

03081

1

zey.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

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

Una inversión de dos bases adyacentes en el sitio de unión del regulador nitrogenado I impide la activación y la represión del operón glnALG en Escherichia coli.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

para optar por el grado de

Doctor en Investigación Biomédica Básica

p r e s e n t a

Rosa Laura Camarena Mejía

Instituto de Investigaciones Biomédicas

1991

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradezco:

Al Dr. Bastarrachea, por permitirme estar en su laboratorio y compartir conmigo sus conocimientos.

Muy especialmente a Tere Ballado por la ayuda técnica, y por el entusiasmo con el que colaboró en este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio (actuales y antiguos) Marcela, Silvia, Denise, Luis, Julio, Nora, Miriam, Irene, Aurora, Rubí, Ligia, Imelda, Claudia, José Luis, Guadalupe, Tere y Laura.

Al Dr. Juan Pedro Laclette, por su confianza; y a los integrantes de su laboratorio.

A los compañeros del Instituto de Fisiología Celular.

A la Dra. Alejandra Covarrubias, por enseñarme un poco de lo mucho que ella sabe.

Con agradecimiento, a mis maestros.

A Monserrat Sordo por su ayuda técnica.

A Julia y Pedro, por la cuidadosa preparación del material empleado en este trabajo.

Muy especialmente a mis amigos, con los que siempre puedo contar.

A mis sinodales, por su tiempo y atención dedicados a esta tesis.

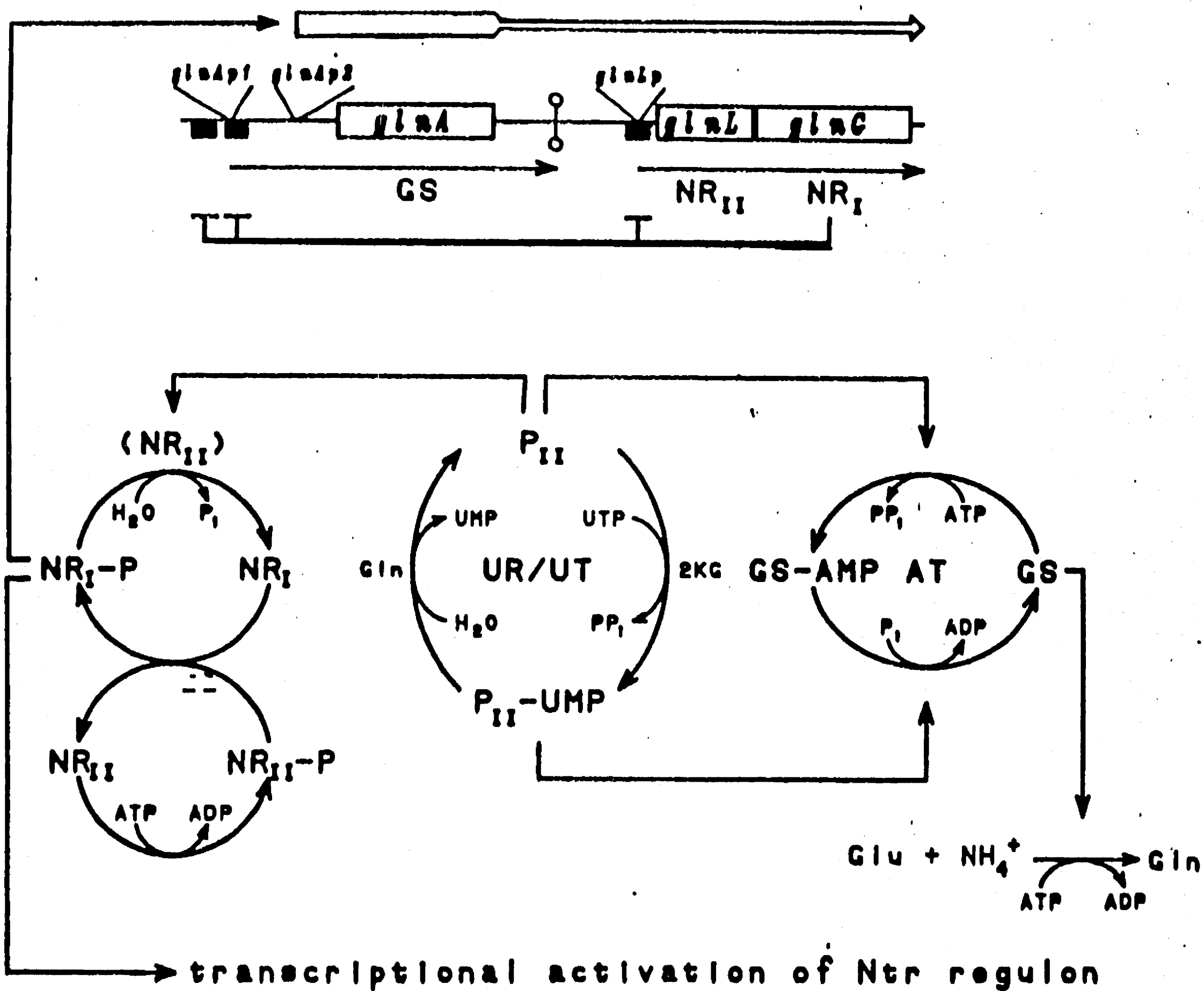
PROLOGO¹

Figura 1. Sistema que regula la asimilación y regulación de nitrógeno en Escherichia coli. La actividad de la glutamina sintetasa (GS) es regulada por las reacciones de adenilación y de desadenilación catalizadas por la adeniltransferasa (AT), que a su vez es regulada por la uridilación y la desuridilación de la proteína P_{NR}. La uridilación de P_{NR} es catalizada por la enzima uridiltransferasa (UT), reacción que es estimulada por α -cetoglutarato (2KG). La proteína P_{NR} es desuridilada por la misma enzima que lleva a cabo la uridilación, pero que en presencia de glutamina, estimula su actividad desuridilante (UR). El estado de uridilación de P_{NR} también controla la expresión del gene que codifica para la GS, denominado glnA. NR_x-P activa la transcripción del promotor glnAp2 mediante su unión al DNA en los sitios representados por rectángulos llenos. NR_x es fosforilada por la actividad de cinasa de NR_x. La proteína P_{NR} en su forma no modificada, estimula la actividad defosforilante de NR_x sobre NR_x. En ausencia de NR_x-P, el operón glnALG se transcribe a niveles bajos a partir de los promotores glnAp1 y glnLp. NR_x-P se une a sitios que se superponen a estos promotores, lo que provoca que sean reprimidos. NR_x-P también activa la transcripción de los genes del regulón Ntr (tomado de 77).

¹En la Figura 1 se muestra de manera esquemática el sistema que regula la utilización de nitrógeno en Escherichia coli, e intenta resumir el papel de los productos de los genes gln más relevantes para este trabajo.

La razón de ubicarla al inicio, estriba en que puede ser consultada durante la lectura de la Introducción.

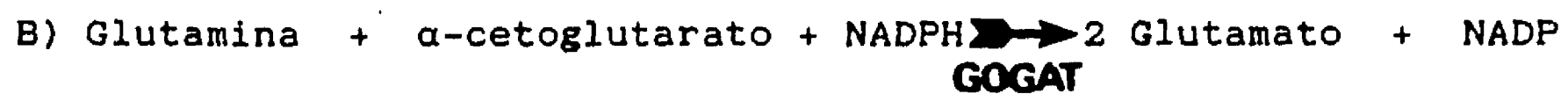
Figura 1



INTRODUCCION

Los organismos vivos requieren para crecer el asimilar nitrógeno en macromoléculas. Los microorganismos usan una gran variedad de compuestos nitrogenados como fuente de nitrógeno celular.

Las vías por las cuales se metaboliza el nitrógeno pueden dividirse en dos clases: A) una vía asimilatoria, necesaria para utilizar el nitrógeno captado del medio, y B) la vía biosintética que da lugar a los compuestos celulares que contienen nitrógeno. La mayoría del nitrógeno de los compuestos celulares proviene del nitrógeno del ácido glutámico o de la glutamina más que del amonio; aproximadamente el 12% del nitrógeno celular es derivado del grupo amido de la glutamina y el resto del grupo amino del ácido glutámico (1); éstos son los compuestos iniciales de varias vías biosintéticas de aminoácidos (Figura 2). La glutamina y el glutamato son fácilmente interconvertibles por las siguientes reacciones:



Las enzimas que catalizan estas reacciones se encuentran en todos los microorganismos capaces de crecer en amonio como única fuente de nitrógeno.

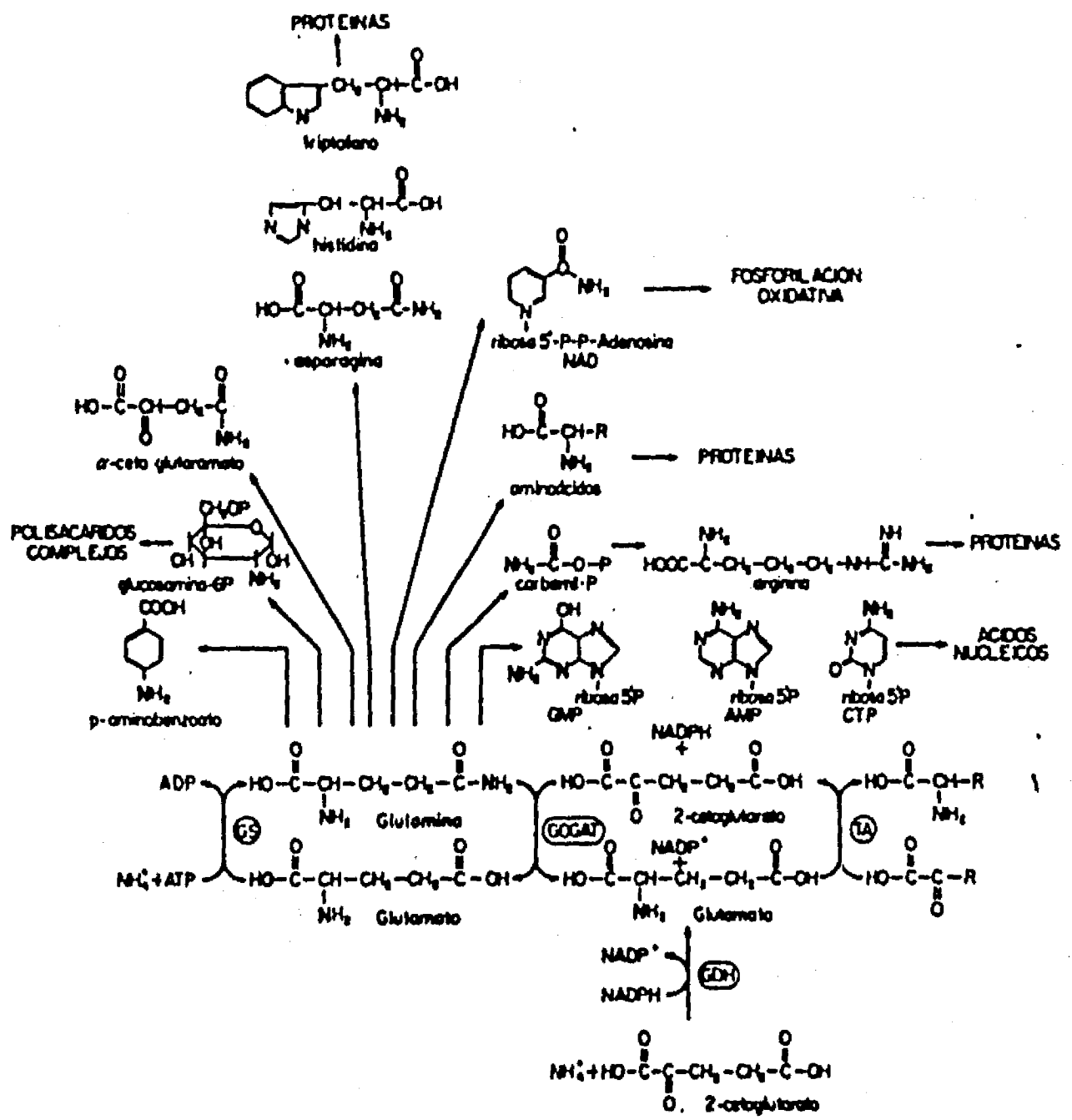


Figura 2

Una de las enzimas requeridas para captar amonio es la glutamino sintetasa (GS), la cual cataliza la reacción A. La utilización del amonio asimilado depende de la actividad de la enzima glutamato sintasa (GOGAT), la cual cataliza la reacción B. Las reacciones catalizadas por estas dos enzimas resultan en la síntesis neta de glutamato a partir de α -cetoglutarato. Las reacciones tienen un equilibrio favorable, debido a la concomitante hidrólisis de ATP. Consecuentemente se cree que estas reacciones permiten la asimilación del amonio presente en el medio a concentraciones más bajas de 0.1 mM o de aquél derivado enzimáticamente de otras fuentes de nitrógeno (2)

En algunos organismos como Bacillus subtilis, las reacciones A y B constituyen la única vía para la utilización del amonio (3). Otros organismos, tales como las enterobacterias, pueden utilizar amonio para la síntesis de glutamato a través de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH), la cual cataliza la siguiente reacción:



Esta enzima posee una Km relativamente alta, del orden de 1mM, para el α -cetoglutarato y para el amonio; por lo tanto, la GDH parece asimilar el amonio siempre y cuando existan altas concentraciones del mismo en el medio (4,5).

De estas enzimas capaces de manejar el nitrógeno disponible

nos abocaremos a la glutamino sintetasa presente en Escherichia coli, la cual es semejante en muchos aspectos a la de otras enterobacterias.

Glutamino sintetasa. bioquímica y propiedades.

