out with three different hybridization probes: a 1.8-kilobase *Hind*III-*gltB* internal fragment, a 0.6-kilobase *Eco*RI DNA fragment corresponding to the 3' half of *gltD*, and a 0.45-kilobase *Hind*III-*Bam*HI fragment downstream of *gltD* which includes part of *gltF* but is devoid of *gltB* and *gltD* sequences (Fig. 2).

A major large transcript of approximately 7.5 kilobases was detected from MX614 or MX614(pRSP21) cells with each of the three probes tested. The transcript is 1.5 kilobases longer than the size expected for a *gltB-gltD* mRNA, and so it carries enough RNA to encode synthesis of a small *gltF* polypeptide. No such transcript was detected with any of the probes in the total RNA purified from either MX1176 (*gltB225:: $\Omega$*  *gdtH-1*) or PA340 ( $\Delta$ *gltBDF*).

Whether other mRNA bands in the gels correspond to transcripts of either one or two genes of the operon or to degradation products of the three gene mRNAs requires more careful examination.

Our results also indicate that synthesis of the 7.5-kilobase RNA is repressed by glutamate when this is used as the sole nitrogen source in the growth medium (compare lanes G and N of Fig. 2), in agreement with the previously observed

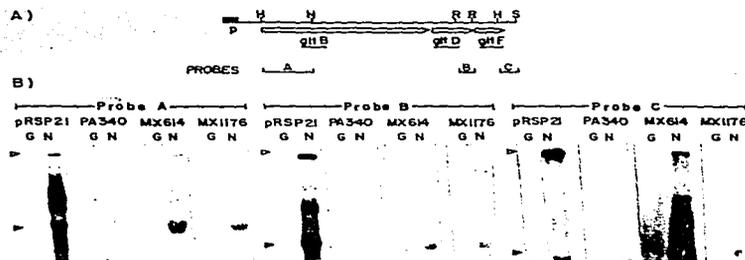


FIG. 2. Northern blot RNA-DNA experiments. Cultures from which total RNAs were purified are indicated as having N (minimal medium containing 15 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) or G (0.2% L-glutamate) as the sole nitrogen source. N cultures of strain PA340 also carried 0.02% L-glutamate to satisfy the requirement of the strain. (A) Schematic representation of the *glt* region from which probes A, B, and C were purified. (B) Total RNAs (10  $\mu\text{g}$ ) from the strains indicated were blotted and hybridized with probes A, B, and C. Lanes labeled pRSP21 contain 10  $\mu\text{g}$  of total RNA purified from strain MX614(pRSP21). When total RNA purified from strain MX614(pRSP21) was used, the lane was heavily labeled when hybridized with probe A, since the background radioactivity was progressively diminished as the more down-stream probes were used, this implies specific 3' to 5' degradation. Closed arrowheads indicate the migration of 16S rRNA (3,000 nucleotides). Open arrowheads show a large transcript of 7,500 nucleotides or more detected with all probes.

repression of glutamate synthase by glutamate (7, 30). The mechanism underlying this effect of glutamate is unknown but appears to be unrelated to its action as a nitrogen-limiting growth source. Glutamine, which also acts as a nitrogen-limiting source for *E. coli*, does not repress glutamate synthase synthesis (Table 2).

Identification of the *gltF* polypeptide product. The transla-

tion products of the *glt* region were characterized in the minicell system. In addition to the large and small subunits of glutamate synthase, the polypeptide products of the *gltB* and *gltD* genes (12, 24), respectively, we identified the *gltF* product as a 30,200-dalton polypeptide (Fig. 3) not present in minicells carrying either the control plasmid pBR329 (Fig. 3, lane 2) or pGOG2 (*gltF*:: $\Delta$ ) (Fig. 3, lane 7). Synthesis of the

TABLE 2. Enzyme activities and growth phenotypes of *E. coli* strains<sup>a</sup>

Strain (plasmid and relevant genotype)	Growth phenotype		Specific activity of:					
	Glt	Ntr	Glutamate synthase		Glutamate dehydrogenase		Glutamine synthetase	
			N limiting	N excess	N limiting	N excess	N limiting	N excess
MX614 wild type	+	+	71	67	205	206	1,040	128
PA340 <i>gdtH-1</i> $\Delta$ <i>gltBDF</i>	+	-	0	0	0	0	307	280
MX988 $\Delta$ <i>gltBDF</i>	+	-	0	0	261	185	200	128
MX1172 <i>gdtH-1</i>	+	-	79	72	0	0	1,100	120
MX1176 <i>gdtH-1 gltB225::<math>\Omega</math></i>	+	+	0	0	0	0	390	330
MX1178 <i>gltB225::<math>\Omega</math></i>	+	-	0	0	282	214	190	100
MX614(pRSP21) <i>gltB</i> <sup>+</sup> <i>D</i> <sup>+</sup> <i>F</i> <sup>+</sup>	+	+	781	751	ND	229	745	150
MX988(pRSP21) <i>gltB</i> <sup>+</sup> <i>D</i> <sup>+</sup> <i>F</i> <sup>+</sup>	+	+	784	ND	121	ND	1,117	160
MX1176(pRSP21) <i>gltB</i> <sup>+</sup> <i>D</i> <sup>+</sup> <i>F</i> <sup>+</sup>	+	+	575	607	0	0	731	210
MX1176(pGOP1) <i>gltB</i> <sup>+</sup> <i>gltF</i> <sup>+</sup>	+	+	18	16	ND	ND	ND	ND
MX1178(pGOP1) <i>gltB</i> <sup>+</sup> <i>gltF</i> <sup>+</sup>	+	+	15	18	188	229	270	180
MX988(pGOP3) <i>gltB</i> <sup>+</sup>	+	-	0	0	141	ND	260	130
MX1176(pGOP3) <i>gltB</i> <sup>+</sup>	+	-	37	54	0	0	320	200
MX1178(pGOP3) <i>gltB</i> <sup>+</sup>	+	-	31	34	332	174	690	258
MX988(pGOL2) <i>gltD</i> <sup>+</sup>	+	-	0	0	112	ND	170	260
MX1176(pGOL2) <i>gltD</i> <sup>+</sup>	+	-	0	0	0	0	450	332
MX1178(pGOG1) <i>gltF</i> <sup>+</sup>	+	-	0	0	278	219	410	110
MX1178(pGOG2) <i>gltF1::<math>\Delta</math></i>	+	-	0	0	253	234	440	150
MX1178(pGOG3) <i>gltF</i> <sup>+</sup>	+	+	0	0	234	245	305	140

<sup>a</sup> Enzyme activities are expressed as nanomoles of NADPH oxidized per minute per milligram of protein at 21°C for glutamate synthase and glutamate dehydrogenase and as nanomoles of  $\gamma$ -glutamyl hydroxamate formed per minute per milligram of protein at 37°C for glutamine synthetase. Zero values correspond to 22.0°C above the controls without glutamine for glutamate synthase or without ammonia for glutamate dehydrogenase. N limiting and N excess indicate growth on NN medium containing 6.8 mM L-glutamine or 15 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  as the sole nitrogen source, respectively. Enzyme specific activities are the means of two determinations, with standard deviations of less than 15% of the mean, except for glutamate synthase, for which the values are the means of five determinations and the standard deviations are as high as 40% of the mean. Glt denotes prototrophy (+) or auxotrophy (-) for glutamate. Ntr was scored by the ability of cells to utilize 0.2% L-arginine as the sole nitrogen source. ND, Not determined.

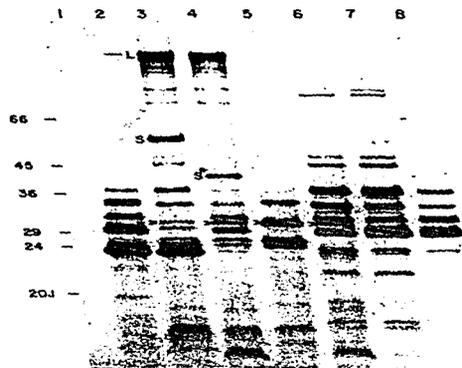


FIG. 3. Autoradiograph of a 10 to 15% polyacrylamide-sodium dodecyl sulfate gradient gel, showing [ $^{125}$ I]methionine-labeled proteins encoded by various plasmids. Lanes: 2, pD78-54pBR329; 3, pD78-54pRSP21; 4, pD78-54pGOG1; 5, pD78-54pGOG3; 6, pD78-54pGOG1; 7, pD78-54pGOG2; 8, pD78-54pH1451) (28). The numbers at the left margin of the figure indicate molecular mass markers in kilodaltons. The *glhF* protein product of 30,200 daltons is indicated by arrowheads. Large and small glutamate synthase subunits made by minicells containing plasmid pRSP21 (lane 3) are indicated by L and S, respectively. The truncated small subunit synthesized by minicells with pGOG1 is indicated as 5\*.

30,200-dalton polypeptide was more pronounced when the *glhF* gene was transcribed from the chloramphenicol promoter of pGOG1 or pGOG3 than when it originated from the wild-type promoter as in pRSP21 (compare lanes 3, 4, and 6 of Fig. 3). As expected, the *glhF* polypeptide was overproduced from the anti-*tet* promoter of plasmid pGOG3 (32; Fig. 3, lane 5).

The aforementioned biochemical evidence that genes *glhB*, *glhD*, and *glhF* are transcribed in a single mRNA species and the fact that the *glhB225:: $\Omega$*  mutation prevents its synthesis, and thus, translation of the corresponding polypeptide products, support the model of a *glhBDF* operon in *E. coli*.

**Complementation tests.** In assessing complementation of the three phenotypes defective in strains carrying the *glhB225:: $\Omega$*  insertion with plasmids carrying all or individual genes of the *glhBDF* operon, we took into account the following considerations. Strain MX1176 (*gdh-1 glhB225:: $\Omega$* ) cannot make either glutamate synthase or glutamate dehydrogenase activity and, consequently, is a glutamate auxotroph (4). This strain was adequate for testing plasmid complementation for glutamate synthase activity simultaneously with glutamate prototrophy. The glutamate auxotrophy of MX1176, however, did not allow testing of complementation for the Ntr and Gsd phenotypes unless glutamate was added to the medium. Plasmid complementation for Ntr<sup>+</sup> and Gsd<sup>+</sup> was preferentially carried out in strain MX1178 (*glhB225:: $\Omega$* ), which does not require glutamate for growth, since this is provided by glutamate dehydrogenase. The Ntr and Gsd phenotypes could then be scored with 15

mM NH<sub>4</sub>Cl (nitrogen excess) or 1 mg of glutamine per ml (nitrogen limitation) as the sole nitrogen source in the medium. It is noteworthy that neither glutamate synthase nor glutamate dehydrogenase appeared to be regulated by either nitrogen source (Table 2).

The three phenotypic defects associated with the chromosomal *glhB225:: $\Omega$*  allele in MX1176 or MX1178 cells, i.e., lack of glutamate synthase activity, Ntr<sup>-</sup> and Gsd<sup>-</sup>, and the glutamate auxotrophy of MX1176, were complemented by plasmid pRSP20 or pRSP21 (Table 2), in which the entire *glh* region was cloned in an 8.55-kilobase DNA segment (Fig. 1). None of the plasmids carrying individual operon genes, however, could complement all of the phenotypic defects. From these results, we conclude that in MX1176 and MX1178, the *glhB225:: $\Omega$*  insertion is polar over the downstream genes of the operon, in agreement with previous evidence on the direction of transcription from *glhB* to *glhD* (12) and apparently to *glhF*.

Complementation for glutamate synthase activity was also achieved in MX1176 by pGOG3 (*glhB<sup>+</sup>*) or pGOG1 (*glhB<sup>+</sup> glhF<sup>+</sup>*). pRSP21 directed 8- to 9-fold increased levels of glutamate synthase activity over that of wild-type cells, whereas pGOG1 and pGOG3 directed 5.5- and 1.6-fold reduced levels, respectively (Table 2). It is possible that MX1176 (pGOG1) cells synthesize hybrid glutamate synthase molecules that contain the normal large enzyme subunit associated with either the truncated 40-kilodalton small subunit encoded by pGOG1 (Fig. 1) or the wild-type small subunit encoded by the chromosomal *glhD* gene. If so, the relative amounts of these two molecules may account for the lower glutamate synthase activity of MX1176(pGOG1) than MX1176(pGOG3).

The nearly wild-type level of glutamate synthase made by this last strain suggests some expression of the chromosomal *glhD* gene despite the *glhB225:: $\Omega$*  insertion. This is in agreement with Garcarrubio et al. (12), who suggested *glhD* transcription from its own promoter.

A previous suggestion of glutamate synthase activity exclusively due to the large enzyme subunit (18) as an alternative explanation for this enzyme activity in MX1176(pGOG3) or MX1178(pGOG3) probably does not apply, since pGOG3 was unable to express this enzyme in MX988 ( $\Delta$ *glhBDF*) cells (Table 2).

Involvement of the *glhF* product in the activation of the Ntr system is suggested by several lines of evidence. *glhF* was cloned in two different plasmids, pGOG1 and pGOG3. Even though *glhF* is transcribed from the chloramphenicol promoter of pBR328 in pGOG1 and from the anti-*tet* promoter of pBR322 in pGOG3, both plasmids complemented MX1178 (*glhB225:: $\Omega$* ) cells to Ntr<sup>+</sup> but not Gsd<sup>-</sup> (Table 2). In these cells, Ntr<sup>+</sup> complementation took place in the absence of glutamate synthase, a result that speaks in favor of activation of Ntr either directly or indirectly by the *glhF* product but not via its possible activation of the *glhBDF* operon. For reasons not known, neither pGOG1 nor pGOG3 was able to complement MX988 ( $\Delta$ *glhBDF*) to Ntr<sup>+</sup>. The inability of pGOG3 (*glhB<sup>+</sup>*) to complement the Ntr<sup>-</sup> phenotype of MX1176 (*glhB225:: $\Omega$* ) cells (Table 2) suggests that, in these cells, *glhF* cannot be efficiently transcribed as part of a bicistronic message from a putative *glhD* promoter or from a promoter of its own.

