

03081 2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSTGRADO DEL COLEGIO
DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CARACTERIZACION DE LA REGION glnA-glnG DE Escherichia coli K12

EJEMPLAR UNICO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA
P R E S E N T A
ALEJANDRA ALICIA COVARRUBIAS ROBLES

2002

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.

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas bajo la dirección del Dr. Fernando Bastarrachea, a quien agradezco profundamente su enseñanza, paciencia y amistad. También contribuyeron a la mejor realización de este trabajo los miembros de mi Comité Tutorial, los Dres. Rafael Palacios, Edmundo Calva, y Carmen Gómez, a quienes agradezco sus buenos consejos y su ayuda durante mi formación académica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A mis padres a quienes agradezco su apoyo durante todo este tiempo, y por quienes siento una gran admiración y respeto.

A mi batallón de hermanos por su ayuda y paciencia.

A mis amigos y alumnos: Mario, Alejandro, Martha, Paty, José María, Claudia y Oscar, a quienes agradezco su estímulo y muchos buenos ratos (y resultados), y por quienes pude terminar este trabajo.

Al laboratorio FBA con quienes he tenido una incomparable colaboración y de quienes he aprendido mucha genética. A todos ellos agradezco su confianza: Irene, Aurora, Myriam, Luis, Julio César, Marcela, Laura, Silvia, Denisse, Nora, Alejandra, David, Susy y Lorenzo.

A todos mis amigos por su amistad.

A todos aquéllos que en diferentes grados me han enseñado algo de la teoría y práctica de la ciencia, y a quienes debo una buena parte de mi formación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

	Págs.
LISTA DE ABREVIATURAS	
RESUMEN	
INTRODUCCION	2.
Bioquímica de GS	8.
Fisiología de la síntesis de GS	13.
Genética del sistema <u>gln</u>	15.
La organización de los genes <u>glnA</u> , <u>glnL</u> y <u>glnG</u>	24.
OBJETIVOS	28.
EPLICACIONES	
- <u>Cole1</u> hybrid plasmids containing <u>Escherichia coli</u> genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine.	
-Cloning and physical mapping of the <u>glnA</u> gene of <u>Escherichia coli</u> K12.	
-Caracterización de la región <u>glnA-glnG</u> de <u>Escherichia coli</u> K12.	
- <u>Nucleotide</u> sequence of the <u>glnA</u> control region of <u>Escherichia coli</u> .	
- <u>cis-Dominant</u> , glutamine synthetase constitutive mutations of <u>Escherichia coli</u> independent of activation by the <u>glnG</u> and <u>glnF</u> products.	
RESULTADOS ADICIONALES	32.
DISCUSION	41.
CONCLUSIONES	72.
BIBLIOGRAFIA	73.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

LISTA DE ABREVIATURAS.

GS	Glutamina sintetasa
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GOGAT	Glutamato sintasa
DNA	Acido desoxirribonucleico
RNA	Acido ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero
RNA _t	RNA de transferencia
RNA _p	RNA polimerasa
P.M.	Pesos moleculares
Md	Megadaltones
d	Daltones
Kb	Kilobases
pb	Pares de bases
b	Bases
Tc	Tetraciclina
Ap	Ampicilina

RESUMEN.

En esta tesis se presentan los resultados obtenidos (publicaciones incluidas) en relación a la caracterización de la región glnA-glnG del cromosoma de Escherichia coli K12, la cual contiene el gene estructural para la enzima Glutamina sintetasa, así como dos de los genes reguladores de su expresión, glnL y glnG. También se presenta la secuencia nucleotídica correspondiente a la región de control de glnA, y se discute la posible existencia de más de un promotor para la transcripción de glnA. Se hace un análisis de los datos obtenidos, así como de los datos reportados en la literatura, lo cual lleva a la proposición de un modelo para la regulación de la expresión de glnA.

INTRODUCCION

Todo organismo vivo requiere para crecer de asimilar nitrógeno en macromoléculas. Los microorganismos usan una gran variedad de compuestos nitrogenados como fuentes de nitrógeno celular. Dentro de estos últimos existe una amplia gama que comprende desde compuestos inorgánicos tales como nitrógeno gaseoso, nitrato, nitritos y amonio hasta compuestos orgánicos tales como histidina, prolina y arginina. Todos estos compuestos pueden ser modificados enzimáticamente para dar amonio y glutamato.