La glutamino sintetasa es un dodecámero compuesto de subunidades idénticas. En su forma no modificada, la enzima cataliza la reacción A para sintetizar glutamina. La enzima puede ser modificada por la adición de un grupo AMP a la tirosina presente en cada una de las subunidades; esta modificación resulta en la pérdida gradual de la actividad enzimática hasta culminar con un dodecámero totalmente inactivo cuando cada una de las subunidades se encuentra en estado adenilado (6).

Tanto la adenilación como la desadenilación pueden ser catalizadas por la enzima adeniltransferasa (ATasa). La tasa de ambas reacciones se encuentra regulada por la proteína P_{II} , ésta en su forma no modificada, estimula la adenilación, y en su forma uridilada (P_{II} -UMP) estimula la desadenilación. La interconversión de P_{II} a P_{II} -UMP depende de una proteína que parece tener dos actividades, una de uridiltransferasa, que cataliza la conversión de P_{II} a P_{II} -UMP, utilizando UTP, y la actividad contraria para eliminar el grupo UMP de la proteína P_{II} . La uridilación es estimulada por el α -cetoglutarato e inhibida por la glutamina. Consecuentemente, una baja relación de glutamina a α -cetoglutarato indica deficiencia de amonio, lo que

lleva a la conversión de P_{xx} a P_{xx} -UMP, provocando la desadenilación de la GS, apropiada para crecer en limitación de nitrógeno; durante el crecimiento en exceso de nitrógeno se produce el ciclo inverso al mencionado. Esta regulación es entonces un complejo sistema bicíclico de regulación (Figura 3) (6,4).

No sólo la actividad, sino también la concentración intracelular de la GS es regulada por la disponibilidad de nitrógeno en el medio. Esto se muestra para Klebsiella aerogenes en la tabla I; la más alta concentración de enzima se encuentra en células cultivadas en ausencia de amonio y más bien cultivadas en fuentes alternativas de nitrógeno, ya sea histidina o glutamina; también el grado de adenilación de la enzima disminuye al cultivarlas en medio deficiente de amonio. En resumen, la diferencia entre exceso y limitación de amonio provoca que la concentración de GS varíe, aproximadamente, 10 veces (7,8).

Genética del sistema Gln.

glnA.- Este gene corresponde al gene estructural para la glutamino sintetasa; las lesiones en este gene provocan fenotipo Gln⁻. Las mutaciones termosensibles dan lugar a una enzima termolábil, asimismo en algunas mutaciones glnA⁻ con fenotipo Gln⁻ se observa la desaparición del péptido correspondiente a la GS (9,10,11). Este gene se localiza en el minuto 86 del mapa de

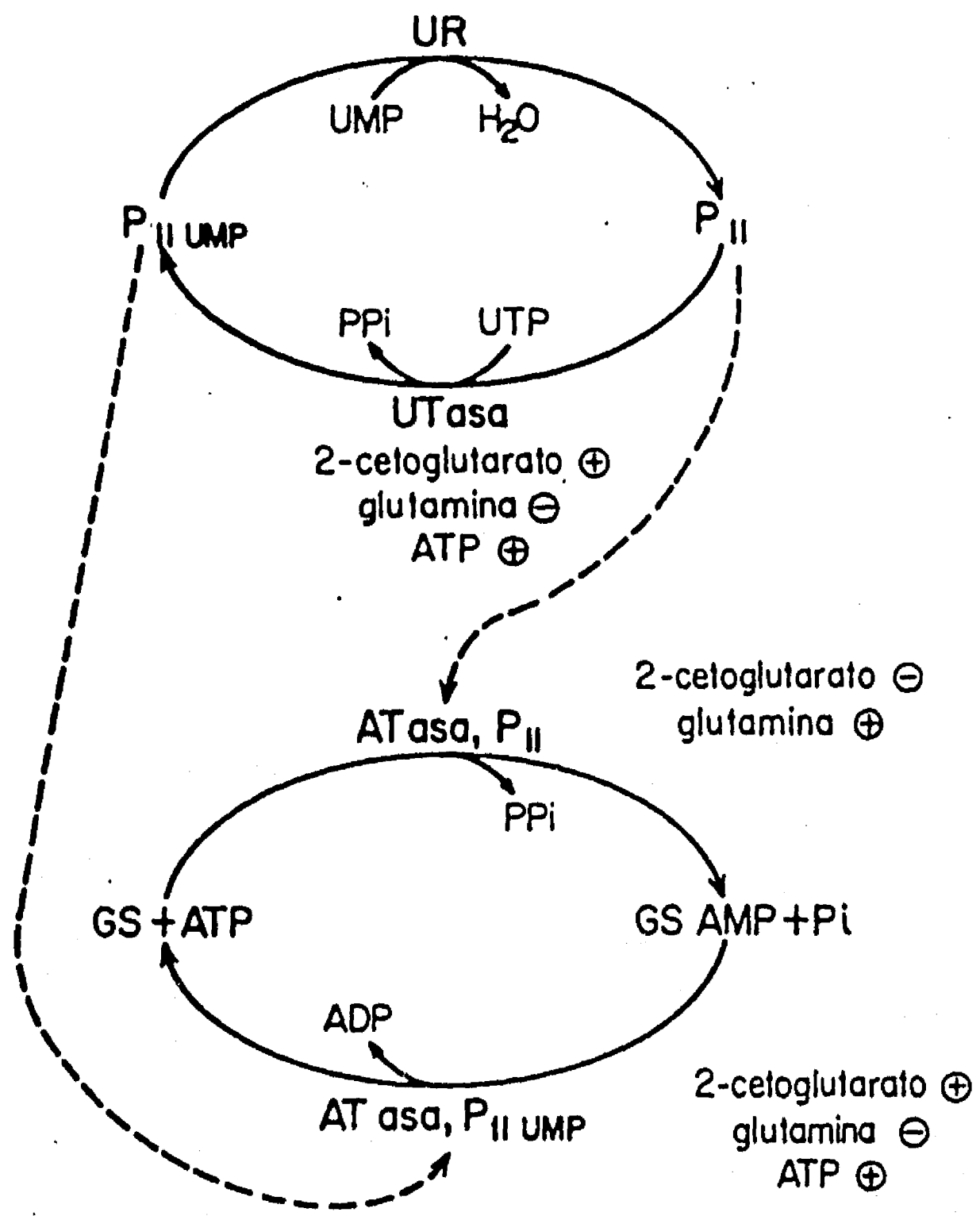


Figura 3

Tabla I. Actividades de glutamino sintetasa e histidasa reportadas para Klebsiella aerogenes en diferentes fondos genéticos

Fenotipo de la cepa	medio de cultivo	Glutamino sintetasa	Histidasa
Gln ⁺ Ntr ⁺	G H	1400 (1)	260
	G Gln	1500 (2)	350
	G N	360 (7)	100
	G N Gln	150 (6)	80
GlnC NtrC	G Gln	1600	380
	G N Gln	1500	290
GlnR Ntr ⁻	G Gln	250	110
	G N	150	nd
	G N Gln	100	nd

Los resultados son tomados de Magasanik B. (1982) (13) .

Gln se refiere al fenotipo de la glutamina sintetasa: Gln⁺ regulación normal; GlnC altas concentraciones de enzima en cualquier fuente de nitrógeno; GlnR concentraciones intermedias de GS independientemente de la composición del medio (como el de las cepas glnG⁻). En la cepa silvestre se muestra, dentro de paréntesis el número, de subunidades adeniladas.

Ntr se refiere a las enzimas reguladas por nitrógeno, tal como la histidasa: Ntr⁺ regulación normal regulada por nitrógeno; Ntr⁻ no

aumenta su concentración en condiciones de limitación de nitrógeno; NtrC altas concentraciones aún en exceso de amonio. nd no determinada.

Escherichia coli, y mediante mapeo por transducción con el fago P1 se ha establecido que el orden de los genes de esta área del cromosoma es: rbs-ilv-fad-pola-glnA-rha-pfk-tpi-metB-argH (4).

glnF.- En Salmonella typhimurium se describió una mutación, no ligada al gene glnA que provocaba el fenotipo Gln^- . Esta mutación fue localizada en la posición que corresponde al minuto 68 del mapa de Escherichia coli. Posteriormente, se reportaron mutaciones similares para Escherichia coli y Klebsiella aerogenes; estas mutaciones se encontraron ligadas por cotransducción a argG en un 25 y 50% respectivamente (12,13).

Un fenotipo adicional de las mutaciones en este gene es su incapacidad para incrementar la concentración intracelular de histidasa y de enzimas similares en respuesta a la limitación de amonio (fenotipo Ntr^-) (14).

Recientemente, el producto del gene glnF fue identificado como un factor sigma de la RNA polimerasa; la holoenzima es capaz de reconocer a los promotores con la secuencia consenso TTGGACA(N₄)TTGCA, presente en los genes y operones Ntr (incluido uno de los promotores del gene glnA) (15,16); por esta razón, las mutaciones en glnF abaten la expresión de glnA y de los genes Ntr.

El producto del gene glnF posee un peso molecular de 54 000 d razón por la cual se denomina factor sigma 54 (σ^{54}).

En Escherichia coli la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica revela que la proteína sigma

54 posee rasgos estructurales semejantes a los factores de transcripción eucarióticos como son dos cierres de leucina, una región acidica, y una región rica en glutamina, además de un dominio hélice-vuelta-hélice característico de los factores de transcripción procarióticos (17).

Se sabe que la RNA polimerasa unida a sigma 54 se encuentra siempre presente en el promotor Ntr de glnA, independientemente de la disponibilidad de nitrógeno, y su transcripción depende de la activación de este complejo binario (18,19).

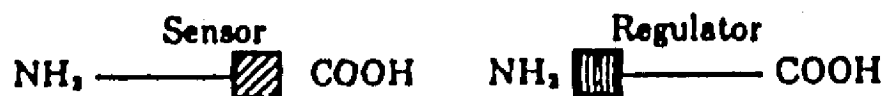
Este gene se conoce ahora como rpoN.

glnL y glnG.- Estos genes se localizan contiguos al gene glnA conformando un operón complejo, al cual nos referiremos más tarde.

Los productos de los genes glnL y glnG se denominan NR_{II} y NR_I, respectivamente, y forman parte de los sistemas regulatorios de dos componentes descritos en algunas especies bacterianas. En todos los casos los pares de proteínas comparten la función común de permitir a la célula detectar y responder a un estímulo del medio ambiente, estos sistemas consisten de una proteína sensora y de una reguladora y se encuentran involucradas en diferentes funciones (tabla II).

En el caso de NR_{II} y NR_I, la proteína capaz de detectar la disponibilidad de nitrógeno es NR_{II}, y NR_I es la proteína que regula el nivel de transcripción de los promotores Ntr (20,21,22).

Two-component regulatory systems of bacteria



The structures of prototypical sensor and regulator proteins are shown schematically. *Hatched box* represents regions of sequence similarity conserved among members of the sensor or regulator class, while *heavy lines* represent sequences unique to each protein. Information about the various known sensor and regulator proteins is summarized below.

Species ^a	Sensor		Regulator			Function controlled
	Protein	Location ^b	Protein	Transcription ^c	Class ^d	
<i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i>	CheA	Cytoplasm	CheB CheY	No No		Chemotaxis
<i>Bradyrhizobium</i> sp. RP601, <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Rhizobium meliloti</i>	NtrB	Cytoplasm	NtrC	Yes	I	Nitrogen assimilation
<i>E. coli</i>	EnvZ	Membrane	OmpR	Yes	II	Porin expression
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	VirA	Membrane	VirG	Yes	II	Transformation of plant host
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	DctB	Membrane?	DctD	Yes	I	C ₄ dicarboxylic acid transport
<i>E. coli</i>	PhoM PhoR	Membrane? Membrane?	PhoB	Yes	II	Phosphate assimilation
<i>E. coli</i>	CpxA	Membrane	SfrA	?	II	Aerobiosis? Conjugation?
<i>E. coli</i>	UhpB	Membrane	UhpA	Yes	III	Sugar phosphate transport
<i>R. meliloti</i>	FixL	Membrane?	FixJ	Yes	III	N ₂ fixation
<i>Bacillus subtilis</i>	DegS	Cytoplasm?	DegU	Yes	III	Degradative enzymes
<i>B. subtilis</i>	?		SpoOA SpoOF	Yes Yes	IV	Sporulation

- ^a Only species for which sequence data are available are listed. Related species may also possess such systems.
^b Intracellular location is given if known; "?" indicates proposed location based on hydrophobicity profile. Membrane proteins are believed to have two transmembrane segments in their N-terminal portions, except for UhpB, which is proposed to have up to nine (10).
^c Does the protein act as a positive regulator of transcription?
^d The regulators can be further grouped into four sets, arbitrarily designated Classes I-IV, based on sequence similarities in their C-terminal regions.

NtrB = NR_{II} y NtrC = NR_I. La nomenclatura ntr corresponde a *Klebsiella pneumoniae*.
 Tomado de 22.

Tabla II

El mecanismo por el cual se regulan este par de proteínas es mediado por la fosforilación de las mismas.

Durante limitación de nitrógeno, NR_{II} se autofosforila utilizando ATP; así NR_{II} -P fosforila a la proteína NR_I , dando lugar a NR_I -P, la cual es la forma capaz de activar la transcripción de los promotores Ntr.

La actividad de NR_{II} parece estar regulada por la proteína P_{II} (ver glnB), la cual en su forma no modificada presente en exceso de amonio, estimula la actividad defosforilante de NR_{II} sobre NR_I , dando lugar a una proteína incapaz de funcionar como activador de la transcripción (23).