The results of noncomplementation of the Gsd<sup>-</sup> phenotype of MX1178 by *glhF<sup>+</sup>* from either pGOG1 or pGOG3 (Table 2) are taken as an indication that the glutamate synthase molecule or certain threshold levels of intracellular glutamate, not achieved solely by the biosynthetic action of

glutamate dehydrogenase, in place of or in addition to the *gluF* product, are responsible for  $Gsd^+$  expression.

Glutamate has two opposite effects on expression of the operons coding for glutamate synthase and glutamine synthetase. As previously suggested (7, 30), and confirmed by us (Fig. 2), glutamate represses glutamate synthase in wild-type cells. It also completely derepresses glutamine synthetase (30), but this effect is not exerted solely by action as a nitrogen-limiting source as in other cases, i.e., low  $NH_4^+$ , arginine, or proline, for it does so in the *gluBDF* deletion strain MX988 (A. V. Osorio and F. Bastarrachea, unpublished data). Apparently, glutamate overcomes the requirement for the *gluF* product in the activation of the Ntr system and satisfies the requirement of a functional *gluBDF* operon for  $Gsd^+$ . Consequently, the *gluF* product, the level of intracellular glutamate, or both appear to regulate *gluALG* expression by an unknown mechanism.

It is known that the Ntr system is turned on in *gluB* mutants undergoing nitrogen limitation by suppressor mutations in *gluL*, leading to the  $GlnC$  phenotype (26). Since such suppression does not act by restoring glutamate synthase activity, it may act by bypassing a requirement for the *gluF* product. Further experimentation on the possible roles of the *gluF* product and glutamate in expression of *gluL* and *gluG* or on the functionality of their products seems warranted, particularly in light of recent evidence associating a specific *gluL* mutation conferring the  $GlnC$  phenotype with loss of the ability of its *gluL* product,  $NR_{II}$  (in the presence of the *gluB* product,  $P_{II}$ ), to inactivate (dephosphorylate) the activated *gluG* product  $NR_{II}P$  (25).

Experiments in progress are intended to define more precisely the gene product-phenotype relationships of the complex *gluBDF* operon.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to A. Garcarrubio for the construction of plasmid pRSP21 and helpful discussions; F. Bolívar and co-workers for providing plasmids pGOP1, pGOL2, and pGOP3; B. Bachmann for advice on gene and allele designations; and S. Silver for critical review of the manuscript. Thanks are also due to J. Mazari for excellent technical assistance and to R. M. Cuevas and D. Cuellar for typing the manuscript.

This work was supported in part by Ricardo J. Zevada Foundation grant REF. 150 86.

#### LITERATURE CITED

- Adelberg, E. A., and S. N. Burns. 1960. Genetic variation in the sex factor of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 79:321-330.
- Alba, H., S. Adhya, and B. De Crombrughe. 1981. Evidence for two functional *col* promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* 256:11905-11910.
- Bastarrachea, F., S. Brom, A. A. Covarrubias, A. V. Osorio, and F. Bolívar. 1980. Genetic characterization of mutations affecting glutamine biosynthesis and its regulation in *Escherichia coli* K12, p. 107-121. In J. Mora and R. Palacios (ed.), *Glutamine: metabolism, enzymology and regulation*. Academic Press, Inc., New York.
- Berberich, M. A. 1972. A glutamate dependent phenotype in *E. coli* K-12: the result of two mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47:1498-1503.
- Bellach, M., V. Hersheyfield, L. Chow, W. Brown, H. M. Goodman, and H. W. Boyer. 1976. A restriction endonuclease analysis of bacterial plasmids controlling the *EcoRI* restriction and modification of DNA. *Fed. Proc.* 35:2037-2043.
- Bolívar, F., R. L. Rodríguez, M. C. Bellach, and H. W. Boyer. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene* 2:75-93.
- Brenchley, J. E., C. A. Baker, and L. G. Patil. 1975. Regulation of the ammonia assimilatory enzymes in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 124:182-189.
- Brenchley, J. E., M. E. Prival, and B. Magasanik. 1973. Regulation of the synthesis of enzymes responsible for glutamate formation in *Klebsiella aerogenes*. *J. Biol. Chem.* 248:6122-6128.
- Castano, I., and F. Bastarrachea. 1984. *gluF-lacZ* fusions in *Escherichia coli*: studies on *gluF* expression and its chromosomal orientation. *Mol. Gen. Genet.* 195:228-233.
- Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, and L. Hsu. 1972. Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110-2114.
- Covarrubias, A. A., R. Sánchez-Pescador, A. V. Osorio, F. Bolívar, and F. Bastarrachea. 1980. ColE1 hybrid plasmids containing *Escherichia coli* genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine. *Plasmid* 3:150-164.
- Garcarrubio, A., E. Lozoya, A. A. Covarrubias, and F. Bolívar. 1983. Structural organization of the genes that encode the two glutamate synthase subunits of *Escherichia coli* K12. *Gene* 26: 165-170.
- Haskess, T., M. Merrick, and R. Dixon. 1985. Interaction of purified NtrC protein with nitrogen regulated promoter from *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* 201:492-498.
- Hirschman, J., P.-K. Wong, K. Sci, J. Keener, and S. Kustu. 1985. Products of nitrogen regulatory genes *ntrA* and *ntrC* of enteric bacteria activate *glnA* transcription in vitro: evidence that the *ntrA* product is a  $\sigma$  factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7525-7529.
- Kingsbury, D. T., and D. R. Helinski. 1970. DNA polymerase as a requirement for the maintenance of the bacterial plasmid colicinogenic factor *E1*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41: 1538-1544.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-270.
- Lozoya, E., R. Sánchez-Pescador, A. A. Covarrubias, I. Viehido, and F. Bolívar. 1983. Tight linkage of the genes that encode the two glutamate synthase subunits of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 144:616-621.
- Madonna, M. J., R. L. Fuchs, and J. E. Brenchley. 1985. Fine structure analysis of *Salmonella typhimurium* glutamate synthase genes. *J. Bacteriol.* 161:353-360.
- Magasanik, B. 1982. Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 16:135-168.
- Mannatis, T. E., F. H. Frisch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mantsala, P., and H. Zalkin. 1976. Active subunits of *Escherichia coli* glutamate synthase. *J. Bacteriol.* 126:539-541.
- Meagher, R. B., R. C. Fatt, M. Bellach, and H. W. Boyer. 1977. Protein expression in *E. coli* minicells by recombinant plasmids. *Cell* 10:521-536.
- Meers, J. L., D. W. Tempest, and C. M. Brown. 1970. Glutamine(amide):2-oxoglutarate aminotransferase oxidoreductase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 64:187-194.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Miller, R. E., and E. R. Stadtman. 1972. Glutamate synthase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 247:7407-7419.
- Ninfa, A. J., and B. Magasanik. 1986. Covalent modification of the *gluG* product,  $NR_{II}$ , by the *gluL* product,  $NR_{II}$ , regulates transcription of the *gluALG* operon in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5909-5913.
- Pahel, G., A. D. Zelenev, and B. M. Tyler. 1978. *gluB* gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 133:139-148.
- Pahel, G., and B. Tyler. 1979. A new *gluA*-linked regulatory gene for glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4544-4548.
- Prentki, P., and H. M. Krusch. 1984. *In vitro* insertional muta-

- genesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29:303-313.
29. Reitzer, L. J., and B. Magasanik. 1985. Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1979-1983.
  30. 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.
  31. Soberón, X., L. Covarrubias, and F. Bolívar. 1980. Construction and characterization of new cloning vehicles. IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325. *Gene* 9:287-305.
  32. Stuber, D., and J. Bujard. 1981. Organization of transcriptional signals in plasmids pBR322 and pACYC184. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:167-171.
  33. Thomas, P. S. 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Biochemistry* 77:5201-5205.

## RESULTADOS ADICIONALES

### OBTENCION DE CEPAS QUE CONTIENEN LOS GENES *hutC* DE *K. aerogenes*

Con el objeto de determinar cuantitativamente la inducción de los sistemas Ntr, se introdujo por transducción a las cepas del laboratorio los genes del operón *hut* de *Klebsiella aerogenes*. Se ha demostrado que los genes del operón *hut* de *K. aerogenes* están regulados por la accesibilidad y calidad de la fuente de carbono (represión catabólica), así como por la accesibilidad de nitrógeno. Se han aislado mutaciones en el gen *hutC* de *K.aerogenes*, que ya no requieren histidina para la inducción de las enzimas del operón (28) y solamente son sensibles a control por el sistema Ntr. En particular, se ha usado este operón mutante constitutivo (*hutC*) de *K.aerogenes* para la determinación de actividad enzimática de histidasa como monitor de la función Ntr tanto en *K.aerogenes* como en *E. coli* (14). En estos sistemas, en condiciones de limitación de nitrógeno, la síntesis de histidasa se induce 3 veces con respecto a condiciones de exceso de nitrógeno (11, 28, 29, 40). Cepas que contienen mutaciones pleiotrópicas que confieren fenotipo Ntr<sup>-</sup> como son las que se localizan en *glnG*, *glnF*, *glnD* etc., presentan actividad enzimática de histidasa equivalente a condiciones de represión, aun cuando los cultivos están limitados de nitrógeno (4, 11). La estrategia para introducir estos genes está descrita en la sección de Material y Métodos.

### OBTENCION DE LAS MUTACIONES *gltD1::MudII*PR13 Y *gltF1::Ω*

En la sección de Material y Métodos se encuentra descrito el aislamiento en plásmidos de los alelos *gltD1::MudII*PR13 y *gltF1::Ω*, así como el método utilizado para realizar la recombinación homóloga de estos alelos con el cromosoma. La recombinación del alelo *gltB225::Ω* se describió en el artículo.

La inserción del Fago *MudII*PR13 (45) ocasionó una fusión traduccional del gen *lacZ* con la región amino-terminal de *gltD*

Se realizó un experimento de hibridación de DNA-DNA tipo Southern para verificar que las mutaciones, inicialmente aisladas en plásmido, se transfirieron sin cambio alguno al cromosoma de cada receptora; (datos no mostrados) el mapa de la región cromosomal de la cepa silvestre comparada con las tres mutantes por inserción aisladas se encuentra esquematizado en la Figura 1; el mapa de los plásmidos construidos que no se incluyen en el artículo se encuentran esquematizados en la Figura 2, y descritos en la Tabla 2.

TABLA 1. Cepas bacterianas utilizadas

CEPA	GENOTIPO O FENOTIPO RELEVANTE	REFERENCIA
MX614	$\Delta$ ( <i>lac-pro</i> ) <i>ilv-680 thi-1</i>	(5)
MX1172	igual que MX614 pero <i>gdh1</i>	(14)
MX1178	igual que MX614 pero <i>glbB225::<math>\Omega</math></i>	(14)
MX1179	igual que MX614 pero <i>glf1::<math>\Omega</math></i>	Este trabajo
MX2099	igual que MX1172 pero <i>pro<math>\Delta</math> (lacU)</i>	Este trabajo
MX3000	igual que MX2099 pero <i>ilv<sup>+</sup></i>	Este trabajo
MX3001	igual que MX3000 pero HutC <sup>Klebs</sup>	Este trabajo
MX3002	igual que MX3001 pero <i>glbB225::<math>\Omega</math></i>	Este trabajo
MX3003	igual que MX3001 pero <i>glf1::<math>\Omega</math></i>	Este trabajo
MX3004	igual que MX3001 pero <i>glfD::MudII</i>	Este trabajo
MX3005	igual que MX3002 pero <i>gdh<sup>+</sup></i>	Este trabajo
MX3006	igual que MX3002 pero <i>glfD::MudII</i>	Este trabajo
RR1	<i>hsd-20 (hsdR hsdM)<sub>B</sub></i>	(8)
PA340	$\Delta$ ( <i>glbBDF</i> ) <i>gdh1</i>	B. Bachmann
PolA <sub>ts</sub>	<i>polA214</i> (T <sub>s</sub> )	(25)
YMC10	$\Delta$ ( <i>lacU169</i> ) <i>hutC<sub>Klebs</sub></i>	(15)
M8820(Mu <sup>+</sup> )	<i>araD139<math>\Delta</math> (araCOIBA-leu)7679</i> <i><math>\Delta</math>(proAB argF-lacIPOZYA)XIII</i> <i>rpsL(Sm<sup>R</sup>) (Mu<sup>+</sup>)</i>	(12)
MC4100 (Mucts)	<i>araD139, <math>\Delta</math>(argF-lac)U169 rpsL159</i> (Sm <sup>R</sup> ), <i>relA1 ffb5301</i> (Mucts62)	(44)
MC4100 (Mucts) (MudIIPR13)	igual que MC4100 (Mucts) pero lisógena para MudIIPR13	(45)