Las vías por las cuales se metaboliza el nitrógeno se pueden dividir en dos clases: a) una vía asimilatoria, necesaria para su utilización a partir de compuestos disponibles en el medio, y b) una vía biosintética la cual da lugar a los compuestos que contienen nitrógeno. Cada organismo presenta algunos pasos característicos en cada una de estas vías; sin embargo, algo que parece ser común es que los intermediarios celulares claves en la biosíntesis de compuestos nitrogenados son glutamina, glutamato y aspartato. Los últimos dos son los compuestos iniciales de las rutas de biosíntesis de varios aminoácidos y, también funcionan como donadores del grupo amino en muchas reacciones. Glutamina es probablemente el compuesto sencillo más importante de la célula, ya que su grupo amido es utilizado como fuente de nitrógeno en la biosíntesis de varios aminoácidos, de purinas y pirimidinas, de glucosamina-6-P, de ácido para-aminobenzoico, NAD, carbamil-P, etc. (Ver Figura 1) (1).

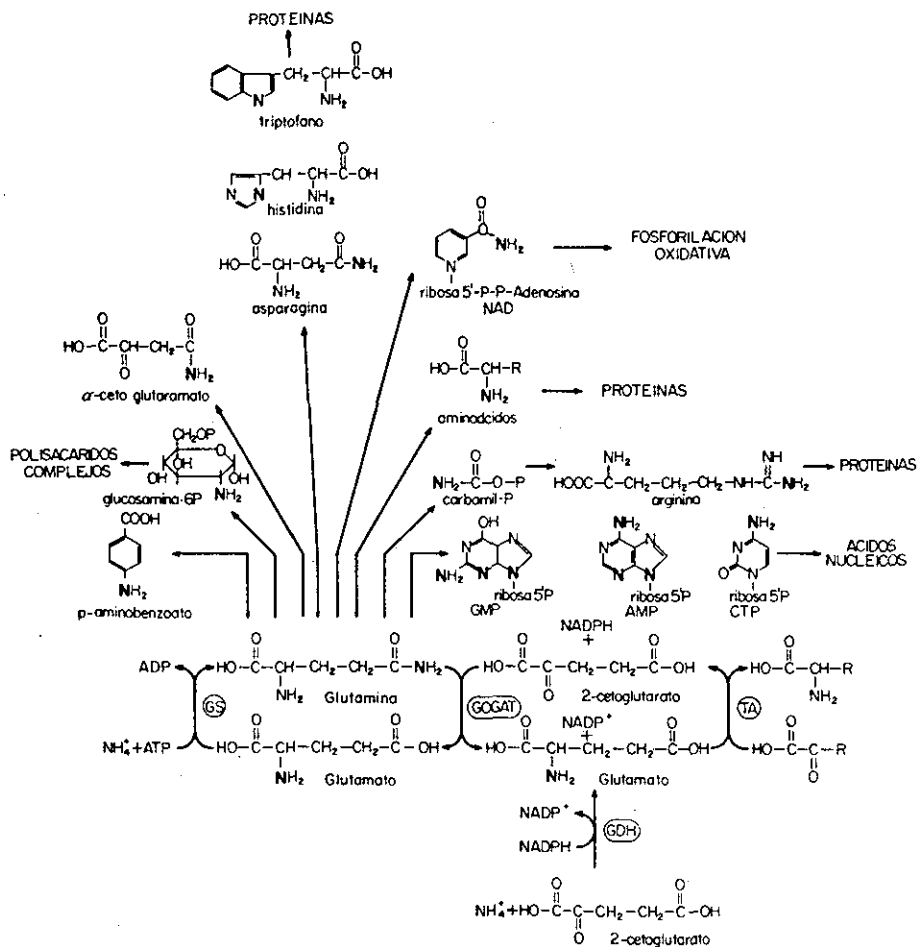


FIGURA 1

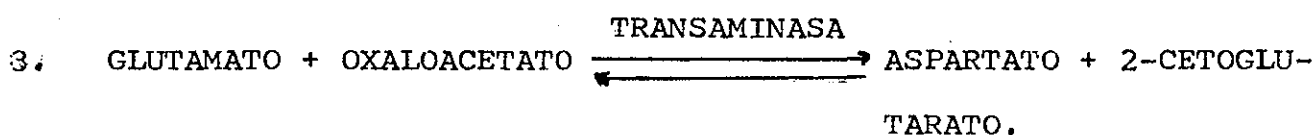
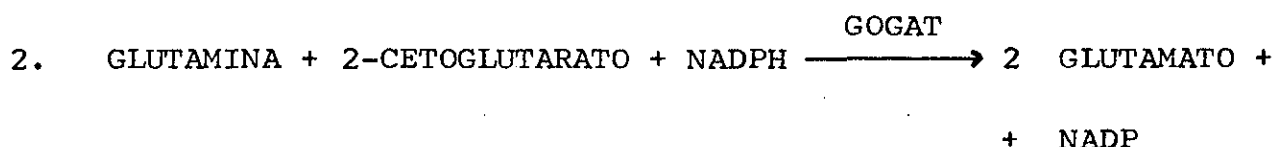
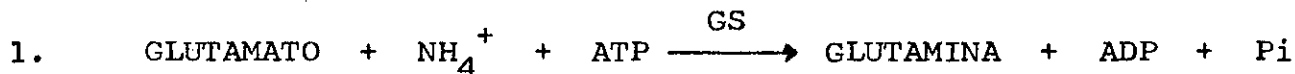
TESIS CON FALLA DE ORIGEN

FIGURA 1. Rutas de asimilación de amonio para la síntesis de glutamina y glutamato.