Finalmente cabe mencionar que existen promotores que se encuentran sujetos a represión por NR_I (16,24), siendo este efecto mayor cuando NR_I se encuentra fosforilado (25), probablemente a causa de que en este estado aumenta su afinidad por el DNA (18).

glnD.- Algunas mutaciones en este gene dan lugar al fenotipo Gln^- ; este gene ha sido localizado en el minuto 4 del cromosoma de Escherichia coli. Las cepas con mutaciones en este gene son incapaces de producir la enzima uridiltransferasa (UTasa), la cual se requiere para la conversión de P_{II} a P_{II} -UMP y por lo tanto, la GS en estas mutantes tiende a estar altamente adenilada. Además de este efecto sobre la adenilación, la proteína P_{II} provoca una constante estimulación de la actividad de fosfatasa de NR_{II} sobre NR_I ; por lo tanto, NR_I nunca es

fosforilado, hecho que explica porqué este tipo de mutantes poseen además, muy bajos niveles de GS (23,26,27).

glnB.- El gene glnB codifica para la proteína P_{II} y se localiza entre los genes glyA y purL, en el minuto 55 del cromosoma de Escherichia coli. Se han reportado mutaciones en este gene que provocan que P_{II} no pueda ser uridilado; en este caso la cepas poseen fenotipo $\text{Gln}^- \text{Ntr}^-$. Este tipo de mutaciones pueden suprimirse por mutaciones en glnL, las cuales confieren el fenotipo Gln^{C} , dado que NR_{II} pierde la capacidad de ser regulado por P_{II} . Otro tipo de mutaciones supresoras del fenotipo $\text{Gln}^- \text{Ntr}^-$ es aquel que inactiva completamente el gene glnB (inserciones o deleciones) provocando la pérdida de la proteína P_{II} ; estas cepas adquieren fenotipo Gln^{C} pero aún son capaces de regular Ntr a niveles semejantes a los de la cepa silvestre, por lo que se ha considerado que esta proteína no es esencial para regular la fosforilación y defosforilación de NR_{I} mediada por NR_{II} , y probablemente exista otro elemento regulatorio que pueda sustituir in vivo a P_{II} (28,29,30,31)

glnE.- Este gene codifica para la enzima adeniltransferasa (ATasa). Estudios fisiológicos han demostrado que la GS de Escherichia coli es rápidamente adenilada cuando el organismo es cambiado de un medio limitante de nitrógeno a un medio con exceso del mismo; por lo tanto, la adenilación de la GS y su concomitante inactivación se presenta específicamente bajo

condiciones de cambio de nitrógeno limitante a alto amonio (1). En 1984, Kustu et al. (32) caracterizaron la fisiología de cepas glnE⁻ de Salmonella typhimurium. Esta cepa, cuando es transferida a condiciones de exceso de amonio, presenta una tasa de crecimiento mucho menor que la cepa silvestre. A diferentes tiempos, después del cambio, se observó que la poza de ATP era normal, presentándose una gran acumulación de la poza de glutamina, en tanto que la poza de glutamato se depleta; por esta razón, se cree que la inactivación de la GS por adenilación tiene como fin proteger la poza de glutamato.

Esta enzima es capaz de responder a los metabolitos que controlan el sistema de adenilación. En cepas glnB⁻ la ATasa determina el estado de adenilación y desadenilación de la GS siendo de valores altos en exceso de amonio y de valores bajos en limitación, semejantes a los de la cepa silvestre, aunque la tasa de desadenilación disminuye (29,33).

En la tabla III se enlistan los genes involucrados en el sistema Gln y algunas de sus características fenotípicas.

Genética de los sistemas regulados por nitrógeno.

Se les denomina Ntr a aquellas enzimas y a los sistemas de transporte de membrana cuya síntesis es estimulada por deficiencia de nitrógeno y cuyas actividades hacen posible que la célula obtenga amonio o glutamato de otros compuestos

Tabla III Genes involucrados en el sistema Gln

Gene	localización cromosomal	Producto	Función
<u>glnA</u>	86	Glutamino sintetasa	Síntesis de glutamina.
<u>glnL</u>	86	NR _{II}	Fosforila NR _I , es regulada por P _{II} .
<u>glnG</u>	86	NR _I	Reprime a los promotores que se sobrelapan con su sitio de unión. En estado fosforilado activa la transcripción de los promotores Ntr.
<u>glnF</u>	68	σ^{54}	Factor sigma para los promotores Ntr. Este gene se denomina actualmente <u>rpoN</u> .
<u>glnB</u>	55	P _{II}	Detectar o transmitir la señal de escasez de nitrógeno a NR _{II}
<u>glnD</u>	4	UTasa	Uridilación de P _{II} en respuesta a la tasa de α -ceto/amonio.
<u>glnE</u>	?	ATasa	Adenilación de la GS.

nitrogenados. Se dice que una proteína está sujeta a regulación Ntr si está presente a altas concentraciones en células creciendo en una fuente pobre de nitrógeno, y en baja concentración cuando son cultivadas en una concentración alta de amonio. Además, casi todas las mutaciones en el sistema Gln afectan Ntr.

Los componentes del sistema Ntr pueden ser separados en dos clases, (A) aquellas enzimas cuya única función es la asimilación de nitrógeno y, (B) aquellas que son capaces de suplir a las células con energía y carbono. La formación de enzimas de la primera clase es totalmente dependiente de los productos de los genes glnF y glnG; la formación de enzimas de la segunda clase puede ser susceptible de represión por catabolito, y pueden ser activadas por los productos de los genes cya y crp. Además, los miembros de cualquiera de las dos clases pueden ser controlados por los productos de genes regulatorios específicos para cada efector (13,34).

Un notable miembro de la primera clase de enzimas es el sistema Nif y los factores accesorios para la conversión de nitrógeno molecular a amonio en Klebsiella pneumoniae. Las mutaciones en glnG provocan fenotipo Nif⁻ porque son incapaces de producir elevadas concentraciones de nitrogenasa cuando son crecidas en una fuente pobre de nitrógeno (35,36). Las mutantes con fenotipo GlnC tienen una elevada concentración de nitrogenasa, aún cuando las células sean crecidas en un medio que contenga amonio (37,38,39). El sistema Nif involucra complejos sistemas de regulación, los cuales están sujetos a un control

específico ejercido por los componentes del mismo sistema Nif (nifAL), y éstos a su vez son activados por un control general ejercido por las proteínas sigma 54, NR_x y NR_{xx} (40,41). De esta manera los siete operones que conforman el sistema Nif poseen la secuencia consenso característica de los promotores transcritos por sigma 54. Unicamente el operón nifAL requiere NR_x (y por lo tanto NR_{xx}), y el resto de los operones requiere como activador al producto del gene nifA (41,42).

Además de estas enzimas, en Salmonella typhimurium existen proteínas que transportan aminoácidos y pertenecen al grupo (B) de enzimas Ntr (43,44). Las tasas de entrada de lisina, arginina, ornitina, glutamina, histidina, etc. se incrementan cuando las células son crecidas en una fuente pobre de nitrógeno. De la misma manera, las mutantes con lesiones en glnL de fenotipo GlnC tienen una tasa de entrada mayor para estos aminoácidos (43,44).

Para el gene argT, el cual codifica para la proteína involucrada en el transporte de lisina, arginina y ornitina en S.typhimurium, parecen existir dos promotores, uno para la polimerasa sigma 54, y otro para la polimerasa sigma 70. Hacia arriba de este promotor se encontró una secuencia consenso para CRP-AMP_c, lo cual apoya los datos que mostraban control por carbono de esta proteína (45,46).

El mejor ejemplo estudiado de un sistema Ntr del grupo (B) son las enzimas de degradación de histidina (Hut), cuya síntesis es inducida por L-histidina. En Klebsiella pneumoniae se observó que estas enzimas se encuentran en muy bajas concentraciones cuando

son crecidas en glucosa y amonio, pero su concentración aumenta cuando se reemplaza la glucosa y el amonio por fuentes pobres de carbono y nitrógeno (ver Tabla 1) (47); ésto aunado a una mayor evidencia, ha permitido establecer que los genes de las enzimas Hut se organizan en dos operones, los cuales son regulados por un represor que es el producto del gene hutC, el cual es a su vez miembro de uno de los dos operones. El represor es neutralizado por urocanato, el primer producto de degradación de la histidina, catalizado por la enzima histidasa (48).

Ha sido demostrado que estas enzimas responden a los productos de los genes glnF y glnG y a $CRP-AMP_{\epsilon}$. En la cepa silvestre, durante la escasez de nitrógeno y energía, se induce la síntesis de histidasa. En mutantes crp y glnG sólo la escasez de nitrógeno y la falta de energía, respectivamente, provocan tal activación (48,48,50).

Algunas enzimas capaces de suplir a la célula con amonio no están sujetas a la regulación Ntr en organismos entéricos. La mayoría de estos sistemas responden a la regulación específica y a la represión catabólica; en este grupo se encuentran la triptofanasa, la L-serina y la D-serina desaminasa de Escherichia coli y Klebsiella aerogenes (51,52).

Organización de los genes glnA glnL y glnG y su expresión.

La clonación de la región que contiene estos genes del cromosoma de Escherichia coli, y su análisis, así como los

estudios de complementación de mutaciones con plásmidos conteniendo fragmentos de DNA de diferentes tamaños provenientes del segmento originalmente clonado, han demostrado que los genes glnA glnL y glnG se encuentran contiguos en el minuto 89 en una región de aproximadamente 4500 pares de bases (53-57).

El análisis de los polipéptidos codificados en los plásmidos híbridos utilizando el sistema de minicélulas, permitió identificar los productos de los genes glnL y glnG. También ha sido posible determinar la orientación de estos genes en el cromosoma de Escherichia coli, demostrándose que se transcriben en el sentido contrario de las manecillas del reloj a partir de glnA hacia glnG (53,58)

El hecho de que algunas mutaciones puntuales o inserciones en glnA tuvieran un fenotipo Ntr^- indicaba que estos genes forman parte de un operón. Sin embargo, existían datos que no apoyaban completamente esta hipótesis, ya que las cepas merodiploides con inserciones en glnA y en glnG en posición trans, disponían de regulación normal para la formación de glutamino sintetasa, pero estas mismas cepas presentaban fenotipo Ntr^- (47,59).

Estos datos pueden conjuntarse si se considera la existencia de un operón complejo; esto es, si se considera que existe otro promotor situado después de glnA. Esta conclusión implica que el gene glnG se puede transcribir a partir de cualquiera de los dos promotores, pero la concentración necesaria del producto de glnG (NR_1) para activar la expresión de los genes Ntr sólo se obtiene cuando este gene se transcribe a partir del promotor de glnA

(58).

Esta hipótesis se ve apoyada por estudios de la expresión de glnG en Escherichia coli, fusionado a lacZ, de tal manera que las actividades de β -galactosidasa reflejan la regulación a la cual se encuentra sometido este gene. Los resultados de tal estudio confirmaron que NR_x funciona como activador y como represor de la transcripción de glnA, y por otro lado, que la transcripción que se inicia en el promotor de glnA, continúa hasta glnG (57). Así pues, se sugiere que los niveles relativamente altos de NR_x presentes durante limitación de nitrógeno se obtienen gracias a la transcripción que se inicia en el promotor de glnA. Por otro lado, en células crecidas en exceso de amonio, NR_x se encuentra en bajas concentraciones y su transcripción es a partir del promotor ubicado después de glnA; esta baja concentración parece ser suficiente, para reprimir el promotor de glnA y también resulta suficiente para iniciar la activación de la transcripción del mismo, pero parece ser insuficiente para activar la expresión de los sistemas Ntr (13,57,60).

La región intercistronica entre glnA y glnL fue posteriormente clonada frente a 'lacZ y se identificó una región que además de promover la expresión de β -galactosidasa, es regulada negativamente por NR_x , al promotor localizado en esta zona se le denominó pglnL (24). Posteriormente fue reportada la secuencia nucleotídica de esta región promotora en Klebsiella pneumoniae y Escherichia coli; mediante mapeo por S_1 se identificó el +1 para el RNAm proveniente de pglnL, y se observó que NR_x protege parte

de esta región, la cual es homóloga a la secuencia consenso de unión a NR_x previamente descrita (61,62).

Hasta principios de 1984 se creía que este operón complejo se expresaba de dos promotores, uno antes de glnA y otro en la región intercistronica de glnA y glnL. Sin embargo el promotor de glnA era el único sujeto a un control dual por NR_x, esto es, podía ser reprimido y activado en diferentes condiciones de nitrógeno.

En este año se reportó un tipo de cepas mutantes que se encontraban afectadas en la regulación de la GS en condiciones de exceso de nitrógeno, pero la enzima era normalmente regulada durante limitación del mismo (63,64). De aquí una exploración mas a fondo de ¿por qué en ciertas mutantes sólo se afecta un tipo de regulación? y ¿por qué la región regulatoria de glnA era la única sujeta a control dual?. La respuesta a estas preguntas estableció la existencia de dos promotores separados por aproximadamente 100 pb que permiten la expresión de glnA (65,66). Mediante mapeo por S₁ se determinó el punto de inicio de cada uno de los transcritos; además se identificó el posible promotor y se estableció que uno está sujeto a control negativo y el otro está sujeto a activación. Estos promotores fueron denominados glnAp1 y glnAp2; el primero se encuentra distal al marco de lectura abierto de glnA y glnAp2 se sitúa 100 pb a la derecha de glnAp1, proximal al marco de lectura de glnA (66).

El promotor glnAp1 es un promotor consenso para la polimerasa σ -70, de baja eficiencia; la región -10 es 50% homóloga a la

secuencia consenso y 18 pb hacia arriba el -35 también presenta 50% de homología con el promotor consenso. La transcripción de este promotor requiere activación por CRP, encontrándose una secuencia consenso para la misma en las posiciones -196 y -180. NR_x reprime la expresión de este promotor en condiciones de limitación de nitrógeno; esto determinado por la cantidad de transcrito específico y por la actividad de β-galactosidasa en una construcción glnAp1-lacZ (65,66) .