TABLA 2. Plásmidos y Bacteriófagos utilizados

PLASMIDOS	GENOTIPO O FENOTIPO RELEVANTE	REFERENCIA
pRSP21	<i>glbD</i> <sup>+</sup> <i>F</i> <sup>+</sup> Cm <sup>R</sup>	(22)
pRSP22	<i>glbB::lacZ glbD</i> <sup>+</sup> <i>F</i> <sup>+</sup> Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
pRSP23	<i>glbB</i> <sup>+</sup> <i>D</i> <sup>+</sup> $\Delta$ ( <i>glbF</i> <sup>+</sup> ) Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
pRSP24	<i>glbB</i> <sup>+</sup> <i>D</i> <sup>+</sup> <i>F1::</i> $\Omega$ Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
pDF1	<i>glbD</i> <sup>+</sup> <i>glbF</i> <sup>+</sup> Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
pGOL1	<i>'glbB</i> <sup>+</sup> <i>glbD</i> <sup>+</sup> Ap <sup>R</sup>	(22)
pGOL1::Mu	<i>glbD::MudII</i> PR13 <i>glbF</i> <sup>+</sup> Cm <sup>R</sup> Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
pGOL2	<i>glbD</i> <sup>+</sup> derivado de pBR327 Ap <sup>R</sup>	(22)
pGOP1	<i>glbB</i> <sup>+</sup> <i>glbD::pBR328glbF</i> <sup>+</sup> Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	(22)
pGOP3	<i>glbB</i> <sup>+</sup> derivado pBR327 Tc <sup>R</sup>	(22)
pGOG3	<i>glbF</i> <sup>+</sup> derivado de pBR322 Tc <sup>R</sup>	(14)
pUC19	<i>lacZ</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>+</sup> Ap <sup>R</sup>	(56)
pMC1871	<i>'lacZ</i> (comienza en el 8º codón) Tc <sup>R</sup>	(13)
pRK2013	<i>incP mob</i> <sup>+</sup> Kan <sup>R</sup>	(18)
FAGOS		
Muc <sup>+</sup>		
Mucts62		
MudIIIPR13	<i>lac</i> <sup>+</sup> <i>ZYA</i> Cm <sup>R</sup>	(45)

FIGURA 1:

Estructura de la región cromosomal glt de diferentes cepas

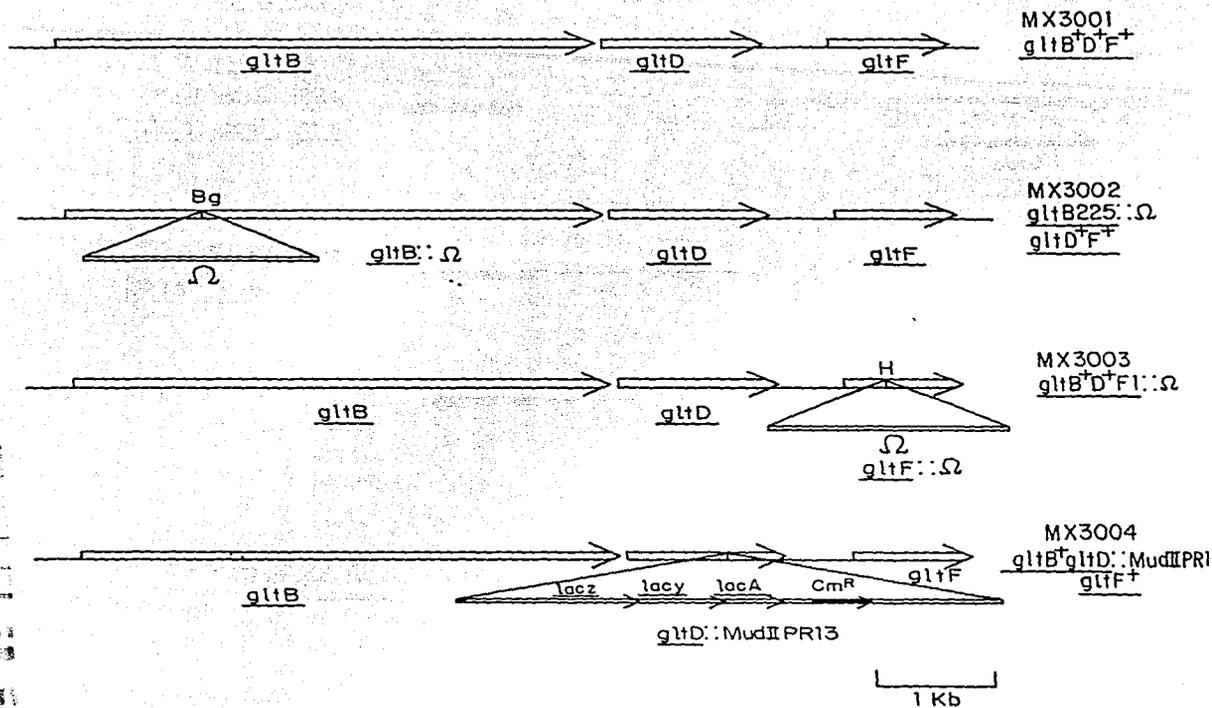
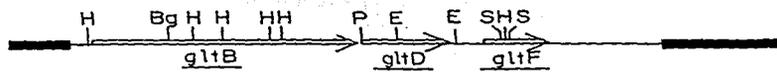
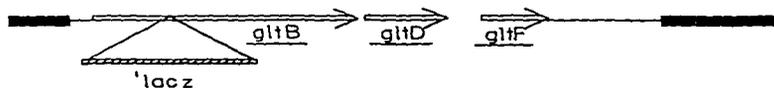


FIGURA 2:

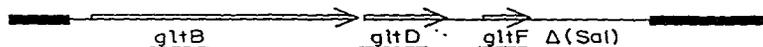
Plásmidos utilizados



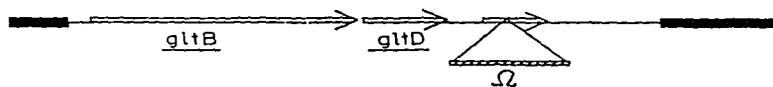
pRSP21 Cm<sup>R</sup>  
gltB<sup>+</sup>D<sup>+</sup>F<sup>+</sup>



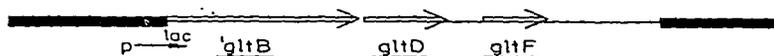
pRSP22 Cm<sup>R</sup> Lac<sup>+</sup>  
gltB::lacZ gltD<sup>+</sup>F<sup>+</sup>



pRSP23 Cm<sup>R</sup>  
gltB<sup>+</sup>D<sup>+</sup> gltF<sup>-</sup> Δ(Sal)



pRSP24 Cm<sup>R</sup> Spc<sup>R</sup>/Sm<sup>R</sup>  
gltB<sup>+</sup>D<sup>+</sup>F<sup>-</sup>::Ω



pDF1 Ap<sup>R</sup>  
gltB<sup>-</sup>D<sup>+</sup>F<sup>+</sup>

Bg — BglII  
E — EcoRI  
H — HindIII  
P — PstI  
S — SalI

1 Kb

### CARACTERIZACION FENOTIPICA DE LAS CEPAS MUTANTES EN LA REGION GLT

Inicialmente se determinaron las actividades enzimáticas de histidasa, GOGAT, y  $\beta$ -galactosidasa de cada una de las cepas mutantes en la región cromosomal *glr*. Los resultados se encuentran en la Tabla 3, estos experimentos se realizaron en cultivos limitados de nitrógeno (N-limit) por crecimiento en glutamina como fuente de nitrógeno; con el objeto de observar condiciones de inducción de los genes del operón *hut*. Como se observa en esta Tabla, todas las cepas que contienen mutaciones en alguno de los genes del operón *gltBDF* fueron incapaces de inducir la síntesis de histidasa en respuesta a limitación de nitrógeno. Las mutantes presentaron de un 10%-35% de la actividad de esta enzima comparada con la cepa silvestre, independientemente de si llevan o no el gen *gdhA* silvestre. Como se espera, mutaciones en *gltB* o en *gltD* no tuvieron actividad de GOGAT detectable. En el caso de la mutación *gltF1:: $\Omega$* , la cepa presentó una actividad de GOGAT comparable a la de la silvestre en estas condiciones. Solamente la cepa MX3004, y su derivada la MX3006 (*gltB225:: $\Omega$  gltD::MudIIPR13*), que llevan la fusión (a nivel del octavo codón de la proteína) del gen *lacZ* con el amino terminal de *gltD* presentaron actividad de  $\beta$ -galactosidasa. La cepa MX3004 tuvo actividad de esta enzima elevada en condiciones de limitación de nitrógeno; esta actividad se rerimió aproximadamente unas 4 veces por crecimiento en glutamato como fuente de nitrógeno. La cepa MX3006 presentó actividad detectable de  $\beta$ -galactosidasa (alrededor de 45% de la cepa padre MX3004) a pesar de llevar la inserción polar del fragmento  $\Omega$  en *gltB*; lo que indica que *gltD* se puede transcribir de un promotor diferente del de *gltB*.

**TABLA 3:** Actividades enzimáticas de histidasa, GOGAT y  $\beta$ -galactosidasa de diferentes mutantes en el operón *gltBDF*.

CEPA	GENOTIPO	HISTIDASA N-limit	GOGAT N-limit	$\beta$ -galactosidasa N-limit	Glt	HISTIDASA Mut/Silv
MX3001	<i>Silv.hutC*</i> $\Delta$ ( <i>lac</i> )	92	99	N.D.	N.D.	1
MX3002	<i>gltB225::</i> $\Omega$	25	N.D.	N.D.	N.D.	0.27
MX3003	<i>gltF1::</i> $\Omega$	35	108	N.D.	N.D.	0.38
MX3004	<i>gltD::</i> MudIIPR13	11	N.D.	196	59	0.12
MX3005	<i>gltB::</i> $\Omega$ <i>gdh</i>	22	N.D.	N.D.	N.D.	0.23
MX3006	<i>gltB::</i> $\Omega$ <i>gltD::</i> Mu	<10	N.D.	46	23	0.1

Las actividades están expresadas en nmol. de producto formado por min por mg de proteína.

N-limit significa crecimiento en L-glutamina (1mg/ml) como fuente de nitrógeno.

glt significa crecimiento en L-glutamato (0.2%) como fuente de nitrógeno.

N.D. significa actividad no detectable.

Los valores mostrados son la media de al menos tres determinaciones. La desviación estándar es del 30% para GOGAT y de 25% para histidasa. La relación entre el valor de la silvestre y las mutantes se conserva en todos los experimentos realizados.

#### COMPLEMENTACION DEL ALELO *gltB225::* $\Omega$ CON DIFERENTES PLASMIDOS

Posteriormente se hicieron complementaciones de la cepa que contiene la mutación *gltB225::* $\Omega$  con varios plásmidos que contienen distintas partes de la región cromosomal *glt*. Los datos se muestran en la Tabla 4:

**TABLA 4.** Actividades enzimáticas de histidasa y GOGAT de la cepa *gltB225::Ω* complementada con diferentes plásmidos.

ACTIVIDAD ENZIMATICA						
CEPA	GENOTIPO	HISTIDASA		GOGAT		HISTIDASA en N-limit. Mut./Silv.
		N-limit	N-exceso	N-limit	N-exceso	
MX3001	Silv. <i>hutC*</i>	99	38	110	74	1
MX3002	<i>gltB225::Ω</i>	28	17	N.D.	N.D.	0.28
MX3002/pRSP21	<i>gltB*D*F*</i>	123	27	856	1122	1.24
MX3002/pGOP3	<i>gltB*</i>	47	35	57	52	0.47
MX3002/pGOL2	<i>gltD*</i>	<10	<10	N.D.	N.D.	0.1
MX3002/pGOG3	<i>gltF*</i>	<10	<10	N.D.	N.D.	0.1
MX3002/pGOP1	<i>gltB*D*F*</i>	37	45	40	41	0.37
MX3002/pRSP23	<i>gltB*D*F*</i>	53	27	1038	1095	0.53
MX3002/pPDF1	<i>gltD*F*</i>	89		N.D.		0.9

Las actividades estan expresadas en nmol. de producto formado por min por mg de proteina.

N.D. significa actividad no detectable.

Las actividades específicas son el promedio de al menos tres determinaciones con desviaciones estandard de 30% para GOGAT y de un 25% para histidasa.

La relación de actividad entre la silvestre y las mutantes se conserva en todos los experimentos realizados.

Como se observa en la Tabla 4, la cepa MX3002 no presentó actividad de GOGAT detectable y no indujo la síntesis de histidasa por crecimiento en limitación de nitrógeno como ya se había mostrado en la Tabla 3. Cuando a esta cepa se le transformó con el plásmido que contiene toda la región *glt* silvestre (pRSP21, Tabla 2), se restableció el

fenotipo Ntr<sup>+</sup>, es decir, indujo y reprimió la síntesis de histidasa por limitación y exceso de nitrógeno respectivamente. La actividad de GOGAT se encontró muy elevada en ambos cultivos posiblemente porque el plásmido pRSP21 se encuentra en multicopia (14). La complementación de la cepa MX3002 con el plásmido pGOP3 (*gltB*<sup>+</sup>) mostró un dato interesante: ésta cepa presentó aproximadamente la mitad de la actividad de GOGAT de la cepa silvestre, lo que indica que *gltD* se puede transcribir independientemente de *gltB*; además se conservó el fenotipo Ntr<sup>+</sup> de la cepa sin plásmido ya que presentó una actividad de histidasa de menos de la mitad que la silvestre. Esto muestra de una manera cuantitativa el dato ya reportado (14) en el que se observaba polaridad de la inserción *gltB225::Ω* sobre *gltF* y que se requería la transcripción elevada de éste gen para complementar el fenotipo de crecimiento Aut<sup>+</sup>. La complementación con el plásmido que solamente lleva *gltD*<sup>+</sup> (pGOL2), no presentó actividad ni de GOGAT ni de histidasa como se esperaba puesto que esta cepa no tiene forma de sintetizar la subunidad pesada de GOGAT, y la inserción cromosomal resulta polar sobre los genes que se encuentran hacia abajo.