En esta figura se muestran las vías de síntesis de glutamina y glutamato, así como algunos de los compuestos en los que participa el nitrógeno del grupo amido de la glutamina. Los nitrógenos más oscuros son aquellos que derivan del grupo amido de la glutamina.

GS: Glutamina sintetasa, GDH: Glutamato deshidrogenasa, GOGAT: Glutamato sintasa, TA: Transaminasa.

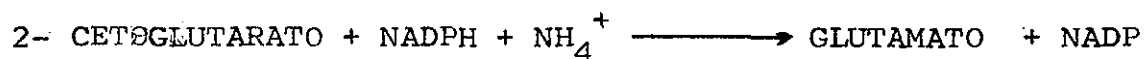
Glutamina, glutamato y aspartato son compuestos fácilmente interconvertibles a través de las siguientes reacciones:



Todas las enzimas que catalizan estas reacciones, así como la glutamato deshidrogenasa (L-glutamato: NADP⁺ oxido reductasa, EC 1.4.1.4) (GDH) (ver abajo), se encuentran en todos los microorganismos capaces de crecer en amonio como única fuente de nitrógeno.

La reacción 1 es llevada a cabo por la enzima glutamino sintetasa (L-glutamato: amonio ligasa, EC 6.3.1.2) (GS) y resulta ser la única vía de síntesis para glutamina. La utilización del amonio asimilado depende de la actividad de la glutamato sintasa (L-glutamato: NADP⁺ oxidoreductasa, EC 1.4.1.3) (GOGAT) la cual cataliza la reacción 2. Las reacciones catalizadas por estas dos enzimas, GS y GOGAT, dan como resultado la síntesis neta de glutamato a partir de 2-cetoglutarato, proporcionado por la fuente de carbono del medio, y de amonio, con un gasto simultáneo de una molécula de ATP. En condiciones de crecimiento en las cuales la concentración de amonio presente en el medio es menor que 0.1mM,

o bien, cuando el amonio deriva por vía enzimática de otras fuentes de nitrógeno, las tres reacciones antes mencionadas son las que permiten la asimilación del amonio (2,3). Es en estas condiciones cuando GS es la enzima más importante en la captación del amonio del medio y, por lo tanto, resulta de una importancia singular, ya que se encarga de acoplar los procesos catabólicos por lo que se producen amonio y 2-cetoglutarato con las vías biosintéticas que llevan a la formación de proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos complejos y algunas vitaminas (Ver Figura 1). En algunos organismos como Bacillus subtilis, las reacciones 1 y 2 constituyen la única vía para la utilización del amonio (4). Otros organismos, tales como las enterobacterias, pueden utilizar el amonio para la síntesis de glutamato a través de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH):



Esta enzima tiene un Km relativamente alto, del orden de 1mM, tanto para 2-cetoglutarato como para amonio, lo cual sugiere que para aquellas células creciendo en condiciones de limitación de nitrógeno, esta enzima resulta relativamente inefectiva; de ahí que esta reacción sea útil sólo cuando la concentración de amonio en el medio es por lo menos 0.1mM (3,5). Consecuentemente, mutantes de enterobacterias que carecen de GOGAT no crecen cuando se les proporciona amonio a una concentración baja, o bien cuando éste se debe generar a partir de otra fuente de nitrógeno (6).

La interconversión entre glutamato y aspartato es llevada a cabo por varias aminotransferasas (reacción 3), de ahí que un defecto genético que solamente afecte a una aminotransferasa no resulta en requerimiento por aspartato (7).

En enterobacterias, la importancia de la función de GS se refleja en la manera en cómo responden, tanto los niveles de ésta enzima como su actividad, a la fuente de nitrógeno en el medio de crecimiento. Aquellas células que crecen en un medio donde el crecimiento está siendo limitado por la calidad de la fuente de carbono, y que contiene amonio y glutamina, no requieren de GS. En estas células la concentración de ésta enzima puede ser extremadamente baja y se encuentra en una forma alterada incapaz de sintetizar glutamina, por otro lado el cultivo de las células en una fuente limitante de nitrógeno con una buena fuente de carbono resulta en un aumento de aproximadamente 100 veces en la concentración de GS y toda la enzima se encuentra en la forma capaz de sintetizar glutamina (8).

Las enzimas que se requieren para la conversión de una fuente potencial de nitrógeno a amonio sólo pueden llevar a cabo su función cuando hay suficiente GS activa disponible para asimilar el amonio que éstas proporcionan. Esto hace pensar en que la célula posea un mecanismo que regule la síntesis de GS y de las enzimas que proporcionan amonio, de tal manera que éstas últimas sólo se produzcan cuando en las células exista suficiente GS. De hecho, este tipo de control se encuentra en enterobacterias (5).