La transcripción de glnAp2 requiere de la RNA polimerasa "core" asociada con el factor sigma 54 (pg rpoN); esta holoenzima reconoce la secuencia del promotor y se asocia a éste formando un complejo cerrado estable, el cual no forma complejo abierto y no inicia transcripción hasta ser activado por NR_x (15,16,19).

En la región regulatoria de glnA se han descrito cinco sitios de unión a NR_x (fig. 2); los sitios 1 y 2 son clasificados como sitios de alta afinidad, el sitio 3 de afinidad intermedia, y los sitios 4 y 5 son sitios de baja afinidad. In vivo sólo se ha identificado unión a los sitios 1 y 2, y moderadamente al sitio 3 (15,18,67).

Cuando NR_x-P se encuentra unido a los sitios 1 y 2, y probablemente al sitio 3, ocurre la isomerización del complejo cerrado a complejo abierto en glnAp2, dependiente de la hidrólisis de ATP; este fenómeno estimula la transcripción cerca de 1,000 veces (18,19,67).

Un rasgo novedoso en este fenómeno de activación, es que los sitios 1 y 2 de unión a NR_x poseen propiedades de "enhancers"

transcripcionales, esto es, que pueden situarse 1,400 pb arriba o abajo de glnAp2 y continúan activando la transcripción (68).

La evidencia sugiere que NR_x unido al enhancer estimula la transcripción mediante su directa interacción con la RNA polimerasa-sigma 54 unida a glnAp2, formando un asa en el DNA

El modelo que explica la acción de los enhancers mediante la formación de un asa en el DNA ha recibido apoyo experimental, por ejemplo, se ha demostrado que el enhancer de SV40 puede estimular la transcripción situado en trans al gene de β -globina, si las dos moléculas de DNA se encuentran estrechamente asociadas por un puente de proteína (69); o por concatenación del DNA, en el caso de los sitios 1 y 2 y glnAp2 (70).

Además se ha observado por microscopía electrónica que NR_x unido al enhancer, y la RNA polimerasa unida a glnAp2, interactúan formando un asa en el DNA (71).

Posterior a la interacción de la polimerasa con NR_x, es probable que ocurra un cambio conformacional en la holoenzima, que facilita la desnaturalización de la doble hélice en glnAp2, incrementándose la transcripción (17).

Cabe mencionar que los sitios 1 y 2 necesarios para la activación, son los que permiten que ocurra represión en glnAp1, debido a que ambas regiones se encuentran sobrepuestas (68).

En resumen, en condiciones de limitación de nitrógeno la proteína P_x es uridilada por la UTasa y NR_x fosforila a NR_x; NR_x-P activa la transcripción de glnAp2 y de todos los promotores Ntr, y reprime la transcripción de glnAp1 y de pglNL.

Durante el crecimiento en exceso de nitrógeno la UTasa provoca la desuridilación de P₁₁ y ésta activa la defosforilación de NR₁ mediada por NR₁₁; NR₁ en su estado no fosforilado no activa los promotores Ntr, y se libera la represión de glnA₁ y de pglnL, los cuales mantienen los niveles basales de GS y principalmente de NR₁₁ y NR₁ capaces de responder a cualquier cambio en la concentración de amonio.

Antecedentes y Objetivo

Una mutación en el gene rpoN (glnF) provoca que la cepa sea auxotrófa de glutamina, dado que, glnA₂ no puede ser reconocido como promotor, y glnA₁ está parcialmente reprimido. Existen varios tipos de mutaciones supresoras de este fenotipo (Gln⁻) que han sido reportadas previamente.

Las primeras mutaciones descritas de este tipo son mutaciones secundarias en glnG, las cuales aparecen de manera espontánea, con muy alta frecuencia en un cultivo de una cepa rpoN⁻. En estas dobles mutantes, la transcripción del gene glnA muy probablemente ocurre a partir de glnA₁ liberado de la represión ejercida por NR₁ (59,72).

Posteriormente se reportaron, tanto para Escherichia coli y para Salmonella typhimurium, mutaciones supresoras de rpoN que incrementan la expresión del promotor glnA₁, muy probablemente incrementando la fuerza del promotor sin interferir con la represión (63,64,73).

Finalmente, se han reportado mutaciones que generan nuevas secuencias promotoras en esta región, permitiendo una mejor expresión de glnA utilizando la RNA polimerasa con σ^{70} (74).

Al iniciar este trabajo nos preguntamos si era posible cambiar la especificidad de la región regulatoria, o si existía otro tipo de mutaciones supresoras, como las que eliminasen la represión de glnA_{p1} sin mutar el gene glnG.

Con este objetivo nos propusimos aislar y caracterizar mutaciones supresoras del fenotipo Gln⁻ ocasionado por mutaciones en rpoN, en presencia de un plásmido con glnG⁺ en multicopia para evitar la aparición de mutantes glnG dominantes.

RESULTADOS

microbiology

Institute of Molecular Medicine,
John Radcliffe Hospital,
Oxford OX3 9DU,
Great Britain.

Tel: (0)865 752423 **222423**
Fax: (0)865 752431 **222431**

**PLEASE NOTE CHANGE OF
TELEPHONE/FAX NUMBERS**

22 October 1990

Dr F Bastarrachea
Departamento de Biología Molecular
Instituto de Investigaciones Biomedicas
Universidad Nacional Autonoma de Mexico
Apartado Postal 70-228
04510 Mexico, D.F.
MEXICO

Dear Dr Bastarrachea,

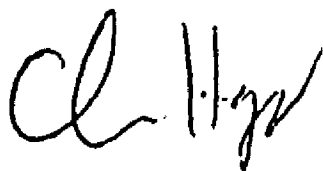
Re: Manuscript 90-862

Attached is a detailed referee's report on your manuscript "An inversion of two adjacent bases ..." which was submitted to Molecular Microbiology. As I have not yet received a second referee's report, and in the interest of speed, I have looked at the manuscript myself.

As the referee says, and I agree, this is a potentially rather interesting paper. However, your results are unexpected and, perhaps, go against the dogma. Therefore, it is essential that your conclusions are fully supported by experimental data. The referee raises some very pertinent points which must be addressed before the manuscript can be accepted. In particular, the experiment suggested in Point 2 involving titration of NRI are important. In addition, the experiments (or similar ones) suggested in Point 3 are also essential to establish your conclusions. I am sure you should have no problem providing this additional data which will then make this a very interesting paper which we would be pleased to publish in Molecular Microbiology. I look forward to receiving a suitably enhanced version of the manuscript which we will then handle as rapidly as possible.

Thank you for submitting your paper to Molecular Microbiology. I hope you will submit future papers to the journal.

Yours sincerely,



Professor C F Higgins

Encs

Editor	Prof. C. F. Higgins
North American Editor	Dr G. K. Schoolnik
Reviews Editor	Dr A. P. Pugsley

This is an interesting paper, but with some findings which are rather surprising and which require further analysis before they are acceptable for publication.

Specifically:

(1) If NRI-P levels are too low to allow occupancy of the sites other than the high affinity site upstream in glnAP2 it is surprising that growth on arginine is apparently unaffected. A more qualitative estimate of arg-dependent growth would be useful.

(2) As the authors point out, other workers have shown occupancy of sites 2, 3, 4 and 5 was not cooperative with binding to NRI-site 1, yet the authors suggest it might be. A careful titration of NRI at wt. and mutant glnA promoters is required to substantiate the authors' point - a single NRI concentration is not adequate to prove the point. Since phosphorylation of NRI is known to influence the binding of NRI to some sites, the data obtained in vitro may not reflect what is happening in vivo. The authors should acknowledge this point.

(3) The t_2 -like transcript should be mapped to high resolution and the synthesis of a transcript at glnAp2 which is σ^{54} independent should be examined with the appropriate rpoN-background. Otherwise the discussion is really rather unsupported, and certainly at variance with the well accepted and published observations that glnAp2 is occupied by $E\sigma^{54}$ at all times in vivo and occupancy in the closed complex is NRI independent in vitro.

(4) Results of the Magasanik, Kustu and Gralla labs clearly indicate which guanine residues are close-contacted by NRI at site 1. How does this correlate with the mutations in the NRI binding site? This is an obvious piece of discussion which is absent.

Other points for consideration are:

The sequence differences between the published glnAp2 sequence and that observed by the authors should be stated (pg.10).

AN INVERSION OF TWO ADJACENT BASES AT THE NR_r-1 BINDING SITE
IMPAIRS ACTIVATION AND REPRESSON OF glnA TRANSCRIPTION MEDIATED
BY NITROGEN REGULATOR I IN Escherichia coli.

Laura Camarena, Teresa Ballado and Fernando Bastarrachea

Departamento de Biología Molecular
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70-228, México, D.F.
México, 04510

Summary

Escherichia coli rpoN mutants which lack σ^{54} , are unable to initiate glnA transcription at glnAp2 and are glutamine auxotrophs because NR_x (the glnG product), which is made from the weak glnL promoter, represses glnA transcription from glnAp1. From an E. coli strain carrying the rpoN::Tn5 null mutation and glnL⁻-glnG⁺ genes in a multicopy plasmid, we isolated prototrophic revertants. One of them carried a mutation in the chromosomal glnA regulatory region, glnAo91, an inversion of two adjacent bases at the high affinity NR_x-1 binding site. In an otherwise wild type genetic background, the glnAo91 mutation impaired the increase of glutamine synthetase in response to nitrogen limitation. In a gel retardation assay, glnAo91 drastically reduced binding of NR_x to the glnA regulatory region. Northern experiments that were made suggest that mutation glnAo91 allows glnA transcription from glnAp1 and also, albeit weakly, either from glnAp2 with RNA polymerase containing a σ subunit with similar promoter recognition specificity as-, but other than σ^{54} , or from an as yet undescribed additional start site.

Introduction

Transcription of the glnALG operon in E. coli and other enteric bacteria, initiates at glnAp1 and glnAp2 tandem promoters (Reitzer and Magasanik, 1985). glnAp2 as other nitrogen-regulated (Ntr) promoters, contains the consensus sequence TTGGCACA(N₄)TTGCA, which is recognized by the RNA polymerase core coupled to σ^{54} . This subunit is coded for by the rpoN (glnF,ntrA) gene (Hirschman et al., 1985; Hunt and Magasanik, 1985).

For an efficient transcription initiating at glnAp2, the products of glnG and glnL, NR_I and NR_{II}, respectively, are required. NR_{II} has properties of both protein kinase and phosphatase that regulates transcription from glnAp2, controlling the phosphorylation state of the transcriptional activator, NR_I (Ninfa and Magasanik, 1986). The activity of NR_{II} is controlled by the protein P_{II}, which is modified in response to the glutamine/2-ketoglutarate intracellular ratio. During ammonia starvation, the P_{II} protein is uridylylated by UTase and thus, P_{II}-UMP stimulates the kinase activity of NR_{II} on NR_I. Conversely, growth with ammonia excess, causes the conversion of P_{II}-UMP to P_{II}, giving rise to dephosphorylation of NR_I-P by NR_{II} phosphatase activity (Stadtman and Ginsburg, 1974; Chock et al., 1985; Reitzer and Magasanik, 1987).

Under nitrogen limiting conditions, NR_I-P binds to the glnA regulatory region upstream of the promoters to sites with the consensus sequence GCAC(N₆)TGGTGC that have the properties of transcriptional enhancers (Reitzer and Magasanik, 1986; Kustu et al., 1986). This allows the formation of open complexes at glnAp2, which stimulate glnA transcription by 1000 fold (Ninfa et al., 1987; Popham et al., 1989). There are five NR_I binding sites in the glnA regulatory region. In vitro, NR_I-1 and NR_I-2 localized farther upstream glnAp2, display high affinity for NR_I, NR_I-3 has intermediate affinity and NR_I-4 and NR_I-5 have low affinity. In order to elicit an efficient activation, sites 1 and 2 and probably site 3 also, are sufficient (Reitzer and Magasanik, 1986; Kustu et al., 1986; Sasse-Dwight and Gralla, 1988).

Transcription initiation mediated by σ^{70} RNA polymerase holoenzyme at glnAp1 serves to maintain a low intracellular concentration of glutamine synthetase in cells growing under carbon deficiency and nitrogen excess; it is repressed by NR_I probably because the high affinity binding sites NR_I-1 and NR_I-2 overlap a portion of glnAp1 and its transcription initiation site, respectively (Reitzer and Magasanik, 1985).

A mutant lacking functional σ^{70} is auxotrophic for glutamine. Several types of suppressor mutations of the Gln⁻ phenotype have been described. Among them, mutations in glnG which probably transcribe glnA only from glnAp1 (Kustu et al., 1979; Pahel and Tyler, 1979); glnAp1 up mutations (León et al., 1985; McCarter et

al., 1984) and mutations which create new glnA promoters (Reitzer et al., 1987).

In this paper, we describe the isolation and characterization of a suppressor rpoN mutation, an inversion of two adjacent bases at the high affinity NR_I-1 binding site. Its very isolation is indicative of relief of NR_I repression at glnAp1. In addition, the mutation impairs the increase of glutamine synthetase in response to nitrogen limitation even in presence of NR_I, NR_{II} and σ^{54} functional proteins.

Results and Discussion

Isolation and characterization of an rpoN suppressor.

rpoN mutants of E. coli are glutamine auxotrophs because they are unable to activate transcription from glnAp2 and because of the repression exerted by NR_I on transcription that initiates at glnAp1. rpoN mutants revert to glutamine prototrophy at high frequency due to secondary mutations at glnG which relieve the glnAp1 start site from repression (Kustu et al., 1979; Pahel and Tyler, 1979).