Cuando se hizo la complementación de esta cepa con el plásmido que contiene *gltF* (pGOG3), claramente no hubo complementación para GOGAT, y sorprendentemente tampoco la hubo para inducción de histidasa. El plásmido pGOP1 (*gltB*<sup>+</sup>*D*<sup>+</sup>*F*<sup>+</sup>) ocasionó un fenotipo similar en la cepa que lleva el alelo *gltB225::Ω*; es decir que presentó actividad detectable de GOGAT pero no indujo la síntesis de histidasa en condiciones de limitación de nitrógeno. El plásmido que lleva una delección de 193 pb dentro del gen *gltF* (pRSP-23), si bien presentó una actividad de GOGAT muy alta (efecto multicopia) tampoco mostró niveles de inducción de histidasa. Solamente el plásmido pDF1 que codifica para *gltD*<sup>+</sup>*F*<sup>+</sup> fue capaz de complementar para el fenotipo Hut<sup>+</sup> aun en ausencia de actividad de GOGAT puesto que esta cepa no tiene el alelo silvestre *gltB*<sup>+</sup>. Estos datos indican que para que haya complementación total del fenotipo Ntr<sup>+</sup> se requiere una transcripción elevada de los genes *gltD*<sup>+</sup>*F*<sup>+</sup> desde el promotor de *gltB* y que la inserción del fragmento  $\Omega$  en *gltB* es polar sobre la transcripción de los genes *gltDF*; y por lo tanto no se alcanzan niveles suficientes de los productos de estos genes para inducir los sistemas Ntr.

### COMPLEMENTACION DEL ALELO *gltF1::Ω* CON DIFERENTES PLASMIDOS

Los datos de complementación de la cepa MX3003 que contiene el alelo *gltF1::Ω* se encuentran descritos en la Tabla 5

**TABLA 5:** Actividad enzimática de histidasa y GOGAT de la cepa que lleva el alelo *gltF::Ω* complementada con diferentes plásmidos.

ACTIVIDAD ENZIMATICA				
CEPA	HISTIDASA GENOTIPO	GOGAT N-limit	HISTIDASA Mut./Silv.	
MX3001	Silv. <i>hutC</i> <sup>+</sup>	85	105	1
MX3003	<i>gltF1::Ω</i>	35	86	0.41
MX3003/pGOG3	<i>gltF</i> <sup>+</sup>	80	118	0.94
MX3003/pGOP1	<i>gltB*D<sup>+</sup>F<sup>+</sup></i>	81	105	0.95
MX3003/pRSP21	<i>gltB*D<sup>+</sup>F<sup>+</sup></i>	110	853	1.29
MX3003/pRSP23	<i>gltB*D<sup>+</sup>F<sup>+</sup></i>	25	817	0.29

Las actividades están expresadas en nmol. de producto formado por min. por mg. de proteína.

N.D. significa actividad no detectable.

N-limit. significa crecimiento en glutamina 6.7mM como única fuente de nitrógeno.

Los valores mostrados son la media de al menos tres determinaciones. La desviación estandar es del 30% para GOGAT y hasta de 45% para histidasa. La relación entre el valor de la silvestre y las mutantes se conservan en todos los experimentos.

Como se observa en esta Tabla, la cepa MX3003 fue incapaz de inducir la síntesis de histidasa en condiciones de limitación de nitrógeno; la actividad de GOGAT que presentó esta cepa es igual a los niveles de la silvestre.

En este caso, todos los plásmidos que contienen región *gltF* silvestre, complementaron para la inducción de histidasa, incluyendo el plásmido pGOP1 (que no lleva el gen *gltD*<sup>+</sup>); ya que la mutación cromosomal está después de *gltD*, y la transcripción cromosomal es suficiente. El único plásmido que no complementó para el fenotipo Ntr<sup>+</sup> es el pRSP23 que lleva una deleción del fragmento interno de *SalI* de *gltF*. Esto otra vez indica que se requiere el producto silvestre de este gen para la complementación del fenotipo Ntr.

#### COMPLEMENTACION DEL ALELO *gltD*::MudIIPR13 CON DIFERENTES PLAS- MIDOS

Se transformó la cepa MX3004 que lleva el alelo *gltD*::MudIIPR13 con los plásmidos indicados y se determinaron las actividades enzimáticas que se muestran en la Tabla 6.

**TABLA 6:** Actividades Enzimáticas de histidasa, GOGAT y  $\beta$ -galactosidasa de la cepa *gltD*::MudIIPR13 complementada con diferentes plásmidos.

ACTIVIDAD ENZIMATICA					
CEPA	GENOTIPO	HISTIDASA	GOGAT	$\beta$ -galactosidasa	HISTIDASA
		N-limit	N-limit	N-limit	Mut./Silv.
MX3001	Silv. <i>hutC</i> $\Delta$ ( <i>lac</i> )	92	99	N.D.	1
MX3004	<i>gltD</i> ::MudII	34	N.D.	196	0.36
MX3004/pGOL2	<i>gltD</i> <sup>+</sup>	39	31	88	0.42
MX3004/pGOG3	<i>gltF</i> <sup>+</sup>	31	N.D.	114	0.33
MX3004/pRSP21	<i>gltB</i> <sup>+</sup> <i>D</i> <sup>+</sup> <i>F</i> <sup>+</sup>	153	753	17	1.66
MX3004/pRSP23	<i>gltB</i> <sup>+</sup> <i>D</i> <sup>+</sup> <i>F</i> <sup>-</sup>	48	586	99	0.5
MX3004/pRSP24	<i>gltB</i> <sup>+</sup> <i>D</i> <sup>+</sup> <i>F</i> <sup>+</sup> :: $\Omega$	28	1252	84	0.3

Las actividades estan expresadas en nanomol. de producto formado por min. por mg. de proteina.

N-limit. significa crecimiento en L-glutamina (1 mg/ml) como fuente de nitrogeno

N.D. Significa actividad no detectable

Los valores mostrados son la media de al menos tres determinaciones. La desviación estandard es del 30% para GOGAT y de 25% para histidasa; para  $\beta$ -galactosidasa la desviación es menor del 20%.

Los datos presentados en la Tabla 6, muestran que la inserción del fago MudIIPR13, en el gen *gltD*, produjo fenotipo Ntr<sup>-</sup> puesto que la síntesis de histidasa no se indujo en respuesta a limitación de nitrógeno; esta inserción ocasionó también pérdida de la actividad de GOGAT; y dado que es una fusión traduccional del gen *lacZ* con *gltD*, presentó actividad de  $\beta$ -galactosidasa, cuya expresión se reprimió por crecimiento en glutamato como fuente de nitrógeno (Tabla 3). La complementación de la cepa que lleva esta fusión con el plásmido que lleva el gen *gltD*<sup>+</sup> permitió la síntesis de la enzima GOGAT a niveles detectables aunque más bajos que la silvestre; sin embargo, la presencia de *gltD*<sup>+</sup> solamente no es suficiente para complementar la inducción de histidasa. La expresión de  $\beta$ -galactosidasa en condiciones de crecimiento en glutamina, se disminuyó aproximadamente a la mitad. La cepa MX3004 complementada con pGOG3 (*gltF*<sup>+</sup>), no presentó actividad detectable de GOGAT tal como se espera, y la actividad de  $\beta$ -galactosidasa fue también aproximadamente la mitad de la que presentó la cepa sin plásmido. El plásmido pRSP21 (*gltB*<sup>+</sup>*D*<sup>+</sup>*F*<sup>+</sup>) fue capaz de complementar para el fenotipo Ntr<sup>-</sup> y presentó una actividad de GOGAT característica de cepas que contienen la región *glt* silvestre en multicopia. Con respecto a la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de esta cepa, se vió una represión de aproximadamente 10 veces con respecto a la cepa sin plásmido en cultivos con glutamina como fuente de nitrógeno.

La transformación de la cepa con el plásmido pRSP23 *gltB*<sup>+</sup>*D*<sup>+</sup>*F*<sup>+</sup> resultó en actividad multicopia de GOGAT, pero no se complementó para inducción de histidasa; interesante-mente, este plásmido no produjo represión considerable de  $\beta$ -galactosidasa (como sucedió con pRSP21) en estas condiciones, aunque la expresión se redujo aproximadamente a la mitad como sucedió con los demás plásmidos probados. Por último se probó el plásmido pRSP24 (*gltB*<sup>+</sup>*D*<sup>+</sup>*gltF1*:: $\Omega$ ) para determinar las actividades enzimáticas. Como se ve en la Tabla 6, este plásmido también presentó actividad elevada de GOGAT, y se conservó el fenotipo Ntr<sup>-</sup> puesto que no hubo inducción de histidasa. En esta cepa tampoco se observó

una represión marcada de  $\beta$ -galactosidasa (este plásmido se comportó de manera semejante a pRSP23); sino que se redujo también aproximadamente a un 45% de la actividad que presentó la cepa sin plásmido.

## DISCUSION

La enzima glutamato sintasa (GOGAT) de *Escherichia coli* cataliza la síntesis de dos moléculas de glutamato a partir de glutamina y  $\alpha$ -cetoglutarato. Está compuesta por dos subunidades diferentes codificadas por los genes *gltB* y *gltD* (27) que se encuentran contiguos en el cromosoma, probablemente formando un operón; estos genes ya se han clonado (22) en un fragmento de DNA cromosomal de 8.55 Kb aproximadamente. Anteriormente se había reportado (42) que mutaciones que abarcan la síntesis de GOGAT conferían también otros fenotipos: *Ntr*<sup>-</sup>, es decir incapacidad de utilizar como fuente de nitrógeno aminoácidos cuyos productos de degradación son amonio o glutamato (por ejemplo arginina o prolina); y el fenotipo *Gsd*<sup>-</sup> que significa incapacidad de desreprimir la síntesis de la enzima glutamino sintetasa (GS) por crecimiento en glutamina, que es una fuente de nitrógeno limitante (10).

En *E.coli* solamente se había descrito una mutación que resultaba en pérdida de la actividad de GOGAT que es el alelo *gltB31* que lleva la cepa PA340 (42), y que posteriormente se estableció que esta cepa contiene al menos dos mutaciones, una delección del operón, y una mutación aparentemente en un regulador positivo de la síntesis de GOGAT (I.Castaño Tesis de Maestría). Se construyó una cepa que contiene el alelo *gltB225:: $\Omega$*  y, como se describe en la sección de Antecedentes y Objetivos de este trabajo, el estudio de la complementación de esta cepa con diferentes plásmidos, nos permitió observar que es posible que una cepa tenga niveles de GOGAT parecidos a la cepa silvestre, y que sin embargo conserve el fenotipo *Ntr*<sup>-</sup>; es decir, que este fenotipo no se debe a la ausencia de actividad de GOGAT. Este dato planteó la posibilidad de la existencia de otro gen hacia abajo de *gltD* cuya expresión se requiere para la inducción de los sistemas *Ntr*.

### 1. Los genes de GOGAT se encuentran formando un operón con el gen *gltF*

Como se observa en el artículo presentado en esta tesis, los genes *gltB* y *gltD* se encuentran formando un operón con el gen *gltF* puesto que se detecta un RNA mensajero de aproximadamente 7.5 Kb que abarca los tres genes del operón. La inserción del fragmento  $\Omega$  en *gltB* impide la síntesis de este transcrito lo que apoya la idea de que la

región *glt* se comporta como un operón. La subclonación del fragmento cromosomal que está hacia abajo de *gltD* nos permitió identificar el producto de *gltF* como una proteína de 30.2 Kd aproximadamente; este dato concuerda bastante bien con la estimación de PM obtenida por los datos de secuencia (26.4 Kd) hechos en el laboratorio del Dr.F. Bolívar.

2. Se requiere de los genes *gltD* y *gltF* para la complementación de los fenotipos *Aut*<sup>+</sup> y *Gsd*<sup>+</sup>.

Con respecto a la complementación de los fenotipos conferidos por la mutación *gltB225::Ω*, se observó que solamente el plásmido pRSP21(*gltBDF*<sup>+</sup>) fue capaz de complementar para los tres fenotipos que confiere la mutación, es decir *Ntr*<sup>+</sup>, *Gsd*<sup>+</sup> y GOGAT<sup>+</sup>. Los plásmidos pGOG3 (*gltF*<sup>+</sup>), pGOG1 (*gltF*<sup>+</sup>) y pGOP1 (*gltB<sup>+</sup>D<sup>+</sup>F<sup>+</sup>*) complementaron a la cepa que lleva el alelo *gltB225::Ω* para el fenotipo *Ntr*<sup>+</sup>, medido como crecimiento en arginina como fuente de nitrógeno (*Aut*), sin embargo, este no es un método cuantitativo ni exacto puesto que las cepas requieren ciertos aminoácidos, que al agregárselos al medio pueden permitir cierto crecimiento que posiblemente nos llevó a considerar falsas positivas, y no necesariamente indicaba que en estas cepas hay una inducción de las enzimas sujetas a control por *Ntr*. Como se ve en la Tabla 2 del artículo, cepas que no expresan niveles silvestres de *gltD* y *gltF* no se complementaron para el fenotipo *Gsd*<sup>+</sup>, como es el caso de la cepa MX1176 (*gltB225::Ω*) complementada con cualquiera de los genes del operón por separado: pGOP3, pGOL2 y pGOG3; solamente el plásmido completo pRSP21, que lleva la región *glt* silvestre, complementó para ambos fenotipos *Aut*<sup>+</sup> y *Gsd*<sup>+</sup>. Por lo tanto, esto permitió suponer que posiblemente se requiera tanto de la expresión de *gltD* como de *gltF* en cantidades elevadas para complementar el fenotipo *Gsd*<sup>+</sup> y posiblemente también la inducción de enzimas *Ntr*. Estos niveles probablemente no se alcanzan cuando la expresión es a partir del promotor propuesto para *gltD* en el caso de la mutación *gltB225::Ω*. Cuando se complementó la cepa MX988Δ(*gltBDF*), con los plásmidos pGOG1 y pGOP1 estos no complementaron para los fenotipos *Ntr*<sup>+</sup> y *Gsd*<sup>+</sup> ni tampoco para actividad de GOGAT lo que pareciera apoyar la idea de que se requería de la presencia de la molécula de glutamato sintasa, o bien la subunidad ligera (codificada por *gltD*<sup>+</sup>) además de *gltF*<sup>+</sup>, para la inducción de los sistemas *Ntr*. En los casos anteriores, la cepa que lleva el alelo *gltB225::Ω* complementada con pGOP1, presentó actividad detectable de GOGAT y por lo tanto,

significa que hay una expresión, aunque disminuida, del gen *gluD* cromosomal, tal vez por esta razón esta cepa presentó fenotipo *Aut*<sup>+</sup>, sin embargo era posible que no hubiera inducción real de las enzimas *Ntr*; de hecho, esta cepa no se complementó para el fenotipo *Gsd*<sup>+</sup> (Tabla 2 del artículo, cepa MX1176(pGOP1)). En realidad, la enzima GS está también sujeta a control por nitrógeno, y en este sentido es una enzima *Ntr*, sin embargo, dado que la región regulatoria adyacente al gen estructural de esta enzima (*glnA*) tiene dos sitios de alta afinidad por el producto de *glnG* (NR<sub>1</sub>) (48) que es el activador indispensable de los sistemas *Ntr*, se ha descrito que se requieren muy bajas concentraciones de NR<sub>1</sub> para activar totalmente la transcripción de *glnA* (40, 41), contrario a lo que sucede para activar los operones catabólicos de arginina, prolina, histidina, etc. en los que se requiere una elevada cantidad de NR<sub>1</sub> que solo se alcanza cuando la transcripción se inicia en el promotor fuerte del operón: *glnAp<sub>2</sub>* (40, 47, 48). Es por esta razón que se mantiene una diferencia entre los fenotipos *Ntr* y *Gsd*. Tomando en cuenta estas consideraciones, era necesario reevaluar el fenotipo *Ntr* cuantitativamente utilizando la actividad enzimática de histidasa (*hutH*) de *K. aerogenes* que además lleva la mutación en el gen *hutC* que permite que la expresión de histidasa sea independiente de la inducción por histidina, y solamente responda a regulación por nitrógeno (28): una cepa silvestre, presenta actividad de histidasa 3 veces mayor que una cepa que contenga una mutación en alguno de los genes involucrados en la regulación de los sistemas *Ntr* (40).