Durante la introducción de ésta tesis me limitaré a tratar

el sistema de regulación de GS, así como su relación con la síntesis de las enzimas encargadas de proporcionar amonio en enterobacterias.

BIOQUIMICA DE GS

Como se indicó anteriormente, GS cataliza la producción de glutamina, dependiente de ATP, a partir de amonio y glutamato. La enzima tiene un peso molecular de 600 000 d y contiene doce subunidades idénticas, las cuales se arreglan en dos unidades hexagonales. Se ha observado que los cationes divalentes Mg^{++} o Mn^{++} se requieren para estabilizarla (9). Estudios de Stadman y Ginsburg, y Holzer et al. (1,10) demuestran que la actividad catalítica de GS se regula por tres mecanismos (i) la interconversión de una forma relajada (inactiva) y una forma taut (activa) en respuesta a la variación en la concentración de cationes divalentes; ii) inhibición por retroalimentación ejercida por varios productos finales del metabolismo de glutamina y iii) alteración covalente de la enzima por la adenilación reversible de un residuo tirosilo en cada subunidad la cual es catalizada por la enzima adenil-transferasa (Atasa). La máxima actividad biosintética se obtiene cuando se encuentra completamente desadenilada (E_0) y disminuye conforme el grado de adenilación aumenta. Sin embargo, la enzima completamente adenilada (E_{12}) que es biosintéticamente inactiva, aún es capaz de transferir el residuo glutamil de la glutamina a hidroxilamina en presencia de ADP y Mn^{2+} (actividad de transferasa). A un

cierto valor de pH, característico de cada GS, tanto la enzima adenilada como la no adenilada tienen la misma actividad de transferasa y cuando ésta se mide en presencia de Mg^{2+} , sólo es activa enzima no adenilada. De ésta manera es posible determinar tanto la actividad total de la enzima como la fracción correspondiente a la enzima no adenilada en células crecidas en dıferentes condiciones (1,9). Este mecanismo de modificación covalente de GS parece haber evolucionado como un sistema de cascada bicíclico, muy complejo. El ciclo superior involucra la interconversión de la proteína regulatoria P_{11} , por medio de un mecanismo cíclico de uridilacion y desuridilacion de un residuo tirosilo, específico en la proteína P_{11} . El ciclo inferior involucra la adenilación y desadenilación por la acción de la Atasa, de cada subunidad de GS. El que estos dos ciclos estén acoplados deriva del hecho de que $P_{11}UMP$ estimula a la Atasa para que lleve a cabo la reacción de desadenilación; en tanto que P_{11} estimula la reacción inversa (11, 12) (Figura 2).

Los pasos de modificación en ambos ciclos también se encuentran regulados por un gran número de metabolitos, de los cuales la glutamina y el 2-cetoglutarato muestran efectos muy notables. En el ciclo de adenilación, L-glutamina estimula la reacción de adenilación e inhibe la de desadenilación, en tanto que 2-cetoglutarato ejerce un efecto opuesto sobre estas mismas reacciones (1,9).

Análisis teóricos de sistemas modelo sugieren que los sistemas de cascada cíclicos poseen propiedades regulatorias extraordinarias, de tal manera que la concentración de numerosos metaboli-