Forced selection for glutamine prototrophy was carried out in MX848/pACR8 cells, carrying the chromosomal mutation rpoN73::Tn5 and glnL⁺-glnG⁺ in the multicopy plasmid, pACR8, to avoid the

emergence of dominant glnG mutations. Among spontaneous Gln⁺ colonies that appeared after 72 h of incubation at 37°C on Glucose-minimal-0.5 mM ammonium plates, a few proved to have the characteristics expected for mutations affecting the glnA regulatory region.

P1 lysates made on one Gln⁺ spontaneous mutant, termed MX1195, were used to transduce MX734 (glnA71::Tn5). Gln⁺ (Km^r) transductants which resulted (10 out of 10), coinherited the phenotype of the MX1195 parent, i.e. inability to increase their glutamine synthetase under nitrogen limitation. This indicates that the mutation conferring the Gln⁺ phenotype to MX1195 is glnA linked and also that it is unable to elevate its glutamine synthetase in response to nitrogen limitation, even though cells are proficient for other Ntr-associated functions such as arginine or proline utilization as only nitrogen sources (i.e., MX1199, Table 2).

We reconstituted the original mutant MX1195 by transducing the rpoN73::Tn5 mutation into MX1199. One purified transductant (MX1203) was transformed with pACR8 DNA; the transformants so obtained had a phenotype identical to MX1195, which means that the glnA regulatory mutation was successfully segregated in MX1199. It also confirmed that the mutation expresses inability to raise its glutamine synthetase in response to nitrogen limitation even in the presence of NR_r, NR_{rr} and σ^{54} functional proteins. Our results indicated that we isolated a mutation which affected either glnAp2 start site or which decreased the affinity

of a relevant NR₁-binding site. As we shall show below, the last possibility turned to be correct. We therefore termed the allele glnAo91.

In nitrogen-limiting medium, MX1199 (glnAo91) cells made 10-fold less glutamine synthetase than that made by the wild type strain MX614, but twice as much as that made by MX1203 (glnAo91 rpoN73::Tn5) under similar growth conditions. This difference, apparently gives the measure of the residual activity contributed by Ntr-activation in glnAo91 cells, but could be attributed to other causes as well (see below).

Theoretically, the glnAo91 mutation should make the glnAp1 promoter refractory to repression by NR₁. Under nitrogen excess conditions, however, the glutamine synthetase activities of MX1199 were lower than those of MX614. These results apparently indicate that under nitrogen excess, glnA transcription in MX614 initiates not only at glnAp1 but also at glnAp2 and that the later promoter remains largely inactive in MX1199.

glnA transcription in strains carrying glnAo91.

In extracts of wild type E. coli, two glnA transcripts are detected; a t₁ transcript of 1703 bases and a t₂ transcript of 1644 synthesized from promoters glnAp1 and glnAp2, respectively. Both transcripts have a preferred end, approximately 300 bp downstream the glnA stop codon (Rocha et al., 1985). When cells

are cultured in nitrogen-limiting glucose minimal medium, t_2 transcripts are preferentially synthesized.

We extracted RNA from the reference strains MX614 and MX929 as well as from strains MX1199 (glnAo91) and MX1203 (glnAo91 rpoN73::Tn5) grown under nitrogen excess or deficiency. Results of Northern blots using a glnA DNA probe showed t_1 transcripts in extracts from the glnAo91 mutants (Fig 1, lanes d and f) but not in those of the wild type strain MX614 (Fig 1, lane b). This could mean loss of NR_x repressibility by the glnAo91 mutation or, alternatively, an increased stability of these transcripts.

t_2 transcripts, on the other hand, were made by all strains grown under nitrogen limitation. Quite unexpectedly, MX1203 (glnAo91 rpoN73::Tn5) also made t_2 -like transcripts, under nitrogen limitation. Since in all probability, these cells lack σ^{54} , the size of this RNA suggest that at least some transcription is initiated at glnAp2 or at a nearby, weak promoter, that it is functionally more active during nitrogen limitation and that should use a transcription complex with a sigma subunit other than σ^{54} .

We cannot discard the possibility that the t_2 -like transcript maybe due to residual activation of glnAp2 by wild type σ^{54} in MX1199 (glnAo91) cells. The same reasoning, however, cannot hold for MX1203 (glnAo91 rpoN73::Tn5) unless we invoke the rather unlikely argument of a similar activation by a truncated σ^{54} polypeptide that may be borne from the rpoN73::Tn5 allele (Berg, 1989). Within this context, mutations in the nifHDYK regulatory

region of Klebsiella pneumoniae have been described which allow expression of the nif operon independent of the nifA activator and which do not require the ntrA sigma subunit. It turns out that this mutation increases transcription of a pre-existing constitutive nif promoter which is repressed when nifA and ntrA are functional (Lers et al., 1986). More research is necessary to know the factors involved in initiation of t_2 -like transcripts in glnA091 cells.

Cloning and nucleotide sequence of glnA091.

The glnA091 mutation was cloned by transduction into pACR34. A PivirA lysate made on MX1199 was used to transduce the glutamine auxotroph MX943/pACR34 glnA71::Tn5 to prototrophy.

Since MX943 carries a large chromosomal deletion encompassing the entire glnA region, most if not all resulting transductants arise by homologous recombination that replace the glnA region of the resident plasmid by that of MX1199. Plasmid DNA from one Gln⁺ (Km^r) transductant was purified and used to transform MX943 at low input DNA per recipient ratio. This procedure was repeated until restriction enzyme analysis of the transformed plasmids showed they were freed of the original pACR34 glnA71::Tn5 plasmid. As a control plasmid carrying the wild type glnA regulatory region, we used pACR34.

Plasmids carrying either glnA091 or glnA⁺ were digested with

SmaI and electrophoresed. Fragments of 1.57 Kb carrying the glnA regulatory region from either plasmid, were digested with HaeIII, and from each, we obtained the fragments of 542 bp and 444 bp. These fragments were purified and inserted into the SmaI site of pTZ18R. All glnA-containing fragments were sequenced, when applicable under both orientations, as described in Experimental procedures. Except for two minor discrepancies, the nucleotide sequence of the wild type glnA⁺ regulatory region was identical to that previously reported (Reitzer and Magasanik, 1985). That carrying the glnAo91 mutation showed only one difference with our wild type; an inversion of two adjacent base pairs, CG in place of GC at positions -147 and -146 relative to the t_2 start site of transcription (Fig 2) affecting the high affinity NR_x-1 binding site.

Binding of NRI to the glnA⁺ and glnAo91 regulatory regions.

To determine if the glnAo91 mutation interfered with its binding NR_x, we carried out gel mobility shift assays using purified NR_x and a 169 bp HinfI-DraI DNA fragment from both glnA⁺ and glnAo91 regulatory regions (Fig 3). Binding of NR_x to the wild type HinfI-DraI fragment yielded as expected, a major retarded complex after electrophoresis in 4% acrylamide at low ionic strength. By contrast the corresponding DNA fragment from glnAo91 cells only caused a slight retardation indicating a substantial loss of

affinity of this DNA for the NR_x protein.

That NR_x binding to the wild type HinfI-DraI DNA was specific was demonstrated in an experiment in which a 100-fold excess of cold HinfI-DraI fragment, but not calf thymus or cat DNA displaced the radioactively labelled HinfI-DraI fragment from the complex, in such a way that no radioactively retarded spot was observed (data not shown).

The results of our gel mobility shift assays indicated that the glnA091 mutation almost completely eliminated binding to all NR_x-binding sites, as if binding NR_x to all other non-mutated sites, particularly to the, high affinity, NR_x-2 site, would require occupancy of the NR_x-1 site. We interpret these results in terms of binding cooperativity between the two high affinity binding sites, NR_x-1 and NR_x-2 for their cognate NR_x dimeric protein. In a DNA fragment to which NR_x-1 was deleted, Ninfa et al. (1987) demonstrated NRI binding to the remaining four NR_x-binding sites. More experiments are required to solve this discrepancy.

Previous experiments by A. Garciarrubio (personal communication) have shown that under nitrogen limitation, rpoN73::Tn5 cells make t_x-like transcripts and that these are strongly repressed by growth in glucose. These observations can be further correlated with the fact that rpoN73::Tn5, like other rpoN mutants of E. coli, is suppressed in its glutamine requirement by growth in succinate as sole carbon and energy source (Reitzer and Magasanik, 1986). Working with another rpoN

insertion mutant, Reitzer y Magasanik (1986) did not detect any t_2 -like transcripts but probably did not search for is minor species. Inclusion of this rpoN allele in future work along this line is imperative. We wish to hypothesize that glnA091 cells initiate transcription at glnAp2 with the aid of a σ -factor other than σ^{54} . Whether vacancy of NR_x binding sites as in glnA091 cells stimulates such process as a result of activating transcription by catabolite activating protein-cyclic-AMP, remains an open question.

Altogether, our results suggest that in strains carrying glnA091, NR_x neither activates nor represses glnA transcription at glnAp2 and glnAp1, respectively. Apparently this is all consequence of loss of affinity of the mutated NR_x-1 binding site for the NR_x protein.

Experimental Procedures.

Bacterial and phage

All strains used were derivatives of Escherichia coli K-12 (Table 1).

Enzymes and reagents

All restriction enzymes were purchased from Promega and used

according to the instructions of the supplier. E. coli DNA polymerase (Klenow fragment) was obtained from Boehringer, and T₄ DNA ligase from Bethesda Research Laboratories. Aminoacids, antibiotics and calf thymus DNA were from Sigma Chem. Co.

Culture conditions

Cells were cultured at 37°C, in NN minimal medium (Covarrubias et al., 1980b), with 0.2% (w/v) glucose and 15 mM NH₄Cl for nitrogen excess medium and either 0.5 mM NH₄Cl or 1 mg ml⁻¹ of L-glutamine for nitrogen limiting medium. The presence of transposon Tn5 was scored by resistance to 50 µg ml⁻¹ of kanamycin. Concentrations for other nutritional requirements used ranged from 0.5 to 2 mM (Alderberg and Burns, 1960). The final concentration of antibiotics were as follows: tetracycline 25 µg ml⁻¹, ampicillin 100 µg ml⁻¹. The Ntr phenotype was scored by growth in 0.1% L-arginine (w/v) as sole nitrogen source.

Plasmids

The plasmids used were pACR34 carrying the entire glnALG operon (Covarrubias et al., 1980a), pACR8 carrying glnL⁺ and glnG⁺ genes (Rocha et al., 1985), and the phagesmid pTZ18R (Pharmacia). Plasmid DNA was purified by lysis with alkali (Maniatis et al., 1982).

Genetic procedures

The preparation of P1virA lysates and the protocol for transductions were as described by Miller (1972). *E. coli* cells were prepared for transformation with CaCl₂ (Maniatis *et al.*, 1982).

Enzyme activities

Glutamine synthetase was determined by the glutamyl transferase assay as described by Bender *et al.*, (1977), with minor modifications (Covarrubias *et al.*, 1980b). Specific activities are given as nanomoles of γ -glutamylhydroxamate formed min⁻¹ mg of protein⁻¹ at 37°C. Protein was determined by the method of Lowry *et al.*, (1951) with bovine serum albumin as a standard.

Northern (RNA) blot analysis

Total cellular RNA was extracted by the method of Aiba *et al.*, (1981), except that cells were grown in NN-glucose minimal medium with the indicated nitrogen source. For Northern blot analysis, 10 μ g of RNA samples were denatured in formamide-2.2 M formaldehyde and separated by agarose gel electrophoresis (Maniatis *et al.*, 1982) except that 1 mM KH₂PO₄ and 1 mM Na₂HPO₄ were added to all buffers. The conditions for RNA transfers and hybridizations were as previously described (Thomas, 1980). The RNA's were hybridized with the fragment DraI-EcoRI of glnA DNA labelled with (α -³²P) dATP (3000 Ci mmol⁻¹) by nick translation.

NR_x Purification

Purified NR_x was kindly donated by Mario Rocha. Briefly, NR_x was purified from the strain M5219/pPLgln69 by a procedure (Rocha M., personal communication) different to one previously published (Reitzer and Magasanik, 1983). Plasmid pPLgln69 carries a DNA fragment corresponding to the carboxil-end of glnL, and the entire glnG gene inserted into pPLc28 plasmid under the mandate of a strong p_L promotor (Remau et al., 1981). Strain M5219/pPLgln69 was grown at 30°C on LB broth containing 100 mg l⁻¹ ampicillin to 0.3 units OD_{600nm} and then shifted to 42°C for 3 h. Cells were lysed according to Burguess and Jendrisak (1975) and the soluble fraction obtained after centrifugation at 10000 X g was precipitated with ammonium sulfate to 30% saturation, resuspended and dialyzed against Buffer D (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 mM EDTA, 14 mM 2-mercaptoethanol and 5% glycerol). The solution was applied to a DEAE cellulose column which was eluted with a KCl linear gradient (0 to 0.3 M). The major protein peak was applied to a heparin-agarose column and eluted with Buffer A (20 mM Tris-HCl pH 7.4 and 1 mM dithiothreitol) supplemented with 0.2 M KCl. Purified NR_x giving a single protein band on SDS-PAGE was concentrated with 30% saturated ammonium sulfate and stored at -70°C in Buffer A with 20% glycerol.

DNA sequence analysis

All DNA sequences were determined by the method of Sanger *et al.*, (1977) with [α - 32 S]-thio] dATP (600 Ci mmol $^{-1}$) and Sequenase (United States Biochemical Co.). The fragments to be sequenced were cloned in pTZ18R. Strain JM103 transformed with the plasmids to be sequenced, was infected with helper phage M13K07. Purification of single stranded DNA was done as described by Vieira (1987). The sequence of the opposite orientation was determined in double stranded plasmid DNA; plasmid purification for sequencing was done by lysis boiling (Maniatis *et al.*, 1982). The reverse primer in single strand and the universal primer in double strand DNA's were used for the polymerization reaction.