### 3. Mutaciones por inserción en cualquiera de los genes del operón ocasiona fenotipo *Ntr*

Con el objeto de averiguar el papel de *gluF* en la inducción de los sistemas *Ntr*, se determinó actividad de histidasa en cepas de *E. coli* que llevan el operón *hutC*<sub>Klebs.</sub>. Se recombinaron en el cromosoma las mutaciones *gluF1::Ω* y *gluD::MudIIPR13*, y se determinó su fenotipo.

En la sección de Resultados Adicionales de esta tesis, en la Tabla 3, se observa que las tres mutaciones aisladas en cada uno de los tres genes del operón *glu* ocasionaron un fenotipo *Ntr*<sup>+</sup> es decir no indujeron la síntesis de histidasa por crecimiento en una fuente limitante de nitrógeno como es glutamina; y la diferencia entre las mutantes y la silvestre, es entre 3 y 4 veces menos actividad enzimática en las mutantes, tal como se había reportado (40). Por los datos descritos en el artículo, se sabe que la razón por la cual el

alelo *glbB225::Ω* confiere el fenotipo Ntr<sup>-</sup> es que la inserción del fragmento  $\Omega$  en *glbB* resulta polar sobre la transcripción del resto del operón. La cepa que contiene el alelo *glbD::MudiIPR13*, también fue incapaz de inducir la síntesis de histidasa, en este caso también puede explicarse porque la inserción del fago MudiIPR13 es polar sobre la transcripción de *glbF* y/o porque se requiere de una transcripción silvestre de *glbD*; a esto me referiré más adelante. El hecho de que la cepa MX3003 (*glbF1::Ω*) también presentó fenotipo Ntr<sup>-</sup> indica que se requiere de la presencia de *glbF*<sup>+</sup> para obtener una inducción adecuada de histidasa.

#### 4. Es necesaria la transcripción elevada de *glbD* y *glbF* para la inducción de histidasa

Tanto en el artículo como en los datos presentados en la Tabla 4 se muestra el experimento de complementación por pGOP3 (*glbB*<sup>+</sup>) de las cepas que llevan el alelo *glbB225::Ω* (MX1176 y MX3002) y como se observa en los resultados, este plásmido fue capaz de complementar para actividad de GOGAT aunque en niveles menores (aproximadamente el 50%, Tabla 3) que la cepa silvestre; en estas condiciones, se observó que la actividad de histidasa no se indujo, es decir, a pesar de que la cepa presentó niveles medios de GOGAT, no se complementó para el fenotipo Ntr<sup>-</sup>; esto además permite concluir que no es la actividad de GOGAT por sí sola, ni tampoco la subunidad pesada (*glbB*<sup>+</sup>) las responsables del fenotipo Ntr<sup>-</sup>. En esta misma tabla, se reportan los datos de complementación de la cepa MX3002 (*glbB225::Ω*) con los plásmidos pGOL2 (*glbD*<sup>+</sup>), pGOG3 (*glbF*<sup>+</sup>) y pGOP1 (*glbB*<sup>+</sup>*D*<sup>+</sup>*F*<sup>+</sup>), ninguno de estos fue capaz de complementar para inducción de histidasa, todas las cepas presentaron de un 10% a un 35% aproximadamente de la actividad de histidasa que presentó la cepa silvestre MX3001. Estos resultados permiten concluir que ni *glbD*<sup>+</sup> ni *glbF*<sup>+</sup> por sí solos son capaces de complementar para el fenotipo Ntr<sup>-</sup>. Aparentemente se requiere de que se transcriban en altos niveles tanto *glbD*<sup>+</sup> como *glbF*<sup>+</sup>. Para probar si ésto es lo que realmente está sucediendo, en la Tabla 4 se incluyen los datos de complementación de la cepa MX3002 (*glbB225::Ω*) con los plásmidos pDF1 (*glbD*<sup>+</sup>*F*<sup>+</sup>), pRSP21 (*glbB*<sup>+</sup>*D*<sup>+</sup>*F*<sup>+</sup>), y pRSP23 (*glbB*<sup>+</sup>*D*<sup>+</sup>*F*<sup>+</sup>); es interesante notar que el plásmido pDF1 sí complementó para inducción de histidasa, aún en ausencia de actividad de GOGAT puesto que esta cepa no tiene un gen *glbB*<sup>+</sup>. Esto establece que la transcripción elevada de estos genes es necesaria para la inducción adecuada de las enzimas Ntr. El

experimento con el plásmido pRSP23 que lleva una delección de un fragmento de *SalI* (de aproximadamente 200pb) interno de *gltF*, y que por lo tanto no tiene el producto de este gen, muestra que tampoco se indujo la síntesis de histidasa por crecimiento en limitación de nitrógeno; sin embargo el plásmido pRSP21 que lleva la región *glt* silvestre, fue capaz de inducir la síntesis de histidasa en cultivos hechos en glutamina, así como de reprimirla en cultivos hechos en exceso de nitrógeno. En el caso de la cepa MX3003 que lleva el alelo *gltF1::Ω*, como se muestra en la Tabla 5, esta cepa también presentó fenotipo Ntr<sup>+</sup> ya que no fue capaz de inducir la síntesis de histidasa, sin embargo, a esta cepa sí se le pudo complementar con todos los plásmidos utilizados, excepto con pRSP23 que no lleva el alelo silvestre de *gltF*, pero la complementación con pGOG3 (*gltF*<sup>\*</sup>), pGOP1 (*gltB*<sup>\*</sup>*D*<sup>\*</sup>*F*<sup>\*</sup>) y pRSP21 (*gltB*<sup>\*</sup>*D*<sup>\*</sup>*F*<sup>\*</sup>), indican que la razón por la cual la cepa MX3003 es Ntr<sup>+</sup>, es solamente porque no puede sintetizar el producto de *gltF*, y cualquier plásmido que lleve este gen silvestre es capaz de complementar para Ntr<sup>+</sup>. El plásmido pRSP23 no complementó para este fenotipo porque no tiene el gen *gltF* silvestre. Cuando a la cepa MX3004 se le complementó con pGOL2 (*gltD*<sup>\*</sup>), se sintetizaron niveles detectables de GOGAT, aunque solamente se llega aproximadamente a un 30% de la actividad que presenta la silvestre. Este plásmido fue incapaz de complementar para el fenotipo Ntr<sup>+</sup>, ya que presentó una actividad de histidasa muy parecida a la cepa sin plásmido. La misma cepa complementada con pGOG3 (*gltF*<sup>\*</sup>) tampoco presentó niveles inducidos de histidasa, y como se espera, no presentó actividad detectable de GOGAT. Otra vez, cuando se transformó a la cepa MX3004 con pRSP21 (*gltB*<sup>\*</sup>*D*<sup>\*</sup>*F*<sup>\*</sup>) (Tabla 6), se obtuvo complementación total para el fenotipo Ntr<sup>+</sup>, así como una actividad de GOGAT característica de cepas con el plásmido en multicopia. Interesantemente, los plásmidos pRSP23 (*gltB*<sup>\*</sup>*D*<sup>\*</sup>*F*<sup>\*</sup>) o pRSP24 (*gltB*<sup>\*</sup>*D*<sup>\*</sup>*F*<sup>\*</sup>1::Ω), fueron incapaces de complementar a esta cepa para el fenotipo Ntr<sup>+</sup> aún en presencia de alta actividad de GOGAT (Tabla 6); este dato claramente apoya la hipótesis de que el producto silvestre de *gltF* se requiere para la inducción de los sistemas Ntr.

El resto de los experimentos en los que no se complementa el fenotipo Ntr<sup>+</sup>, las cepas presentaron aproximadamente los mismos niveles de histidasa en crecimiento tanto en limitación como en exceso de nitrógeno.

Con respecto a la actividad de GOGAT que presentan cada una de las mutaciones aisladas en el operón se observa que las dos mutaciones localizadas o en *gltB* o en *gltD*

perdieron la actividad de esta enzima; en el caso de la mutación en *glfF* se observa en las Tablas 3 y 5 que la cepa MX3003 presentó niveles silvestres de GOGAT en estas condiciones. La actividad de GOGAT que presentaron las cepas MX3002, MX3003 y MX3004, complementadas con pRSP21, o pRSP23, se observó una expresión cerca de 10 veces más elevada que la cepa sin plásmido; esto probablemente se deba a que estos plásmidos se encuentran en multicopia, sin embargo esto no alteró la inducción de histidasa. Las actividades de GOGAT que presentó la cepa MX3003 complementada con pGOG3 o pGOP1 en estas condiciones, son casi iguales que la cepa sin plásmido, ya que ninguno de los dos plásmidos lleva los dos genes que codifican para las subunidades pesada y ligera respectivamente (*glfBD*), y no se alteró la cantidad de GOGAT que se sintetizó. En el caso de la cepa MX3002, como ya se mencionó cuando se complementó con los plásmidos pGOL2 (*glfD\**) o pGOG3 (*glfF\**) no presentó actividad de GOGAT, sin embargo los plásmidos pGOP3 (*glfB\**) y pGOP1 (*glfB\*D'F\**), presentaron la mitad de la actividad de GOGAT que presenta la silvestre.

Como las cepas MX1176, o MX3002 llevan el alelo *gdh1*, y por lo tanto son auxótrofas de glutamato, se introdujo por transducción a la cepa MX3002 el alelo *gdhA\**, con el objeto de saber si el aumentar los niveles intracelulares de glutamato afectaba de una manera significativa la inducción de histidasa. El resultado fue que la cepa que presenta actividad de glutamato deshidrogenasa (GDH), se comportó igual que la cepa inmediata anterior que no posee actividad de GDH (MX3002), datos no mostrados.

##### 5. Aparentemente existe un promotor entre los genes *glfB* y *glfD*

Dado que la inserción del fago MudIIIPR13 creó una fusión traduccional del gen *lacZ* con *glfD* se utilizó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de esta cepa como monitor de la expresión de *glfD*. Como ya se había demostrado que es posible transcribir, aunque en menor medida, el gen *glfD* a partir de un promotor diferente del de *glfB* (Ver artículo Tabla 2 cepa MX1176(pGOP3), y Tabla 4 de resultados adicionales cepa MX3002/-pGOP3), se determinó actividad de  $\beta$ -galactosidasa en la cepa MX3006, que además de llevar el alelo *glfD*::MudIIIPR13, lleva también la inserción polar *glfB225*:: $\Omega$ , para cuantificar solamente la expresión del promotor propuesto entre *glfB* y *glfD*. Como se observa en la Tabla 3, la cepa MX3006 presentó aproximadamente la cuarta parte de la actividad

que presentó la cepa inmediata anterior (MX3004), donde la expresión de *gluD* viene desde el promotor de *gluB* y por lo tanto, la expresión mayoritaria del operón es desde este promotor. La expresión del promotor de *gluD* (*gluDp*) parece reprimirse ligeramente por crecimiento en glutamato (alrededor de 2 veces).