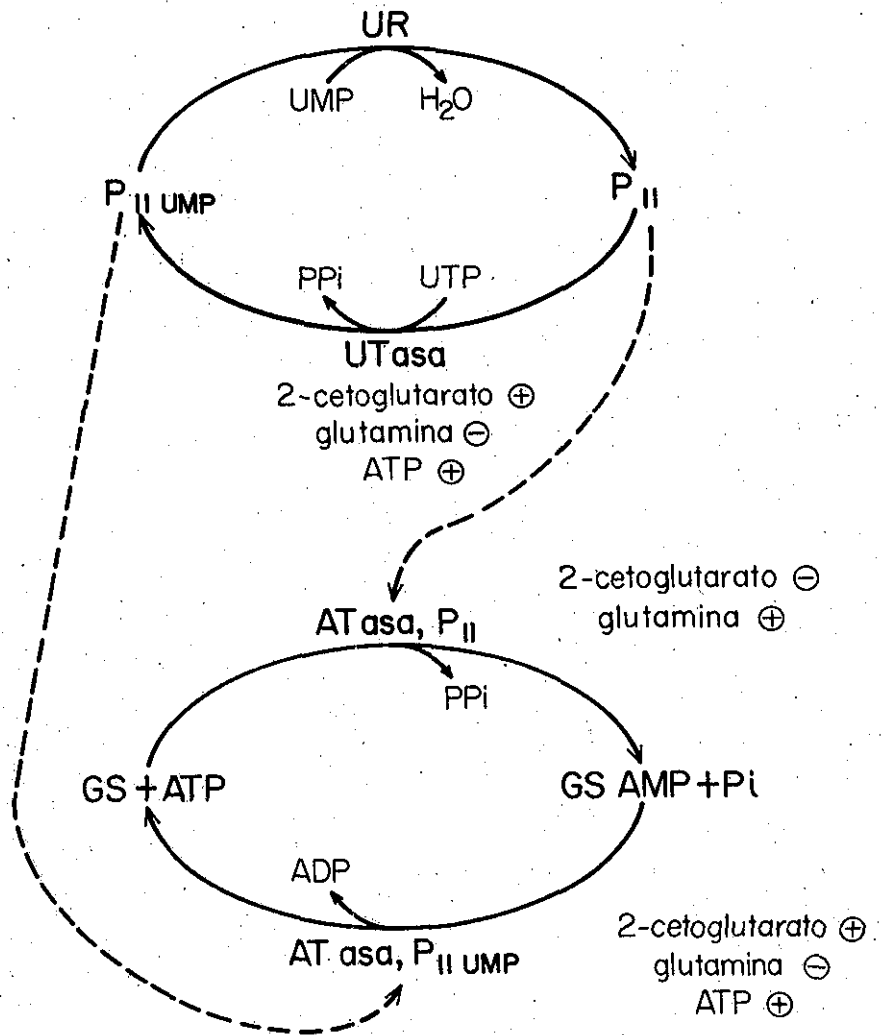


FIGURA 2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 2. Sistema de adenilación-desadenilación para Glutamina sintetasa.

El sistema de adenilación y desadenilación de GS está representado aquí como un modelo de cascada, el cual consiste de dos ciclos enzimáticos interconvertibles, muy ligados entre sí. En un ciclo, la GS es continuamente adenilada y desadenilada. En el otro, la proteína P_{II} es continuamente uridilada y desuridilada. La cascada de GS es altamente flexible con respecto a la regulación por un gran número de metabolitos; es capaz de dar una enorme señal de amplificación; es capaz de gobernar la amplitud de la respuesta a un efector alostérico dado; puede generar una respuesta de tipo cooperativo al aumento en la concentración de efectores alostéricos (11). + indica estimulación y - indica inhibición.

tos es monitoreada continuamente a través de interacciones alostéricas y de sustratos con varias de las enzimas en la cascada; para el caso específico de GS, es posible ajustar automáticamente su actividad específica para aliviar los requerimientos de la célula por glutamina (10,11,12).

Por lo que se refiere al control por cationes divalentes, a la fecha no ha sido posible atribuirle un significado fisiológico, ya que se carece de información sobre las concentraciones intracelulares de los diferentes cationes divalentes bajo diversas condiciones metabólicas y nutricionales.

Otro de los mecanismos reguladores de la actividad de GS que ha sido mencionado y que vale la pena comentar es el que se refiere a inhibición por retroalimentación. Woolfolk y Stadman (13a, 13b), después de probar algo más de 50 compuestos, encontraron que la GS se inhibía por CTP, AMP, glucosamina-6-P, histidina, triptofano, carbamil-P, alanina, glicina y serina. Resulta significativo que el nitrógeno del grupo amida de la glutamina se utiliza directamente en la biosíntesis de todos estos inhibidores, excepto de alanina, glicina y serina los cuales derivan indirectamente de glutamina vía reacciones catalizadas por GS, GOGAT y transaminasas. Por lo tanto la inhibición de GS por estos metabolitos constituye un sistema de regulación por retroalimentación en el cual cada producto final de una vía metabólica muy ramificada inhibe la primera enzima común en la ruta. Aún cuando glutamato también es un producto final del metabolismo de glutamina no es un inhibidor por retroalimentación. Esto parece razonable, ya que glutamato

también es sustrato para la síntesis de glutamina. Es posible que la función de alanina y glicina sea el sentir las fluctuaciones en la poza de glutamato y, dependiendo de ésta, inhibir la GS; ya que estos aminoácidos se encuentran en un equilibrio dinámico con el glutamato por las reacciones de transaminación. Resulta interesante hacer notar que la enzima adenilada sólo es sensible a triptofano, histidina, AMP o CTP. En experimentos llevados a cabo in vitro se requieren de concentraciones relativamente altas (1-100mM) de la mayoría de estos inhibidores para producir un 50% de inhibición de la actividad enzimática; por lo tanto, aún bajo condiciones fisiológicamente extremas, cada inhibidor sólo causará una inhibición parcial de la actividad de GS. Parece ser que estos inhibidores actúan independientemente uno del otro, ya que la actividad fraccional que se obtiene con cualquier combinación de dos o más inhibidores disminuye dependiendo del número de inhibidores presentes. Así pues, se puede decir que el efecto de los inhibidores es "acumulativo", por lo tanto, cuando varios metabolitos se encuentran presentes en exceso se produce una inhibición casi completa de la actividad de GS (1).