DNA binding assay

NR $_1$ -DNA complexes were resolved on low ionic polyacrilamide gels as described (Carthew *et al.*, 1985) with some modifications. NR $_1$ samples (200 nM) were pre-incubated with 600 ng calf thymus DNA and 30 μ g of BSA; after 15 min at room temperature, 2ng of end-labelled fragment was incorporated to the reaction. Incubations were carried out at 30°C for 20 min in 10% (v/v) glycerol 10 mM HEPES pH7.9, 60 mM KCl, 6 mM MgCl $_2$, 0.1 mM EDTA and 1 mM dithiothreitol. Samples were layed onto low ionic strengt 4% polyacrilamide gels, transferred to Whatman 3 MM, dried and autoradiographed. The HinfI-DraI fragment of the glnA regulatory region corresponding to 169 bp was cloned in pTZ18R, recovered by digestion with EcoRI-BamHI and then filled with Klenow polymerase

using (α - 32 P)dATP. They were purified through a Sephadex G50 column before the assay. DNA containing the cat gene was obtained as a BamHI fragment of 750 bp from pCM4 plasmid (Pharmacia).

Acknowledgements

We are grateful to Mario Rocha for the generous gift of purified NR₁ protein and its purification protocol, to A. Garciarrubio for communication of unpublished data and to Aurora V. Osorio for technical assistance. This work was aided by grant P220CC0X 891531 from Conacyt-México

Table 1. List of Escherichia coli strains

Strain	Genotype	Source or reference
MX614	(<u>pro-lac</u>) <u>galE</u> <u>ilv-680 thi-1</u>	Bastarrachea <u>et al.</u> , 1980
MX734	same as MX614 but <u>glnA71::Tn5</u>	Bastarrachea <u>et al.</u> , 1980
MX848	same as MX614 but <u>rpoN73::Tn5</u>	Osorio <u>et al.</u> , 1984
MX929	same as MX614 but <u>glnAp76</u>	Osorio <u>et al.</u> , 1984
MX943	(<u>pro-lac</u>) <u>supF thi-1</u> (<u>gal-att-bio</u>) <u>lamB Sm^r</u> (<u>glnALG-rha</u>) <u>ilv-680</u>	Laboratory collection
JM103	(<u>pro-lac</u>) <u>thi rpsL endA</u> <u>sbcB hsdR F' traD36 proAB</u> <u>lacI-Z^{M15}</u>	Messing <u>et al.</u> , 1981

Table 2. Levels of glutamine synthetase in strains carrying glnAo91

Strain	Relevant genotype	Arginine utilization	Glutamine synthetase sp act ^a	
			Glucose-0.5 mM NH ₄ ⁺	Glucose-15 mM NH ₄ ⁺
MX614	wild type	+	1620	120
MX1199	<u>glnAo91</u>	+	180	72
MX1203	<u>glnAo91</u> <u>rpoN73::Tn5</u>	-	69	54
MX1203/pACR8	<u>glnAo91</u> <u>rpoN73::Tn5</u>	-	73	45

^a nanomoles of γ -glutamylhydroxamate formed min⁻¹ mg of protein⁻¹ at 37°C.

Legends for the figures

Fig.1. Autoradiographs of Northern blots to illustrate the transcripts that originate from E. coli carrying glnA091. RNA's (10 µg each) were probed with a DraI-EcoRI DNA fragment of glnA (Fig.2) labelled with (α - 32 P)dATP by nick traslation. The RNA sources are: lanes a and b, MX614 (wild type); c and d, MX1203 (glnA091 rpoN73::Tn5); e and f, MX1199 (glnA091); g and h, MX929. Cells were grown in Glucose minimal medium with 0.5 mM NH_4^+ (lanes a,c,e and g) or 15 mM NH_4^+ (b,d,f and h) as nitrogen sources. Autoradiographs were exposed either two days for MX614 and MX929 or one week for MX1199 and MX1203. MX929 glnAp76 (León et al., 1985) was included as a reference for t_1 transcripts which are difficult to visualize in wild type strains (c.f.,MX614, lanes a and b).

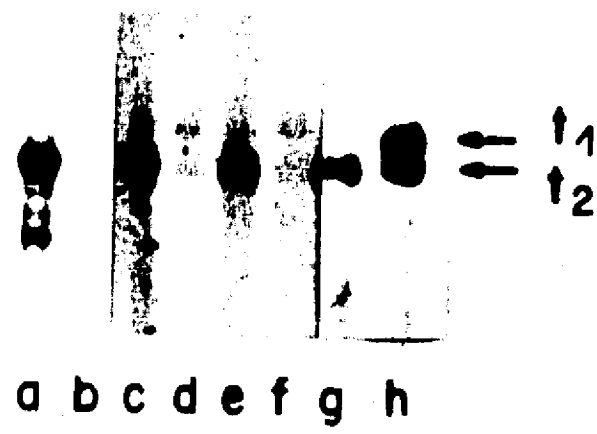
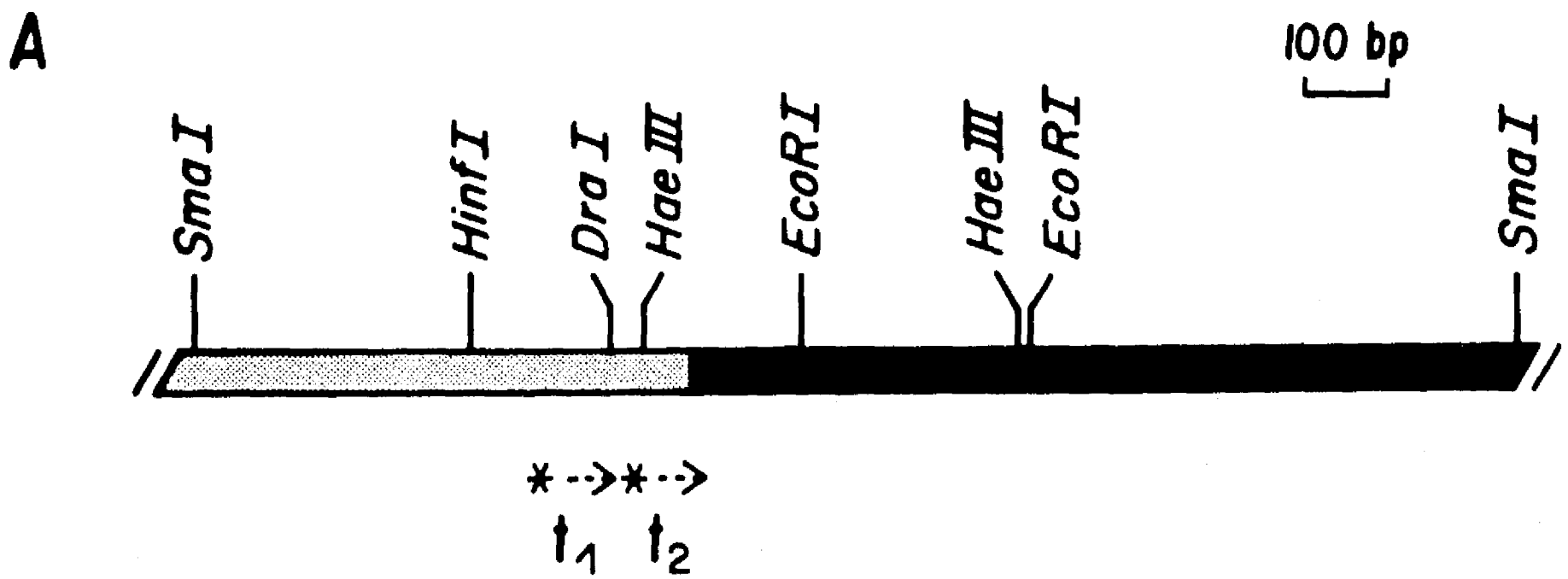


Fig. 1

Fig. 2. Nucleotide sequence of the glnA regulatory region carrying glnA₀₉₁. The wild type sequence we determined, except for two changes, was largely identical to that reported by Reitzer and Magasanik (1985), an amendment of an earlier version (Covarrubias and Bastarrachea, 1983). These changes involve positions -210, an addition of a G and, at -202, substitution of a G in place of a C. This last substitution actually defines the presence of a HinfI restriction site. (A) Restriction map. Solid bar, glnA open reading frame; stippled bar, glnA regulatory region. (B) Nucleotide sequence of the glnA regulatory region. The sites of initiation and the direction of transcription are indicated by asterisks and arrows, respectively. The high affinity NR₂ binding sites 1 and 2 are underlined with solids bars and the low affinity sites 3, 4 and 5 are underlined with α chains. The +1 reference nucleotide is the first base of the t₂ transcript. The two base inversion that defines glnA₀₉₁ is indicated at nucleotides -147 and -146.



B

-250

TTATTGTACACGGATTAATCGCACTACAAAACAGGATCACAAACATCCTCGCAAACA

-200

AGTATTGCAGAGTCCCTTTGTGATCGCTTTCACGGAGCATAAAAAGGTTATCCAAAG

CG †₁ †₂ -100

GTCATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTTCCAATTGAAGCACTATATTGGTGCAACAT

NRI-1 NRI-2

TCACAICGTGGTGCAGCCCTTTTGCACGATGGTGCGCATGATAACGCCTTTTAGGGGC

NRI-3 NRI-4 NRI-5

†₂

AATTTAAAAGTTGGCACAGATTCGCTTTATCTTTTTTACGGCGACACGGCCAAAATA

+50

ATTGCAGATTTTCGTTACCACGACGACCAIGACCAATCCAGGAGAGTTAAAGTATGTCC

met

Fig. 2

Fig. 3. Mobility shift assays to illustrate the loss of affinity of the glnA regulatory region carrying the glnAo91 mutation for NR_x protein. The reaction mixtures containing purified NR_x and radioactively labelled HinfI-DraI DNA fragment from the glnA regulatory region (Fig. 2) were incubated, electrophoresed and autoradiographed as described in Experimental procedures. Lanes A and B, wild type HinfI-DraI fragment from MX614 (glnA⁺) without (a) and with (b) 200 nM NR_x. Lanes c and d, the HinfI-DraI fragment from MX1199 (glnAo91) without (c) and with (d) 200 nM NR_x

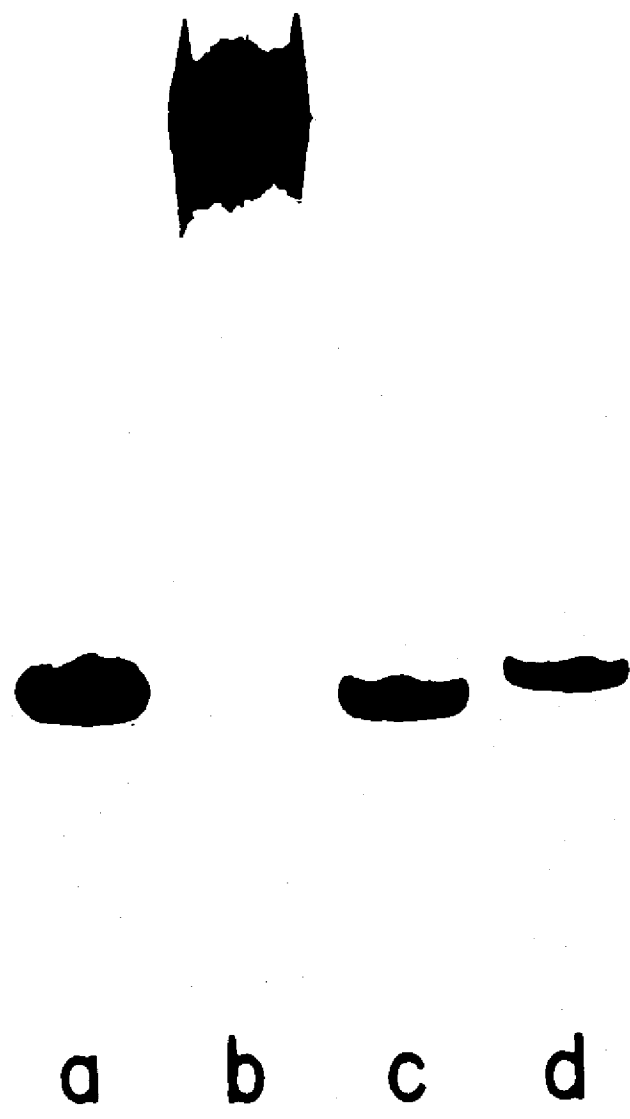


Fig. 3

References

- Adelberg, E.A., and Burns, S.N. (1960) Genetic variation in the sex factor of Escherichia coli. J. Bacteriol 79: 321-330.
- Aiba, H., Adhya, S., and De Crombrughe, B. (1981) Evidence for two functional gal promoters in intact Escherichia coli cells. J Biol Chem 256: 11905-11910.
- Bastarrachea, F., Brom, S., Covarrubias, A.A., Osorio, A.V., and Bolivar, F. (1980) Genetic characterization of mutations affecting glutamine biosynthesis and its regulation in Escherichia coli K-12. In Glutamine: Metabolism, Enzimology and Regulation. Mora J., and Palacios R. (eds). New York: Academic Press, pp. 107-121.
- Bender, R.A., Janssen, K.A., Resnick, A.D., Blumenbenberg M., Foor, F., and Magasanik, B. (1977) Biochemical parameters of glutamine synthetase from Klebsiella aerogenes. J Bacteriol 129: 1001-1009.
- Berg, D.E. (1989) Transposon Tn5. In Mobile DNA, Berg, D.E. and Howe, M.M. (eds). American Society for Microbiology, Washington pp. 185-210.