#### 6. La represión del operón por glutamato posiblemente está mediada por el producto de *gluF*

En la Tabla 3 se observa que la expresión de *gluD* medida como la expresión de  $\beta$ -galactosidasa de la cepa MX3004 (*gluD::MudIIPR13*) a partir de la fusión traduccional de *lacZ* con *gluD*, se reprimió aproximadamente 4 veces por crecimiento en glutamato, tal como se espera; ésta represión quizá es menor que la que se observa cuando se cuantifica actividad de GOGAT en cultivos hechos en glutamato (aproximadamente 10 veces menor actividad que en cultivos en amonio o glutamina) o cuando se observa cantidad de transcrito específico de GOGAT (ver Figura 2 del artículo). Esto puede deberse a que para que haya una adecuada represión del operón por crecimiento en glutamato se requiera del o los productos de *gluD\** y/o *gluF\**. La actividad de  $\beta$ -galactosidasa que presentó la cepa MX3004, fue de aproximadamente 200 nmol/producto formado/min/mg de proteína (Tabla 6). La complementación de esta cepa con los plásmidos pGOL2 (*gluD\**), pGOG3 (*gluF\**), pRSP23 (*gluB\*D\*F\**) y pRSP24 (*gluB\*D\*F1:: $\Omega$* ), reveló que todos presentan aproximadamente la mitad de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa que tiene la cepa sin plásmido, independientemente de si presentan o no actividad de GOGAT como es el caso de pRSP23 y pRSP24. El caso de la complementación con pRSP21, mostró un dato interesante: la actividad de  $\beta$ -galactosidasa fue aproximadamente 10 veces menor en estas condiciones que la cepa sin plásmido (Tabla 6). El hecho de que los dos plásmidos equivalentes pRSP23 y pRSP24, no ocasionaron una represión de la expresión de  $\beta$ -galactosidasa (y por lo tanto de *gluD*), indica que se requiere del producto de *gluF* para ejercer la represión observada en estas condiciones con el plásmido pRSP21. El hecho de que la cepa con el plásmido pGOG3 que lleva *gluF\** no se observara ésta represión, puede indicar por un lado que también para ésta función se requiera del producto tanto de *gluD* como del de *gluF*, o bien que solo se requiera del producto de éste último gen, pero solamente en condiciones en las que existan altos niveles de glutamato intracelular como sería el caso de los plásmidos pRSP21,

pRSP23 y pRSP24, que presentaron muy altos niveles de actividad de GOGAT. Es posible entonces que la represión de la síntesis del transcrito de GOGAT por glutamato, que nosotros observamos, y que están de acuerdo con observaciones previas (9, 51), estén mediadas por el producto de *gltF* y posiblemente también por el de *gltD* es decir la subunidad ligera de GOGAT. Desde luego se deben hacer determinaciones enzimáticas de  $\beta$ -galactosidasa en cultivos crecidos en glutamato como única fuente de nitrógeno, para probar esta hipótesis y establecer qué productos génicos intervienen en esta regulación. Es posible que además haya una autoregulación de este operón mediada por los mismos productos, ya que cuando se complementa a esta cepa con los plásmidos que llevan por separado los genes del operón, hay una reducción del 50% en la actividad de  $\beta$ -galactosidasa; esto no parece depender de los niveles intracelulares de glutamato puesto que la represión se observa aún en ausencia de actividad de GOGAT como en el caso de la complementación con pGOP3. Esta es la primera evidencia de la existencia de un posible represor del operón *gltBDF*.

#### 7. Propuesta de un sistema general de regulación.

En el contexto de la evidencia que existe de que los genes de GOGAT se encuentran formando un operón complejo, y que tanto el último gen, *gltF* como el que codifica para la subunidad ligera de GOGAT, *gltD*, parecen tener un papel regulatorio importante en la asimilación de nitrógeno, y posiblemente también en la regulación de la síntesis del propio operón; quiero proponer un modelo fisiológico que explique los datos que se tienen por el momento.

Como ya se mencionó en la Introducción, las respuestas adaptativas de las bacterias a cambios en el medio, generalmente están mediadas por sistemas de dos componentes (1, 30, 50, 53). Para el caso de la respuesta a la accesibilidad de nitrógeno, se sabe que los reguladores son los productos del gen *glnL* ( $NR_{II}$ ) y *glnG* ( $NR_I$ ) que son el sensor (cinasa) y el regulador respectivamente; además de la subunidad  $\sigma^{54}$  específica para genes regulados por la accesibilidad de nitrógeno que está codificada por el gen *glnF*.  $NR_{II}$  es uno de los dos sensores (el otro es CheA, 30), que no contienen dominio transmembranal, y que por lo tanto son citoplásmicas y deben recibir la señal de la disponibilidad de nitrógeno a través de otro componente; ya se ha propuesto que en este caso el producto del gen *glnA*,

la glutamino sintetasa, sea el sensor primario que genera una señal intracelular (la glutamina) que se transfiere a  $NR_{II}$  a través de las proteínas Uridiltransferasa y  $P_{II}$  (1, 30). La proteína  $NR_{II}$  probablemente actúe en condiciones medias de represión donde se observa que se requiere esta proteína para reprimir totalmente (11) la transcripción del gen *glnA*, y tal vez  $NR_{II}$  es muy sensible a la información de la cantidad intracelular de glutamina que le proporciona  $P_{II}$  en su forma no uridilada y por lo tanto catalice principalmente la desfosforilación de  $NR_I$ ; esto se ve apoyado porque algunas mutantes aisladas en *glnL*, presentaban un fenotipo en el que la célula no reprimía la síntesis de GS por crecimiento en altas concentraciones de amonio (11), y otro tipo de mutaciones son las que resultan en una alteración tal en  $NR_{II}$  que pierde la capacidad de desfosforilar a  $NR_I$ , y esto ocasiona un fenotipo constitutivo tanto de la síntesis de GS como de los sistemas Ntr aun en presencia de amonio en el medio (37). Parece que la actividad más evidente de  $NR_{II}$  es la desfosforilación de  $NR_I$ , ya que el efecto más claro es que la síntesis de GS no se reprime en ausencia de  $NR_{II}$ , y sin embargo hay inducción total del operón *hut<sub>Klebs</sub>* (3). De hecho inicialmente se había propuesto que el producto de *glnL* reprimía la síntesis de GS (32). Se sabe además que ausencia total de la proteína  $NR_{II}$  por delección del gen que la codifica *glnL*, permite una regulación, aunque más lenta, de la síntesis de GS, e inducción total de los sistemas Ntr aún en exceso de nitrógeno (3, 15). El hecho de que  $NR_{II}$  sea dispensable, sugiere que existe alguna otra enzima en la célula capaz de sustituir en ciertas condiciones a esta proteína; de hecho, recientemente se ha publicado (36) que en experimentos hechos *in vitro* la cinasa que regula la respuesta quimiotáctica, CheA, puede fosforilar (aunque mucho menos eficientemente) a la proteína  $NR_I$ , responsable de la transcripción de los sistemas Ntr; también  $NR_{II}$  puede fosforilar a la proteína CheY que interacciona con el motor del flagelo para controlar el comportamiento de nado; lo que indica que los sensores, que generalmente son proteínas que tienen actividad de cinasa, tienen especificidades cruzadas.

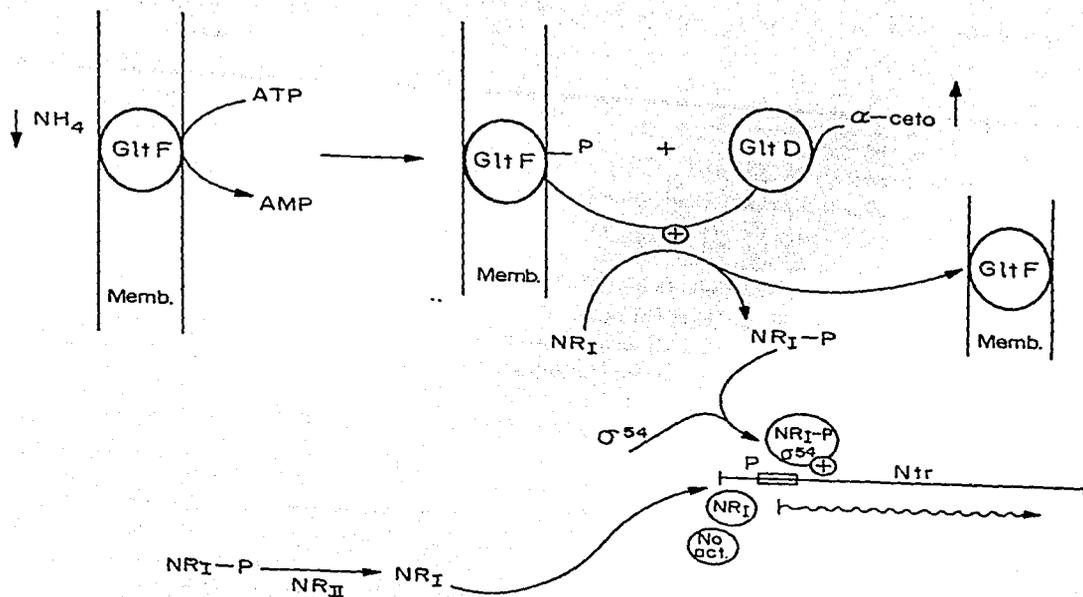
Los mecanismos de control de la síntesis de GOGAT, y los que controlan al regulón Ntr (controlado por  $NR_I$ ,  $NR_{II}$  y  $\sigma^{54}$ ) posiblemente estén relacionados puesto que el fenotipo Ntr característico de mutaciones en el operón *gluBDF*, se puede suprimir por segundas mutaciones en *glnL* que al mismo tiempo confieren constitutividad para la síntesis de GS (42, 49) (fenotipo GlnC).

Por otra parte datos de secuencia de *glfF* obtenidos por Noemí Flores en el laboratorio del Dr. F. Bolívar, han revelado la existencia de un posible péptido señal, y un probable dominio transmembranal; además también se encontró un posible sitio de unión a ATP, revelado por similitud con la secuencia consenso de una región conservada en proteínas eucarióticas que se fosforilan; recientemente se ha podido encontrar tres regiones conservadas entre las cinasas procarióticas (generalmente sensores) (53), y es posible encontrar homología entre estas tres regiones ya reportadas, con zonas equivalentes de la secuencia de aminoácidos deducida para *glfF*.

Considerando todos estos datos, el modelo que propongo es el siguiente: El producto de *glfF* se encontraría en membrana, y en condiciones fisiológicas de limitación de nitrógeno, inicialmente el producto de *glfF* detectaría la escasez de amonio en el medio; probablemente porque, o bien no puede unir amonio dado que está limitante, o bien porque une algún aminoácido cuya degradación provee de amonio o glutamato y que se considera limitante (como son arginina o prolina). En esta situación, GltF se fosforilaría siempre que también se encuentre la subunidad ligera de GOGAT "activada" por altas concentraciones de  $\alpha$ -cetoglutarato intracelular, indicativas de limitación de nitrógeno. GltF fosforilado donaría su fosfato a  $NR_I$ , lo cual lo volvería activo para inducir la síntesis de las enzimas Ntr. En condiciones de exceso de amonio en el medio, GltF podría unirlo, y esto probablemente impediría que se fosforile, y además, la subunidad ligera no estaría activada dado que no habría niveles suficientes de  $\alpha$ -cetoglutarato. En este caso,  $NR_{II}$  catalizaría principalmente la desfosforilación de  $NR_I$ , volviéndolo inactivo para inducir la síntesis de los genes controlados por Ntr. Es decir, se propone que *glfF* sea una proteína regulatoria análoga a  $NR_{II}$ , esto es, podría ser la contraparte transmembranal de ésta, y GltF actuaría sustituyendo a  $NR_{II}$  bajo condiciones de altas pozas intracelulares de  $\alpha$ -cetoglutarato, catalizando la interconversión de  $NR_I$  a  $NR_I$ -fosforilado. Esto explicaría por qué el producto de *glnL* es totalmente dispensable para la inducción de GS así como de las enzimas que pertenecen al regulón Ntr. Se propone que el papel de la subunidad ligera sea el de transmitir la información con respecto a las pozas intracelulares de  $\alpha$ -cetoglutarato ya que esta subunidad probablemente une este compuesto (31, 35), (ver esquema 3).

Existe la posibilidad de que el producto de *glfF* directamente fosforile a  $NR_{II}$ , o bien que done su fosfato a  $NR_{II}$ , y éste finalmente integre la información proveniente tanto del

# ESQUEMA DEL MODELO DE REGULACION PROPUESTO



producto de *glitF* como de la proteína  $P_{II}$ , y se la transmite al regulador final que es  $NR_I$ . Los datos de mutaciones supresoras del fenotipo  $Ntr^+$  (de mutaciones en el operón *glitBDF*), que se localizan en *glnL* ( $NR_{II}$ ), pudieran apoyar la idea de que el producto de *glitF* actúe a través de  $NR_{II}$ ; sin embargo el hecho de que esta proteína es totalmente dispensable para la inducción de histidasa permite suponer que el producto de *glitF* puede fosforilar a  $NR_I$  directamente; y las mutaciones supresoras en el gen *glnL* revierten el fenotipo  $Ntr^+$  porque el producto  $NR_{II}$  mutante, mantiene constantemente fosforilado a  $NR_I$  y se vuelve dispensable la presencia del gen *glitF*.

Todavía se tienen que hacer más experimentos para probar esta hipótesis, que por una parte presupone que una cepa que contuviera mutaciones que ocasionaran pérdida del producto tanto de *glnL* como de *glitF* serían incapaces de inducir la síntesis de histidasa por crecimiento en limitación de nitrógeno, puesto que no habría ningún sensor que bajo el estímulo apropiado, activara por fosforilación a  $NR_I$ . Otra predicción de ésta hipótesis, es que el producto de *glitF* es en realidad capaz de autofosforilarse, y posteriormente fosforilar a  $NR_I$  o bien a  $NR_{II}$ ; probablemente en presencia de la subunidad ligera de GOGAT. Por último, también deben hacerse experimentos dirigidos a esclarecer el mecanismo de represión por glutamato a la que está sujeto el operón *glitBDF*, y qué productos génicos están involucrados en este proceso; así como cuales elementos de la región regulatoria de *glitB* se requieren para la represión.

Aparentemente se requiere del producto de *glitF* para observar la represión producida por alto glutamato intracelular, pero es posible que esto sea un efecto indirecto, es decir que el producto de *glitF* generaría una señal (posiblemente por fosforilación) que produciría la represión cuando haya una alta poza intracelular de glutamato (y seguramente la poza de  $\alpha$ -cetoglutarato se encontraría baja en estas condiciones). También pudiera ser que *glitF* directamente sea un represor del operón al que pertenece aunque quizá esto es menos probable ya que el producto de *glitF* posiblemente está embebido en la membrana.