FISIOLOGIA DE LA SINTESIS DE GS

En enterobacterias la disponibilidad de nitrógeno en el medio de crecimiento regula no sólo la actividad de GS, sino también su concentración intracelular (ver Tabla 1). El nivel absoluto de esta proteína varía de manera inversa a la disponibilidad de nitrógeno de tal manera que la concentración más alta de GS se encuen-

tra cuando las células son cultivadas en ausencia de amonio, o bien con una fuente limitante de nitrógeno como serían histidina o glutamina (Glutamina se considera una fuente limitante de nitrógeno, ya que contrariamente a lo esperado, la GS se encuentra inducida. Se ha propuesto que éste se debe a que la glutamina no se transporta eficientemente dentro de la célula; sin embargo, se conocen pocos datos al respecto). En este caso los niveles de la enzima son cinco a diez veces mayores que los encontrados en condiciones en que las células son cultivadas en un medio con exceso de amonio (aproximadamente, 1% del total de la proteína soluble). Sin embargo, la concentración característica de GS en estos medios deficientes de nitrógeno no refleja su máxima velocidad diferencial de síntesis. Se ha encontrado que durante el cambio de un medio que contiene glutamina y amonio y una fuente pobre de carbono (ej.: histidina) a un medio que contiene glucosa y una fuente pobre de nitrógeno la velocidad diferencial inicial de síntesis de GS fue de, aproximadamente, cuatro o cinco veces más alta que la velocidad característica del estado de equilibrio en un medio deficiente de nitrógeno, la cual se mantiene una vez que se ha alcanzado la concentración apropiada de GS (3,5). Como ya se ha mencionado también el grado de adenilación de la enzima disminuye cuando las células se cultivan en un medio deficiente en amonio. Como resultado, la diferencia de actividad formadora de glutamina entre limitación y exceso de amonio es de varios cientos de veces (Ver Tabla 1)

Se ha sugerido que los bajos niveles de síntesis de GS encontrados en células crecidas en medios ricos (14, 15), en medio mí-

nimo con algunas otras fuentes de carbono (8) no resultan solamente de la represión por amonio, sino que más bien reflejan la proporción entre glutamina y 2-cetoglutarato (8). Existen algunos datos reportados por Senior (17) que sugieren que el estado de adenilación de GS en E. coli W refleja la proporción intracelular de 2-cetoglutarato y glutamina, como había sido predicho por el trabajo de Stadman y colaboradores (1,3,18). Sin embargo, cabe hacer notar que los datos de Senior (17) muestran variaciones significativas en los niveles intracelulares de GS bajo condiciones donde no se observan cambios en el estado de adenilación de la enzima. Así pues, es posible que otros factores diferentes a la disponibilidad de amonio tales como la fuente de carbono, se encuentren involucrados en la represión y de derrepresión de GS (1). En condiciones de cultivo continuo, los niveles de GS varían de manera compleja en función tanto de la disponibilidad de carbono como de nitrógeno. Significativamente, bajo condiciones de limitación de carbono, la síntesis de GS no se encuentra totalmente reprimida aún en presencia de concentraciones moderadamente altas de amonio (1).

GENETICA DEL SISTEMA *gln*

glnA. Este gene corresponde al gene estructural para GS. Existen tres tipos de mutaciones que se han localizado muy ligadas a *glnA*. La primera *glase* (*glnA*⁻) da lugar a un fenotipo *Gln*⁻ y a la ausencia aparente del polipéptido correspondiente a GS (3,16,19,20,

21,22,23). La segunda clase de mutaciones resulta en la síntesis de altos niveles de GS, enzimáticamente activa (fenotipo GlnC) bajo todas las condiciones de crecimiento (3,24,25). Una tercera clase de mutaciones (fenotipo Gln (AC)⁻) permiten la producción de altos niveles de GS enzimáticamente inactiva, en un medio conteniendo glucosa y exceso de amonio. Esta proteína inactiva puede ser detectada inmunológicamente, o en geles de poliacrilamida. Estos resultados parecían indicar que se requería de una GS funcional para reprimir la expresión de glnA en respuesta a las concentraciones de amonio. Cabe mencionar aquí que estas mutantes Gln⁻ presentan el fenotipo NtrE, lo cual significa que la regulación general del nitrógeno se encuentra alterada (Ver glnG, glnF y glnL), de tal manera que existe una síntesis constitutiva tanto de aquellas enzimas encargadas de degradar aminoácidos que pueden ser usados como fuentes alternas de nitrógeno, como de aquellas proteínas involucradas en los sistemas de transporte para algunos aminoácidos (3,5,19).