- Burgess, R.R., and Jendrisak, J.J. (1975) A procedure for rapid, large-scale purification of Escherichia coli DNA-dependent RNA polymerase involving polymin P precipitation and DNA cellulose chromatography. Biochem 14: 4634-4638.
- Carthew, R.W., Chodosh, L.A., and Sharp, P.A. (1985) An RNA polymerase II transcription factor binds to an upstream element in the adenovirus major late promoter. Cell 43: 439-448.
- Chock, P.B., Schacter, E., Jurgensen, S.R., and Rhee, S. (1985) Cyclic cascade systems in metabolic regulation. Curr Top Cell Regul 27: 3-12.
- Covarrubias, A.A., and Bastarrachea, F. (1983) Nucleotide sequence of the glnA control region of Escherichia coli. Mol Gen Genet 190: 171-175.
- Covarrubias, A.A., Rocha, M., Bolivar, F., and Bastarrachea, F. (1980a) Cloning and physical mapping of the glnA gene of Escherichia coli K-12. Gene 11: 239-251.
- Covarrubias, A.A., Sanchez-Pescador, R., Osorio, A.V., Bolivar, F., and Bastarrachea, F. (1980b) ColE1 hybrid plasmids containing Escherichia coli genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine. Plasmid 3: 150-164.

Hirschman, J., Wong, P.-K., Sei, K., Keener, J., and Kustu, S.

(1985) Products of nitrogen regulatory genes ntrA and ntrC of enteric bacteria activate glnA transcription in vitro: evidence that the ntrA product is a σ factor. Proc Natl Acad Sci USA 82: 7525-7529.

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

Kustu, S., Burton, D., Garcia, E., McCarter, L., and McFarland, N. (1979) Nitrogen control in Salmonella: regulation by the glnF and glnR gene products. Proc Natl Acad Sci USA 76: 45-76.

Kustu, S. Sei, K. and Keener J. (1986) Nitrogen regulation in enteric bacteria In Booth, I.R., and Higgins C.F. (eds.), Regulation of gene expression, Symposium of the Society for General Microbiology. Cambridge University Press, Cambridge. pp 139-154.

León, P., Garcíarrubio, A., Bastarrachea, F., and Covarrubias A.A. (1985) Glutamine synthetase-constitutive mutation affecting the glnALG upstream promoter of Escherichia coli. J Bacteriol 164: 1032-1038.

Lers, A., Bitoun, R., and Zamir, A. (1986) Transcriptional analysis of promoter mutations in the Klebsiella pneumoniae nifHHDYK operon. J Bacteriol 165: 175-180.

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

Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.

McCarter, L., Krajewska-Grynkiewicz, K., Trinh, D., Wei, G., and Kustu, S. (1984) Characterization of mutations that lie in the promoter-regulatory region for glnA, the structural gene encoding glutamine synthetase. Mol Gen Genet 197: 150-160.

Messing, J., Crea, R., and Seeburg, P.H. (1981) A system for shotgun DNA sequencing. Nucleic Acid Res 9: 309-321.

Miller, J. (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.

Ninfa, A.J., and Magasanik, B. (1986) Covalent modification of the glnG product NR_x, by the glnL product, NR_{xr}, regulates the transcription of the glnALG operon in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci USA 83: 5909-5913.

Ninfa, A.J., Reitzer, L.J., and Magasanik, B. (1987) Initiation of transcription at the bacterial glnAp2 promoter by purified E. coli components is facilitated by enhancers. Cell 50: 9-1046.

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

Pahel, G., and Tyler, B. (1979) A new glnA-linked regulatory gene for glutamine synthetase in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci USA 76: 4544-4548.

Popham, D.L., Szeto, D., Keener, J., and Kustu, S. (1989) Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhancers. Science 243: 629-635.

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

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

Reitzer, L.J., Bueno, R., Cheng, W.D., Abrams, S., Rothstein, D. M., Hunt, T.P., Tyler, B., and Magasanik, B. (1987) Mutations that create new promoters suppress the σ^{54} dependence of glnA transcription in Escherichia coli. J Bacteriol 169: 4279-4284.

Reitzer, L.J., and Magasanik, B. (1986) Transcription of glnA in E. coli is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. Cell 45: 785-792.

Reitzer, L.J., and Magasanik B. (1987) Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine and D-alanine. In Ingraham, J.L., Low, K., B., Magasanik, B., Schaechter, M., and Umbarger, H.E. (eds). Escherichia coli and Salmonella typhimurium, cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 302-320.

Remau, E., Stanssens P., and Fiers, W. (1981) Plasmid vectors for high-expression controlled by the p_L promoter of coliphage lambda Gene 15: 81-93.

Rocha, M., Vazquez, M., Garcarrubio, A., and Covarrubias A.A. (1985) Nucleotide sequence of the glnA-glnL intercistronic region of Escherichia coli. Gene 37: 91-99.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463-5467.

Sasse-Dwight, S., and Gralla, J.D. (1988) Probing the Escherichia coli glnALG upstream activation mechanism in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 85: 8934-8938.

Stadtman, E. R., and Ginsburg, A. (1974) The glutamine synthetase of Escherichia coli: structure and control. In Boyer P.D. (ed) The enzymes, vol 10. Academic Press, New York. pp 755-807.

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

Vieira, J., and Messing, J. (1987) Production of single stranded plasmid DNA. Meth Enzymol 153: 3-11.

DISCUSION

En el presente trabajo se describe una nueva clase de mutaciones supresoras del fenotipo Gln^- ocasionado por la mutación rpoN73::Tn5.

Como ya se había mencionado en la Introducción, se han reportado varios tipos de mutantes supresoras de diferentes alelos rpoN⁻; sin embargo, el tipo de mutación caracterizado en este trabajo no fue aislado antes, lo cual probablemente sugiere que este tipo de mutaciones no habían sido seleccionadas adecuadamente, o bien la frecuencia a la que ocurren es baja. Quizás el lento crecimiento de la cepa MX1203 (muy semejante a MX1195) en condiciones de limitación de nitrógeno (posiblemente ocasionado por los bajos niveles de GS), permita que sean seleccionados otros tipos de poblaciones con mayor tasa de crecimiento.

De hecho las primeras mutantes que nosotros seleccionamos poseían dos veces más actividad de GS que la cepa MX1203 (muy semejante a MX1195), y fueron las primeras colonias en aparecer en el medio de cultivo, un par de días después, fue posible distinguir las colonias con fenotipo igual al de la cepa MX1195. Las primeras colonias que aparecieron fueron parcialmente caracterizadas, y se observó que la transcripción del gene glnA en condiciones rpoN73::Tn5 provenía de un sitio ubicado 500 pares de bases arriba de la región regulatoria de glnA. Posteriores análisis nos llevaron a pensar que esta cepa podía representar un rearreglo de esta región del cromosoma que generase un nuevo

promotor o que ubicase un promotor preexistente frente a glnA.

Igualmente el tipo de mutaciones supresoras aisladas por Reitzer et al. (1987) (74), presentan un elevadísimo nivel de GS (cerca de 20 veces más que MX1199) en fondo genético rpoN⁻, esta mutación representa un cambio de TCTT a ACC. Este cambio genera una región -35 a una distancia adecuada de un putativo -10, este nuevo promotor permite la transcripción de glnA.

Anteriormente McCarter et al. (64) caracterizaron dos tipos de mutaciones seleccionadas como supresores del fenotipo Gln⁻ de rpoN75, las cepas aisladas presentaron cerca de dos veces la actividad de MX1203, estas cepas son inserciones de IS10 arriba de glnA_{pl} permitiendo la transcripción de glnA a partir de del promotor P_{glnA} de la IS.

En ambos casos reportados y en nuestras primeras mutantes aisladas, se generan promotores que permiten la expresión de glnA a niveles ligeramente mayores que los encontrados en la cepa MX1203. Esta puede ser la causa de que este tipo de mutación no haya sido previamente aislada.

La mutación glnA_{o91} provoca que NR_x disminuya su afinidad por la región regulatoria de glnA, y muy probablemente la transcripción a partir de glnA_{pl} aumenta debido a la pérdida de la represión ejercida por NR_x.

En la hibridización de la fig. 1, podemos observar que en las cepas MX1203 hay un transcrito que comigra con t₂, sin embargo debido a la ausencia de sigma 54 es prácticamente imposible que sea t₂.

Nosotros suponemos que este transcrito no es específico de la cepa MX1203, sino que puede ser observado también en la cepa progenitora (MX848). Dado que, Alejandro Garcíarrubio había caracterizado previamente la transcripción de algunas cepas con la mutación rpoN73::Tn5, para la cepa MX848 (rpoN73::Tn5) los transcritos de glnA son apenas perceptibles, aunque con mucha exposición se ven dos bandas muy tenues las cuales son más definidas al utilizar multicopia del operón (Figura 4). Sin embargo la mejor definición se observa al utilizar el RNA de la cepa MX848 crecida en lactato como fuente de carbono (Figura 4), observándose el transcrito correspondiente a t_1 y un transcrito que migra igual al t_2 silvestre, esto sugiere que el RNAm que se observa en la cepa MX1203, no se produce específicamente por la presencia de glnA091, ya que en la cepa progenitora MX848 ya se presenta dicho transcrito.

El origen del RNAm que comigra con t_2 , denominado transcrito "parecido a t_2 ", es desconocido y existen dos posibilidades para explicar su presencia. La explicación más sencilla podría implicar que éste en realidad fuera un producto de degradación de t_1 , dado que el transcrito "parecido a t_2 " aumenta siempre que aumenta t_1 .

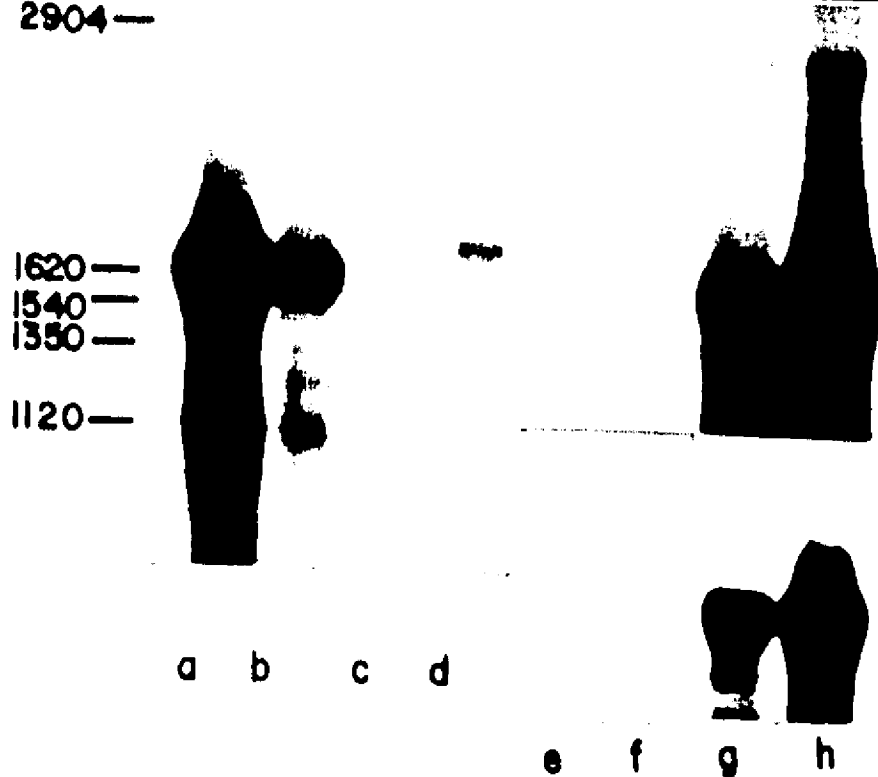
Alternativamente, es posible considerar la existencia de otro promotor, que de manera análoga al operón nifHDYK de Klebsiella pneumoniae se localiza arriba del promotor normal del operón, y solamente puede expresarse a muy bajos niveles en ausencia del factor sigma 54 y de el producto del gene nifA (en este caso,

Figura 4

A

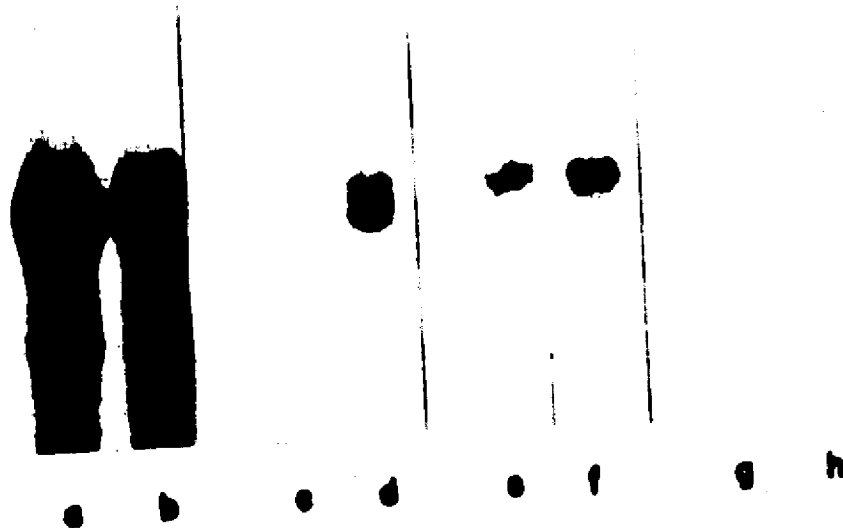
Strain	Probe A							
	MX 614		MX 902		MX 848		MX 1019	
Nitrogen source	↓	↑	↓	↑	g	g↑	↓	↑
G. S. sp. ac.	199	026	002	005	-	-	211	177

2904—



B

Strain	Probe A							
	MX 614		MX 848		MX 902		MX 614	
Nitrogen source	↑		g + ↑		↑		LB	LB + G
Carbon source	G	L	G	L	G	L		
G.S. sp. ac.	0.29	0.09	—	0.05	0.04	0.08	0.04	0.09



c

c'



a) MX929

b) MX929

d) MX943 rpoN73::Tn5/pACR34

e) MX943/pACR34

Figura 4. Autorradiogramas de hibridizaciones tipo Northern que muestran los transcritos que se sintetizan en fondo genético rpoN73::Tn5. Panel A MX848 glucosa-glutamina. Panel B MX848 lactato-amonio-glutamina. Panel C MX943 rpoN73::Tn5/pACR34 glucosa-amonio, autorradiograma de 72 hrs de exposición. Panel C' igual que C, pero con una semana de exposición.