Por último quisiera hacer notar que existe evidencia de que hay un regulador positivo en la síntesis de GOGAT (I. Castaño Tesis de Maestría); y este activador se encuentra localizado en la misma región cromosomal (min 69 del mapa cromosómico) que los genes estructurales de GOGAT; experimentos preliminares que se están llevando a cabo en el laboratorio parecen indicar que el plásmido pRSP21 que lleva la región cromosomal

originalmente aislada (14, 16) lleva tanto los productos génicos necesarios para reprimir como para activar la síntesis de GOGAT.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## CONCLUSIONES

La sección de Resultados de esta tesis permite trazar las siguientes conclusiones:

- 1) Los genes estructurales de la enzima GOGAT se encuentran formando un operón complejo con un tercer gen *gltF*, cuyo producto está involucrado con la inducción de los sistemas Ntr.
- 2) Existe al menos un transcrito grande de aproximadamente 7.5 Kb, reprimible por crecimiento en glutamato, que abarca los tres genes del operón.
- 3) Una mutación polar por inserción en el primer gen del operón *gltB* ocasiona pérdida del transcrito grande.
- 4) El producto de *gltF* se identificó como una proteína de aproximadamente 30 Kd.
- 5) Existe otro promotor, aunque más débil, entre los genes que codifican para la subunidades pesada y ligera de GOGAT (*gltB* y *gltD*).
- 6) Mutaciones por inserción que se localicen en cualquiera de los tres genes del operón, ocasionan fenotipo Ntr<sup>-</sup>.
- 7) El fenotipo Ntr<sup>-</sup> ocasionado por estos alelos sólo se complementa por plásmidos que llevan tanto *gltD*<sup>+</sup> como *gltF*<sup>+</sup>.
- 8) La transcripción proveniente del promotor secundario entre *gltB* y *gltD* no es suficientemente fuerte como para proveer las concentraciones intracelulares necesarias de cada producto para complementar para el fenotipo Ntr<sup>+</sup>. En la cepa silvestre estas concentraciones solamente se alcanzan cuando la transcripción se inicia en el promotor de *gltB*.
- 9) La transcripción del operón está sujeta a represión por glutamato para lo cual se requiere del producto de *gltF* y posiblemente también de la subunidad ligera de GOGAT.

## MATERIAL Y METODOS

### 1. Cepas Bacterianas, plásmidos y bacteriófagos

Todos los bacteriófagos y las cepas bacterianas usadas se encuentran descritas en la TABLA 1, y son derivadas de *E. coli* K-12 excepto la cepa RR1 que es un híbrido entre *E. coli* K-12 y *E. coli* B.

Todos los plásmidos utilizados están descritos en la TABLA 2.

### 2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados son: como medio rico Luria-Bertani (LB) (34) que contiene 1% de peptona de caseína, 0.5% de extracto de levadura y 1% de cloruro de sodio, como medio mínimo se utilizó NN (16) que contiene 13 gr/lt. de fosfato monobásico, 2.61 gr/lt. de sulfato de potasio, 0.2 gr/lt de sulfato de magnesio, 0.01 gr/lt. de cloruro de calcio y 0.5 mg/lt de sulfato ferroso. A este medio se le adiciona glucosa 0.2% final como fuente de carbono, como fuente de nitrógeno se agrega cloruro de amonio 15 mM final (Nitrógeno en exceso), o glutamina 1mg/ml final o glutamato 0.2% final (Nitrógeno limitante) esterilizados independientemente por filtración. Otros requerimientos como aminoácidos o vitaminas se esterilizaron por filtración y se añadieron a las concentraciones óptimas previamente determinadas (34). Las concentraciones finales para los antibióticos son las siguientes: Kanamicina 30 µg/ml, Estreptomycinina 100 µg/ml, Espectinomycinina 20 µg/ml Ampicilina o Carbenicilina 200 µg/ml, Cloramfenicol 10 µg/ml, y Tetraciclina 10 µg/ml.

Todos los cultivos se hicieron a 37°C excepto la cepa *polA*<sup>-</sup> (Ts) que se realizaron a 30°C.

### 3. Obtención de lisados de P1virA y titulación.

Para la propagación del fago P1virA en las cepas donadoras adecuadas, se cultivaron éstas en medio LB hasta fase exponencial (40 unidades Kleit (UK)). Se tomaron 0.5ml de este cultivo y se mezcló con 0.1ml del fago P1 diluído a  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de placas (u.f.p.)/ml en NN esteril, y la mezcla se transfirió a tubos de LB adicionado de 25 mM de CaCl<sub>2</sub> más agar al 0.75% (LC), esta mezcla se vació en cajas de petri con LB más 25 mM

de  $\text{CaCl}_2$ , 25  $\mu\text{g/ml}$  de timina y 0.2% de glucosa (LCTG). Las cajas se incubaron a 37°C durante aproximadamente 12 Hrs. Posteriormente se raspó el agar suave, se transfirió a tubos y se le agregó 3 ml de LB, se añadió 1/20 de volumen de cloroformo, y se agitó vigorosamente en vortex. Posteriormente se centrifugó y el sobrenadante se recuperó y se le añadió cloroformo nuevamente, se guardó a 4°C. Los lisados se titularon sobre la cepa sensible AB1157 resuspendida en 0.01M de  $\text{MgSO}_4$  y 0.005M de  $\text{CaCl}_2$ . Se mezcló 0.1ml de esta suspensión con 0.1ml de diferentes diluciones del fago y se incubaron durante 20min a 37°C sin agitación, y posteriormente se vaciaron sobre cajas de LCTG con ayuda de agar suave LC. Se incubaron a 37° durante 12Hrs. y se contaron las unidades formadoras de placas.

#### 4. Transducción con P1

Se cultivó la cepa receptora en medio LB hasta 40 UK, se centrifugó y concentró 10 veces en peptona de caseína al 1% posteriormente, se añadió 1 volumen de una solución de  $\text{CaCl}_2$  0.05M y  $\text{MgSO}_4$  0.03M., y 1 volumen de fago P1 propagado en la cepa donadora adecuada diluido a  $5 \times 10^7$  ufp/ml. La mezcla se incubó a 37°C por 20 min sin agitación, se lavó dos veces con NN, y las células se resuspendieron en 0.1ml de NN para después platearlas en medio selectivo.

#### 5. Inducción y transducción de lisados MudiIPR13

Se cultivó la cepa lisógena para los fagos MudiIPR13 y Mucts62 (8) en LB más 5mM de  $\text{CaCl}_2$  y 200mM de  $\text{MgSO}_4$  a 30°C con agitación, cuando llegó a 30 UK, se incubó a 37°C durante 20min, y posteriormente a 42°C por 90min para producir lisis celular. Se le agregó 1% de cloroformo y se agitó con vortex y se centrifugó. Este lisado se utilizó para la transducción de las inserciones del fago MudiIPR13 a la cepa receptora M8820 (8) de la siguiente manera: se utilizó 1 ml de un cultivo saturado en medio LB más 5mM de  $\text{CaCl}_2$  y 10mM de  $\text{MgSO}_4$  de la cepa receptora y se mezcló con 100 $\mu\text{l}$  del lisado de MudiIPR13-Mucts62 y se agregó  $\text{MgSO}_4$  a una concentración final de 2mM y  $\text{CaCl}_2$  20mM final. Se incubó a 30°C durante 30min sin agitación. Posteriormente se le agregó 2 ml de LB y se puso en agitación por 75 min, se lavaron las células con NN y se resuspendieron en 0.4 ml de NN y se platearon en medio selectivo.

#### 6. Transformación por plásmidos híbridos

Se cultivó la cepa receptora adecuada, en medio LB hasta 30 UK, se centrifugó a 4°C y se lavó con NaCl 10mM, posteriormente se resuspendió el cultivo en 0.5 volumen de CaCl<sub>2</sub> 100mM y se incubó en hielo durante 20 min, se centrifugó y se resuspendió en 0.1 volumen de CaCl<sub>2</sub> 100mM. Se tomaron 0.2 ml de esta suspensión celular, se añadió alrededor de 100ng del plásmido resuspendido en CaCl<sub>2</sub> 100mM y se incubaron en hielo por 60 min. Después se pasaron a un baño a 42°C durante 70 segundos. Se les agregó 1 ml de LB y se incubaron a 37°C por 60 min. Se tomó 0.1 ml de la suspensión y se plateó en cajas de medio selectivo.

#### 7. Purificación de DNA de plásmido

En general para todas las técnicas de biología molecular, se siguieron los procedimientos descritos en el libro de protocolos en biología molecular (2). Se creció un cultivo de la cepa adecuada transformada con el plásmido de interés más el antibiótico apropiado; se centrifugaron 10 ml de este cultivo y se lavaron con una solución que contiene 20% de sacarosa, 50mM de EDTA y 50mM de Tris pH 7.6. El precipitado se resuspendió en 2.25 ml de esta misma solución, y se le agregó 50 µl de RNAsa (10 mg/ml) y 5.25 ml de una solución de NaOH 0.2N y SDS 1%; se agitó vigorosamente y se incubó en hielo durante 10 min. Al cabo de este tiempo, se le agregó 3.75 ml de una solución de acetato de sodio 3M pH 4.8, se mezcló por inversión y se incubó por 30 min más en hielo. Después se centrifugó por 15 min a 10 000 rpm a 4°C. El sobrenadante se filtró por un membrana millipore de 0.45 µm, se le añadió 1 volumen de isopropanol y se centrifugó a 10 000 rpm por 15 min a temperatura ambiente. El precipitado se lavó con etanol al 70% y posteriormente se secó al vacío y el DNA finalmente se resuspendió en 500 µl de una solución de Tris 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM (TE).

#### 8. Purificación de DNA cromosomal

Se cultivó la cepa adecuada hasta saturación y se centrifugó 1.5 ml en una micorfuga. La pastilla celular se lavó con 1 ml de TE y posteriormente se resuspendió en 567 µl de TE; se añadió 30 µl de SDS al 10% y 3 µl de proteinasa K (20mg/ml); se mezcló e incubó por 1 hr a 37°C. Se añadió 100µl de NaCl 5M y se mezcló; posteriormente se añadió

80µl de una solución que contiene 10% de CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio), y 0.7 M de NaCl; esta mezcla se incubó por 10 min a 65°C. Se extrajo con un volumen de cloroformo/isoamílico (24:1), y se centrifugó durante 10 min en una microfuga. El sobrenadante se volvió a extraer con 1 volumen de fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1). La fase acuosa se transfirió a otro tubo y el DNA se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol; se centrifugó durante 5 min más y el precipitado se lavó con etanol al 70%. Se secó el DNA al vacío y se resuspendió en 100µl de TE.

#### 9. Digestion con enzimas de restricción

Tanto el DNA de plásmido como los DNAs cromosomales se digirieron con diferentes enzimas de restricción según el caso y siguiendo las instrucciones de cada enzima en particular. Las reacciones se detuvieron por calentamiento a 65°C, o por congelamiento.

#### 10. Hibridización de DNA contra DNA tipo Southern

Las muestras de DNA cromosomal digeridas con las enzimas adecuadas, se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% en solución amortiguadora TBE (Tris 89mM pH 8, ácido bórico 89mM, EDTA 100mM); se corrió a 40 volts durante 12 hrs. El gel se tiñó con bromuro de etidio y posteriormente se lavó durante 15 min con HCl 0.25N, después se hicieron dos lavados con NaOH 0.5N y NaCl 1M de 15 min cada uno. Los dos últimos lavados se hicieron con una solución de Tris 0.5M pH 7.4, y NaCl 1.5M. La transferencia del DNA se hizo a un papel de nitrocelulosa según la técnica de Southern (52).

La hibridización de cada filtro se hizo utilizando el probador adecuado para cada caso, y generalmente se utilizó  $\alpha$ -CTP ( $^{32}$ P) para marcarlo por nick translation según indicaciones del fabricante. La hibridización se llevó a cabo en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M a 45°C durante 12 hrs. Los lavados se hicieron inicialmente a temperatura ambiente en solución SSC 2X y SDS 0.1%, y finalmente 2 lavados a 42°C en solución SSC 0.1X, SDS 0.1%, (2). Los filtros se expusieron a films Kodak y se revelaron después de 24-48 hrs.

### 11. Determinación de actividades enzimáticas

La cuantificación de las actividades enzimáticas de GOGAT,  $\beta$ -galactosidasa e histidasa, se hicieron, en los casos en los que se permite, del mismo cultivo: se crecieron de 20ml a 30ml de las cepas en cuestión hasta que llegaron a 170-200 Unidades Klett en los medios indicados en las tablas, para las determinaciones de los resultados adicionales, ya que fue necesario dejar los cultivos hasta fase estacionaria para detectar la actividad de histidasa. En el caso de las actividades de GS, GOGAT, y GDH, el método para su determinación se encuentra descrito en el artículo; para el caso de  $\beta$ -galactosidasa se utilizó el método de Miller (34). Para la cuantificación de histidasa se utilizó el método descrito por Pahel et.al (42).

La cuantificación de proteína para calcular las actividades específicas se realizó utilizando el método de Lowry et.al (26), utilizando albúmina sérica bovina.

### 12. Construcción de cepas que llevan el operón *hutC*<sub>K12</sub>

Para introducir los genes del operón *hutC* a las cepas del laboratorio, se utilizó como donadora para la propagación de PI, la cepa YMC10 donada por el Dr. Magasanik (Tabla 1) (11), que además de tener insertado en el cromosoma estos genes de *K.aerogenes*, contiene una deleción del operón *lac*. Inicialmente se transfirieron por transducción los alelos silvestres de los operones *ilv* y *pro* a la cepa MX1172 (Tabla 1) con el objeto de obtener una cepa sin auxotrofías, ya que al añadir prolina, isoleucina y valina (que son los requerimientos de la cepa MX1172), la cepa puede utilizarlos como fuentes de nitrógeno. Posteriormente se introdujeron los genes del operón *hut*, y la selección fue crecimiento en histidina como única fuente de nitrógeno. Finalmente se comprobó por determinación de actividad enzimática que efectivamente se transfirió este operón; así mismo se verificó que la cepa siguiera conservando el fenotipo Lac<sup>-</sup> (la cepa YMC10 posee una deleción del operón *lac*).