Otras mutantes Gln⁻ de E. coli y K. aerogenes, incluyendo aquellas que resultan de la inserción en glnA del transposón Tn5 o del fago Mu, presentan el fenotipo Ntr⁻, es decir, que son incapaces de elevar la concentración de enzimas involucradas en la degradación de otras fuentes de nitrógeno (26,27,28,29,30). El gene glnA ha sido localizado en el minuto 86 del cromosoma de E. coli, y en una posición correspondiente en los cromosomas de K. aerogenes, K. pneumoniae y de S. typhimurium. En todos estos casos glnA se encuentra ligado por transducción al locus rha. En E. coli el or-

den de los genes en esta área del cromosoma es rbs-ilv-fad-polA-glnA -rha-pfk-tpi-metB-argH (5).

glnF. En S. typhimurium se descubrió una mutación la cual no se encontraba ligada a glnA y que resultaba en un requerimiento por glutamina. Esta mutación fue localizada en una posición que corresponde al minuto 68 en el mapa de E. coli y se encontró ligada un 15%, por transducción mediada por el fago P22, a un gene que en E. coli corresponde a argG (31). Posteriormente, mutaciones similares fueron descritas en E. coli y en K. aerogenes; estas mutaciones se encontraban ligadas en un 25% y 50%, respectivamente, a argG por transducción mediada por el fago P1. En el caso de K. aerogenes el orden de los genes en esa región del cromosoma parece ser glnF-argG-gltB, con solamente un 2% de cotransducción entre glnF y gltB (32). En cambio en E. coli glnF y gltB se encuentran muy ligados entre sí (33). Por lo que respecta a S. typhimurium el orden de los genes es argG-glnF-gltB, encontrándose un 7% de ligamiento entre glnF y gltB (34).

Todas las mutaciones en glnF que se han examinado hasta ahora, ya sea mutaciones espontáneas o inducidas por el mutágeno ICR (produce cambio de fase) (31,35), o bien por inserción del transposón Tn10 (20), han dado lugar a la incapacidad de producir una concentración de GS más alta que la encontrada en células del tipo silvestre crecidas en una fuente pobre de carbono y con un exceso de glutamina y amonio, condición que resulta en la represión más fuerte de GS (fenotipo Gln^-). Aparentemente esta concentración de GS no es suficiente para permitir crecimiento en un medio que carezca de

glutamina.

Otra de las consecuencias de mutaciones en glnF es la incapacidad de aumentar la concentración intracelular de histidasa o de enzimas similares, y de algunas permeasas para aminoácidos, en respuesta a la deprivación de amonio (fenotipo Ntr^-) (35).

Ninguna de las mutaciones en glnF parece afectar la capacidad de la célula para regular la actividad de GS por adenilación y desadenilación (31,35). Así pues, se piensa que el producto de glnF se requiere para la activación de glnA, y para la activación de la expresión de los genes para las enzimas Ntr en respuesta a la limitación de nitrógeno en el medio.

glnG. Mutaciones en este gene tienen la característica de suprimir el fenotipo Gln^- que resulta de mutaciones en glnF. Fue de esta manera como el gene glnG fue identificado tanto en S. typhimurium (36) como en E. coli (26). Estas mutaciones dan lugar, en presencia o ausencia de un gene glnF funcional, a una concentración intermedia de GS, independientemente de la composición del medio (fenotipo GlnR), y al fenotipo Ntr^- (Ver Tabla 1).

Los fenotipos GlnR , Ntr^- pueden resultar de mutaciones espontáneas, o bien de mutaciones debidas a la inserción del fago Mu o de los transposones Tn10 ó Tn5 (26,28,35,36). También se han descrito mutaciones en glnG que resultan en un fenotipo Gln^- y, las cuales se distinguen de mutaciones en glnA por el hecho de que casi todas las revertantes espontáneas de estas mutantes, seleccionadas por su capacidad para crecer en ausencia de glutamina, presentan los fenotipos GlnR y Ntr^- (37,38).

El hecho de que la falta de un producto funcional de glnG resulta en una concentración de GS baja-intermedia, esencialmente no regulada, sugiere que el producto de glnG funciona como un activador de la expresión de glnA. También se ha observado que mutaciones en glnG pueden dar lugar a una concentración de GS más baja que la que se encuentra en mutantes que carecen completamente del producto de glnG, ésto aunado con el hecho de que los valores de las actividades de GS, observadas en una doble mutante glnF⁻-glnG⁻, son mayores comparadas con aquéllos correspondientes a una mutación sencilla glnF⁻, sugieren que el producto de glnG también puede actuar como represor de la expresión de glnA (36).

glnD. Otro gene cuyas mutaciones dan lugar a un fenotipo Gln⁻ ha sido localizado en el minuto 4 del cromosoma de E. coli (39,40, 41). Estas mutaciones tienen como consecuencia la incapacidad de producir una enzima UTasa funcional, que se requiere para la conversión de P_{II} a P_{IIUMP} y, por lo tanto, la GS en estas mutaciones tiende a estar altamente adenilada. Estas mutantes tampoco son capaces de convertir P_{IIUMP} en P_{II} . Este dato, junto con otros, sugiere que ambas actividades (UTasa y UR) están asociadas con la misma proteína (40,41). Mutaciones en glnD también resultan en el fenotipo Ntr⁻.