Amonio 15 mM está representado por ↑, amonio 0.5 mM por ↓; G glucosa; L lactato; g glutamina. Las condiciones de hibridización se describen en métodos experimentales.

Agradecemos al Dr. Alejandro Garcia-Rubio el facilitarnos sus autorradiogramas para la elaboración de los paneles A y B de esta figura.

normalmente el operón se transcribe con la RNA polimerasa asociada a sigma 54, y el activador es nifA, que es homólogo a glnG, en ausencia de cualquiera de éstos la cepa presenta fenotipo Nif⁻) (75); análogamente a esta situación podríamos suponer que el transcrito "parecido a t₂" puede originarse a partir de algún promotor ubicado cerca de glnAp2, y que sólo puede ser detectado en ausencia de los reguladores del operón mismo.

La mutación glnAo91 es la primera mutación puntual que confirma que el sitio 1 de unión a NR_x es esencial para activar la transcripción de glnAp2 (ver Table 2).

Finalmente es importante hacer notar que en los ensayos de retardamiento, al utilizar la región regulatoria con los sitios de unión a NR_x que lleva glnAo91, no se detecta unión de la proteína aún cuando a la concentración utilizada debería unirse al sitio 2 (18) (fig. 3). Este resultado sólo puede ser explicado en términos de interacción cooperativa entre los sitios 1 y 2, sin embargo Ninfa y Magasanik (18) observaron que no existe cooperatividad entre el sitio 1 y 2 al unirse NR_x-P.

Recientemente (76) fue reportado que NR_x-P se une de modo cooperativo a dos sitios de baja afinidad ubicados en la región regulatoria del operón nifLA de Klebsiella pneumoniae, estos resultados indican que la proteína NR_x puede interactuar de manera cooperativa en este operón.

Nosotros consideramos que la causa de esta aparente contradicción entre los resultados de Ninfa y Magasanik (18) y

los reportados para Klebsiella pneumoniae (76), estriba en la diferencia de afinidad de NR_x por estos sitios. Si esta suposición resulta cierta, nuestros resultados podían ser explicados bajo la lógica de que en nuestro ensayo carecemos de RNA polimerasa-sigma 54 y seguramente NR_x se encuentra en estado defosforilado, estos dos factores provocan que la afinidad de NR_x por sus sitios de unión disminuya de manera considerable (18), por lo tanto NR_x tiene baja afinidad por los sitios 1 y 2 en las condiciones utilizadas en el retardamiento, y por lo tanto su unión puede ser cooperativa.

Dispuestos a tratar de probar si esta suposición era la correcta, Weiss y Magasanik presentaron en el pasado congreso de CSH (Agosto de 1990) un estudio sobre la unión de NR_x-P y NR_x a los sitios 1,2 y 3, los resultados muestran que NR_x (en estado no fosforilado) se une de manera cooperativa a los mismos siempre y cuando se localicen en el mismo lado de la hélice.

Conclusiones

- 1.- La mutación glnAo91 es un nuevo tipo de mutación supresora del fenotipo Gln⁻ ocasionado por la mutación rpoN73::Tn5.
- 2.- En esta cepa la transcripción de glnA proviene de glnAp1 y de un transcrito que comigra con t₂, cuyo origen es desconocido, y que previamente se había encontrado en la cepa MX848 (progenitora).
- 3.- La mutación glnAo91 es la primera mutación puntual descrita para los sitios de unión a NR_x presentes en la región regulatoria de glnA.
- 4.- La mutación glnAo91 disminuye la afinidad de NR_x por la región regulatoria de glnA.
- 5.- La unión de NR_x no fosforilado a los sitios 1 y 2 de la región regulatoria de glnA parece involucrar interacciones cooperativas.

Bibliografia

1. Wolheuter, R.M., Schutt, H. & Holzer, H. (1973) In The enzymes of glutamine metabolism. Academic Press, New York
2. Meers, J.L., Tempest, D.W. & Brown, C.M. (1970) J.Gen. Microbiol. 64, 187-194.
3. Deshpande, K.L. & Kane, J.F. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 93, 308-314.
4. Tyler, B. (1978) Annu. Rev. Biochem. 47, 1127-1162.
5. Brenchley, J.E., Prival, M.J. & Magasanik, B. (1973) J. Biol. Chem. 248, 6122-6128.
6. Ginsburg, A. & Stadman, E. R. (1973) In The enzymes of glutamine metabolism Avademic Press, New York.
7. Rothman, R., Rothstein, D., Foor, F. & Magasanik, B. (1982) J.Bacteriol. 150, 221-230.
8. Streicher, S.L., DeLeo, A.B. & Magasanik, B. (1976) J. Bacteriol. 127, 184-192.
9. Mayer, E.P., Smith, O.H., Fredericks, W.W. & McKinney, M.A. (1975) Mol.Gen.Genet. 137, 131-142.
10. DeLeo, A.B. & Magasanik, B. (1975) J.Bacteriol. 121, 313-319.
11. Kustu, S.G. & McKereghan, K. (1975) J.Bacteriol. 122, 1006-1016.
12. Garcia, E., Bancroft, S., Rhee, S.G. & Kustu, S. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1162-1166.
13. Magasanik, B. (1982) Ann.Rev.Genet. 16, 135-168.
14. Gaillardini, C.M. & Magasanik, B. (1979) J.Bacteriol. 133, 1329-1388.
15. Hirschman, P.K., Wong, K., Sei, K., Keener, J. & Kustu, S. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7525-7529.
16. Hunt, T. & Magasanik, B. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 8453-8457.
17. Sasse-Dwight, S. & Gralla, J.D. (1990) Cell 62, 945-954.

18. Ninfa, A., Reitzer, L.J. & Magasanik, B. (1987) Cell 50, 1039-1046.
19. Popham, D.L., Szeto, D., Kenner, J. & Kustu, S. (1989) Science 243, 629-635.
20. Gross, R., Arico, B. & Rappuoli, R. (1989) Mol.Microbiol. 3, 1661-1667.
21. Ronson, C. W., Nixon, B. T. & Ausbel, F. M. (1987) Cell 49, 579-581.
22. Bourret, R., Hess, J. F., Borkovich, K. A., Pakula, A. A. & Simon, M. I. (1989) J. Biol. Chem. 264, 7085-7088.
23. Ninfa, A. J. & Magasanik, B. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5909-5913.
24. Ueno-Nishio, S., Backman, K. C. & Magasanik, B. (1983) J. Bacteriol. 153, 1247-1251.
25. MacFarlane, S. A. & Merrick, M. J. (1987) Mol.Microbiol. 1, 133-142.
26. Foor, F., Cedergreen, R. J., Streicher, S. L., Rhee, S. G. & Magasanik, B. (1978) J.Bacteriol. 134, 562-568.
27. Bloom, F. R., Levin, M. S., Foor, F. & Tyler, B. (1978) J. Bacteriol. 134, 569-577.
28. Foor, F., Reuveny, Z. & Magasanik, B. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4844-4848.
29. Bueno, R. & Magasanik, B. (1985) J.Bacteriol. 164, 816-822.
30. Holtel, A. & Merrick, M. J. (1989) Mol.Gen.Genet. 217, 474-480.
31. Streicher, S. L., Bender, R. A. & Magasanik, B. (1975) J. Bacteriol. 121, 320-331.
32. Kustu, S., Hirschman, J., Burton, D., Jelesko, J. & Meeks, C. (1984) Mol.Gen.Genet. 197, 309-317.
33. Foor, F., Reuveny, Z. & Magasanik, B. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2636-2640.
34. Reitzer, L. J. & Magasanik, B. (1987). In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

35. DeBruijn, F. J. & Ausbel, F. M. (1981) *Mol.Gen.Genet.* 183, 289-297.
36. Espin, G., Alvarez-Morales, A. & Merrick, M. (1981) *Mol.Gen.Genet.* 184, 213-217.
37. Ausbel, F. M., Bird, S. C., Durbin, K. J., Janssen, K. A., Margolskee, R. F. & Peskin, A. P. (1979) *J.Bacteriol.* 140, 597-606.
38. Streicher, S. L., Shanmugam, K. T., Ausbel, F. M., Morandi, C. & Golderg, R. (1974) *J.Bacteriol.* 120, 815-821.
39. Tubb, R. S. (1974) *Nature* 251, 481-485.
40. Merrick, M. J. (1983) *EMBO J.* 2, 39-44.
41. Dixon, R. A. (1984) *J.Gen.Microbiol.* 130, 2745-2775.
42. Ow, D. W. & Ausbel, F. M. (1983) *Nature(London)* 301, 307-313.
43. Funange, U. L., Ayling, D., Dendiger, S. M. & Brenchley, J. E. (1978) *J.Bacteriol.* 136, 558-596.
44. Kustu, S. G., McFarland, N. C., Hui, S. P., Esmon, B. & Ames, G.-F. (1979) *J.Bacteriol.* 138, 218-234.
45. Ferro-Luzzi, A. G. & Nikado, K. (1985) *EMBO J.* 4, 539-547.
46. Higgins, C. G. & Ames, G. F.-L. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1083-1087.
47. Rothman, R., Rothstein, D., Foor, F. & Magasanik, B. (1982) *J. Bacteriol.* 150, 221-230.
48. Magasanik, B. (1978). In *The Operon*. ed. J.H.Miller. Cold Spring Harbor Laboratory, 373-387.
49. Rothman, R., Rothstein, D., Foor, F. & Magasanik, B. (1982) *J. Bacteriol* 150, 221-230.
50. Prival, M. J. & Magasanik, B. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 6288-6296.
51. Tyler, B. (1978) *Annu. Rev. Biochem.* 47, 1127-1162.
52. Vining, L. C. & Magasanik, B. (1981) *J.Bacteriol.* 146, 647-666.
53. Backman, K., Chen, Y. & Magasanik, B. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3743-3747.

54. Covarrubias, A. A., Rocha, M., Bolivar, F. & Bastarrachea, F. (1980) *Gene* 11, 239-251.
55. Covarrubias, A. A., Sanchez-Pescador, R., Osorio, A., Bolivar, F. & Bastarrachea, F. (1980) *Plasmid* 3, 150-164.
56. Chen, Y., Backman, K. & Magasanik, B. (1982) *J. Bacteriol.* 150, 214-220.
57. Espin, G., Alvarez-Morales, A., Cannon, F., Dixon, R. & Merrick, M. (1982) *Mol. Gen. Genet.* 186, 518-524.
58. Pahel, G., Rothstein, D. M. & Magasanik, B. (1982) *J. Bacteriol.* 150, 202-213.
59. Pahel, G. & Tyler, B. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4544-4548.
60. Alvarez-Morales, A., Dixon, R. & Merrick, M. (1984) *EMBO J.* 3, 501-507.
61. Ueno-Nishio, S., Mango, S., Reitzer, L. J. & Magasanik, B. (1984) *J. Bacteriol.* 160, 379-384.
62. MacFarlane, S. A. & Merrick, M. (1985) *Nucl. Acids Res.* 13, 7591-7606.
63. Osorio, A. V., Servin, G. L., Rocha, M., Covarrubias, A. A. & Bastarrachea, F. (1984) *Mol. Gen. Genet.* 194, 114-123.
64. McCarter, L., Krajewska, G., Trinh, D., Wei, G. & Kustu, S. (1984) *Mol. Gen. Genet.* 197, 150-160.
65. Dixon, R. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12, 7811-7830.
66. Reitzer, L. J. & Magasanik, B. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1979-1983.
67. Sasse-Dwight, S. & Gralla, J. D. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8934-8938.
68. Reitzer, L. J. & Magasanik, B. (1986) *Cell* 45, 785-792.
69. Muller, H.-P., Sogo, J. M. & Schaffner, W. (1989) *Cell* 58, 767-777.
70. Wendel, A., Weiss, D. S., Popham, D., Droge, P. & Kustu, S. (1990) *Science* 248, 486-490.
71. Su, W., Porter, S., Kustu, S. & Echols, H. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5504-5508.

72. Kustu, S., Burton, D., Garcia, E., McCarter, L. & McFarland, N. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 45-76.
73. Leon, P., Romero, D., Garcia-Rubio, A., Bastarrachea, F. & Covarrubias, A. (1985) J.Bacteriol. 164, 1032-1038.
74. Reitzer, L. J., Bueno, R., Cheng, W. D., Abrams, S. A., Rothstein, D. M., Hunt, T. P., Tyler, B. & Magasanik, B. (1987) J.Bacteriol 169, 4279-4284.
75. Lers, A., Bitoun, R. & Zamir, A. (1986) J. Bacteriol. 165, 175-180.
76. Minchin, S. D., Austin, S. & Dixon, R. A. (1988) Mol.Microbiol. 2, 433-442.
77. Stock, J.B., Ninfa, A.J., and Stock, A.M. (1989) Microbiol.Revs. 53, 450-490.