### 13. Aislamiento de la mutación *gluD*::MudIIPR13

Se utilizó el bacteriófago MudIIPR13 (45). Este fago contiene solamente los extremos *c* y *S* del fago Mu lo que le permite insertarse al azar en el cromosoma o en plásmidos que contenga la cepa lisógena. Posee además el gen que le confiere resistencia a cloramfenicol y los genes del operón *lac* sin promotor; el gen *lacZ* empieza a partir del octavo codón de

$\beta$ -galactosidasa de manera que cuando el fago se inserta en la orientación y fase de lectura adecuadas de un gen blanco, se obtienen fusiones traduccionales de éste con *lacZ*.

Este fago, para transponer, requiere de las funciones de transposición que le provee en *trans* un fago *Muc1s62* ayudador que al poseer un represor termosensible (mutación *cts62*) se induce al elevar la temperatura del cultivo a 42°C. De ésta forma se obtienen inserciones al azar del fago MudIIPR13 que posteriormente se transfieren independientemente a las cepas adecuadas.

Se utilizó el plásmido pGOL1 (22) para buscar mutaciones por inserción de MudIIPR13 en *gltD* y/o *gltF*; se introdujo a la cepa MC4100/MudIIPR13 (45). La inducción de la transposición del fago, y la transducción a la cepa receptora M8820, se hizo como se describió en el punto 5 de ésta sección. Se seleccionaron las transductantes en dos tipos de medio: medio Luria con cloramfenicol, y medio Luria con cloramfenicol más ampicilina que es la resistencia para la que codifica el plásmido pGOL2. De las seleccionadas en cloramfenicol, el 90% también eran resistentes a ampicilina, lo cual indicaba que una altísima proporción de las transposiciones de éste fago son al plásmido. Se buscaron aquellas inserciones que formaron fusiones de  $\beta$ -galactosidasa con algún gen del plásmido, cultivando las colonias en cajas con medio mínimo y un indicador de actividad de  $\beta$ -galactosidasa:  $\beta$ -D-isopropilthiogalactósido (X-gal). Se tomaron solamente aquellas que dieron coloración azul, que era indicativo de una fusión con *lacZ*. Se purificó DNA de plásmido de aproximadamente 40 colonias, que se analizaron por patrón de restricción para buscar una mutación en *gltD*. Se encontró una mutante en la que la inserción del fago se localiza muy cerca de la mitad de este gen.

#### 14. Aislamiento de la mutación *gltF1::\Omega*

La mutación *gltF1::\Omega* se aisló inicialmente en el plásmido pGOG1, y el método utilizado se encuentra descrito en el artículo. Posteriormente se aisló la misma inserción: *gltF1::\Omega* en el plásmido pRSP21, y este fue el que se utilizó para hacer la recombinación en cromosoma.

#### 15. Recombinación en el cromosoma de los alelos *gltD::MudIIPR13* y *gltF1::\Omega*

La recombinación por homología de las mutaciones aisladas en plásmido al cromosoma, se llevó a cabo utilizando la cepa *polA1s* y el mismo método utilizado previamente para la

recombinación del alelo *glkB225::Ω* que se encuentra descrito en la sección de Material y Métodos del artículo. Para el caso de la recombinación del alelo *gltD::MudIIPR13* se probaron alrededor de 5000 colonias de las cuales solamente se encontró una que mantuviera los marcadores del fago ( $Cm^R$ ), y fuera sensible al marcador del vehículo ( $Ap$ ); para el caso de la mutación *gltF1::Ω* se probaron alrededor de 2000 colonias de las cuales 2 presentaron el fenotipo deseado ( $Spc/Sm^R$  y  $Cm^R$ ).

Una vez obtenidas las colonias con el marcador deseado, se utilizaron como donadoras para la propagación de PI para transferir los alelos a las cepas receptoras adecuadas y seleccionando para los marcadores de cada inserción. Posteriormente se aisló DNA cromosomal de cada una de las cepas y se verificó por hibridización de DNA-DNA tipo Southern, que las inserciones transferidas a cromosoma fueran las mismas que se aislaron inicialmente en los diferentes plásmidos.

## BIBLIOGRAFIA

1. Albright, L. M., E. Huala, and F. Ausubel.1989. Prokariotic signal transduction mediated by sensor and regulator protein pairs. *Ann.Rev.Genet.* 23:311-336.
2. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. A. Smith, J.G. Siedman, and K. Struhl.(ed).Current protocols in Molecular Biology.1987.Greene Publishing Associates and Wiley Interscience.Wiley and sons,Inc. USA.
3. Backman, K. C., Y. M. Chen, S. Ueno-Nishio and B. Magasanik.1983. The product of *glnL* is not essential for regulation of bacterial nitrogen assimilation. *J.Bacteriol.*154:516-519.
4. Bancroft, S., S. G. Rhee, C. Neumann, and S. Kustu.1978. Mutations that alter the covalent modification of glutamine synthetase in *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.*160:577-585.
5. Bastarrachea, F., S. Brom, A. A. Covarrubias, A. V. Osorio, and F. Bolivar.1980. Genetic characterization of mutation affecting glutamine biosynthesis and its regulation in *Escherichia coli* K12, p.107-121. In J.Mora and R. Palacios (ed.), Glutamine: metabolism, enzymology and regulacion. Academic Press, Inc., New York.
6. Bohannon, D. E., M. S. Rosenkrantz, and A. L. Sonenshein.1985. Regulation of *Bacillus subtilis* glutamate synthase genes by the nitrogen source. *J.Bacteriol.* 163:957-964.
7. Bohannon, D. E., and, A. L. Sonenshein.1989. Positive regulation of glutamate biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.*171:4718-4727.
8. Bolivar, F., R. I. Rodríguez, M. C. Betlach, and H. W. Boyer.1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene* 2:75-93.
9. Brenchley, J. E., C. A. Baker, and L. G. Patil.1975. Regulation of the ammonia assimilatory enzymes in *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.*124:182-189.
10. Brencheley, J. E., M. E. Prival, and B. Magasanik.1973. Regulation of the synthesis of enzymes responsible for glutamate formation in *Klebsiella aerogenes*. *J.Biol. Chem.*248:6122-6128.
11. Bueno, R., G. Pahel, and B. Magasanik.1985. Role of *glnB* and *glnD* gene products in regulation of the *glnALG* operon of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.*164:816-822.
12. Casadaban, M. J.1975. Fusion of the *Escherichia coli lac* genes to the *ara* promoter: a general technique using bacteriophage Mu-1 insertions. *Proc.Nad.Acad.Sci.USA* 72:809-813.
13. Casadaban, M.J., A. Martinez-Arias, S.K. Shapira, and J. Chou.1983.  $\beta$ -galactosidase gene fusions for analyzing gene expression in *Escherichia coli* and yeast. *Methods. in Enzymol* 100:293-308.
14. Castaño, I., F. Bastarrachea, and A. A. Covarrubias.1988. *glbBDF* operon of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 170:821-827.
15. Chen., Y. M., K. Backman, and B. Magasanik.1982. Characterization of a gene, *glnL*, the product of which is involved in the regulation of nitrogen utilization in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.*150:214-220.
16. Covarrubias, A. A., R. Sánchez-Pescador, A. V. 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.
17. 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.
  18. Ditta, G., D. Stanfields Corbin, and D. Helinski. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram negative-bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:734-735.
  19. Foor, F., Z. Reuveny, and B. Magasanik. 1980. Regulation of the synthesis of glutamine synthetase by the  $P_{II}$  protein in *Klebsiella aerogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2636-2640.
  20. Fuchs, R. L., M. J. Madonna, J. E. Brenchley. 1980. Identification of the structural genes for glutamate synthase and genetic characterization of this region of the *Salmonella typhimurium* chromosome. *J. Bacteriol.* 149:906-915.
  21. Garcia, E., and S. G. Rhee. 1983. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase: purification and properties of  $P_{II}$  uridylyltransferase and uridylyl-removing enzyme. *J. Biol. Chem.* 258:2246-2253.
  22. Garcarrubio, A., E. Lozoya, A. A. Covarrubias, and F. Bolivar. 1983. Structural organization of the genes that encode the two glutamate synthase subunits of *Escherichia coli* K12. *Gene* 26:165-170.
  23. Ginsburg, A., and E. R. Stadman. 1973. Regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli* p.9-44. In S. Prusiner and E.R. Stadman (ed). *The Enzymes of glutamine metabolism*. Academic Press, Inc. New York.
  24. Keener, J. and S. Kustu. 1988. Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NtrB and NtrC of enteric bacteria: roles of conserved amino-terminal domain of NtrC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4976-4980.
  25. Kingsbury, D. T., and D. R. Helinski. 1970. DNA polymerase as a requirement for the maintenance of the bacterial plasmid colicinogenic factor. *El. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41:1538-1544.
  26. Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Randall. 1951. Protein measurements with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
  27. Madonna, M. J., R. L. Fuchs, and J. E. Brenchley. 1985. Fine structure analysis of *Salmonella typhimurium* glutamate synthase genes. *J. Bacteriol.* 161:135-168.
  28. Magasanik, B. 1978. Regulation in the *hut* system, p.373-387. In J.H. Miller and W.S. Reznikoff (ed.), *The operon*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
  29. Magasanik, B. 1982. Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 16:135-168.
  30. Magasanik, B. 1988. Reversible phosphorylation of an enhancer binding protein regulates the transcription of bacterial nitrogen utilization genes. *Trends. Biochem. Sci.* 13:475-479.
  31. Mantsala, P., and H. Zalbin. 1976. Glutamate synthase. *J. Biol. Chem.* 251:3294-3299.
  32. McFarland, N., L. McCarter, S. Artz, and S. Kustu. 1981. Nitrogen regulatory locus "glnR" of enteric bacteria is composed of cistrons *ntrB* and *ntrC*: identification of their protein products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2135-2139.
  33. Meers, J. L., D. W. Tempest and C. M. Brown. 1970. Glutamine (amide):2-oxoglu-

- tarate aminotransferase oxidoreductase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. *J.Gen.Microbiol.*64:187-194.
34. Miller, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
  35. Miller, R. E. 1972. Glutamate synthase from *Escherichia coli* an iron-sulfide flavoprotein. *J.Biol.Chem.*247:7407-7419.
  36. Ninfa, A. J., E. Gottlin, Ninfa, A. N. Lupas, A. Stock, B. Magasanik, and J. Stock. 1988. Crosstalk between bacterial chemotaxis signal transduction proteins and regulators of transcription of the *Ntr* regulon: evidence that nitrogen assimilation and chemotaxis are controlled by a common phosphotransfer mechanism. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 85:5492-5496.
  37. Ninfa, A. J. and B. Magasanik. 1986. Covalent modification of the *glnG* product, NR<sub>I</sub>, by the *glnL* product, NR<sub>II</sub> regulates the transcription of the *glnALC* operon in *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*83:5909-5913.
  38. Ninfa, A. J., L. J. Reitzer, and B. Magasanik. 1986. Activation of transcription initiation form the nitrogen regulated promoter *glnAp2*, p.403-407. In W.S.Reznikoff, R.R.Burgess, J.E.Dahlberg, C.A.Gross, M.T.Record, and M.P.Wickens (ed), RNA polymerase and the regulation of transcription. Elsevier Science Publishing Inc. New York.
  39. Oliver, G., G. Gosset, R. Sánchez-Pescador, E. Lozoya, L. M. Ku, N. Flores, B. Becerril, F. Valle, and F. Bolivar. 1987. Determination of the nucleotide sequence for the glutamate synthase structural genes of *Escherichia coli* K-12. *Gene*.60:1-11.
  40. Pahel, G., D. Rothstein, and B. Magasanik. 1982. Complex *glnA glnL glnG* operon of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.*150:202-213.
  41. Pahel, G., and B. Tyler. 1979. A new *glnA* linked regulatory gene for glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Sci. USA* 76:1979-1983
  42. Pahel, G., A. D. Zelentz, and B. M. Tyler. 1978. *gltB* gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.*133:139-148.
  43. Popham, D. L., D. Szeto, K. Keener, and S. Kustu. 1989. Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhancers. *Science*243:629-635.
  44. Ratet, P., and F. Richaud. 1986. Construction and uses of a new transposable element whose insertion is able to produce gene fusions with the neomycin phosphotransferase coding region of Tn903. *Gene*42:185-192.
  45. Ratet, P., J. Schell, and F. J. de Bruijin. 1988. Mini-Mulac transposons with broad-host-range origins of conjugal transfer and replication designed for gene regulation studies in Rhizobiaceae. *Gene*63:41-52.
  46. Reitzer, L. J. and B. Magasanik. 1983. Isolation of the nitrogen assimilatory regulator NR<sub>I</sub>, the product of *glnG* gene of *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 80:5554-5558.
  47. Reitzer, L. J. and B. Magasanik. 1985. Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*82:1979-1983.
  48. Reitzer, L. J. and B. Magasanik. 1986. Transcription of *glnA* in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter.

Cell45:785-792.

49. Reitzer, L. J., and B. Magasanik. 1987. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine and D-alanine p.302 In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. Neidhart, F.C. (ed) American Society for Microbiology. Washington D.C.
50. Ronson, C. W., B. T. Nixon, and F. M. Ausubel. 1987. Conserved Domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli Cell.49:579-581.
51. 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
52. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517.
53. Stock, J. B., A. J. Ninfa, and A. M. Stock. 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. Microbiol. Reviews: 53:450-490.
54. Ueno-Nishio, S., S. Mango, L. J. Reitzer, and B. Magasanik. 1984. Identification and regulation of the *glnL* operator-promoter of the complex *glnALG* operon of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 160:379-384.
55. Vieira, J., and J. Messing. 1982. The pUC plasmids and M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19:259-268.
56. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13amp18 and pUC19 vectors. Gene 33:103-119.