Es importante hacer notar que la concentración de GS en estas mutantes, particularmente aquéllas descritas en E. coli, es muy baja (40), lo cual hace pensar que la incapacidad de estas células para crecer en ausencia de glutamina no sólo se debe a la alta adenilación de GS por la falta de UTasa.

glnB. El gene glnB se localiza en una posición que corresponde al minuto 55 en el cromosoma de E. coli. Las primeras mutaciones en glnB, que fueron aisladas en K. aerogenes (27), y subsecuentemente en S. typhimurium y en K. pneumoniae (42,43), presentan un fenotipo muy similar al de mutaciones en glnD, ésto es, $\text{Gln}^- \text{Ntr}^-$, y presentan una GS altamente adenilada. El fenotipo Gln^- de mutaciones en glnB puede ser suprimido por mutaciones muy ligadas a las primeras, algunas de las cuales resultan de la inserción del transposón $\text{Tn}\Sigma$ (44). Por otro lado, recientemente, se ha demostrado que el fenotipo Gln^- de mutaciones en glnD puede ser suprimido por una inserción del fago Mud1 en el gene glnB (3).

El análisis de diferentes mutaciones en glnB ha llevado a la conclusión de que este gene corresponde al gene estructural para la proteína P_{II} , que como ya se ha mencionado, es un componente del sistema de adenilación de GS (44,45). El hecho de que en estas mutantes, la GS se encuentre sólo en su forma adenilada, se debe, aparentemente, a la estimulación del proceso de adenilación por P_{II} no modificada.

El fenotipo $\text{Gln}^- \text{Ntr}^-$ de mutantes en glnB y en glnD (incapaces de convertir P_{II} a P_{IIUMP}) sugiere que P_{II} antagoniza la síntesis de GS, así como la activación de la síntesis de enzimas bajo control nitrogenado tales como histidasa (27). Esta hipótesis se ve apoyada por la existencia de mutaciones en glnB, incapaces de producir P_{II} , que presentan altas concentraciones de GS aún en células crecidas en una fuente pobre de carbono y con amonio y glutamina como fuentes de nitrógeno (fenotipo GlnC). Sin embargo, en

estas mutantes la regulación de las enzimas sometidas al control nitrogenado, esencialmente, es normal (Ntr^+) (44).

El efecto de P_{II} sobre la síntesis de GS parece ser distinto de su función en los sistemas de adenilación, como lo demuestra el hecho de que mutaciones que dan lugar a la pérdida de ATasa no provocan un aumento en la concentración de GS en mutantes en glnB con una P_{II} alterada (46). Por otro lado, se ha reportado que la regulación de la síntesis de GS no se ve afectada por mutaciones en el gene glnE, incapaces de producir ATasa (39,46). Por lo que se puede inferir que el efecto de P_{II} sobre la adenilación de GS se ejerce a través de la ATasa, en tanto, su efecto sobre la expresión de glnA es independiente de la ATasa.

glnL. Otro gene que se encuentra muy ligado a glnA, además de glnG, es el llamado glnL. Mutaciones en éste último son capaces de suprimir el fenotipo Gln^- de mutantes glnD⁻ ó glnB⁻. Las mutantes glnL⁻ presentan los fenotipos GlnC y NtrC (21,27,41). Sin embargo, se han descrito algunas mutantes con deleciones de glnL en las cuales la regulación de GS es casi normal. Estas presentan bajas concentraciones de GS cuando se cultivan con un exceso de amonio y glutamina, y una alta concentración de GS cuando se cultivan en glucosa con glutamina como fuente de nitrógeno. También presentan más GS que una cepa silvestre cuando se crecen en un medio conteniendo glucosa con amonio y glutamina (fenotipo Gln^+/C). Por otro lado, la regulación de las enzimas bajo control nitrogenado en estas mutantes parece encontrarse normal (Ntr^+). Inserciones en glnL, así como algunas mutaciones puntuales dan lu-

TABLA 1

Características de mutaciones en los genes del sistema gln

Genotipo	Fenotipo	Medio de crecimiento ^a	Actividad enzimática en nmolas de producto/min/mg de proteína.	
			GS ^b	Histidasa ^d
silvestre	Gln ⁺ Ntr ⁺	GH	1400 (1)	260
		GGln	1500 (2)	350
		GN	360 (7)	100
		GNGln	150 (6)	80
		HNGln	20(12)	--
<u>glnL</u> ⁻ <u>glnB</u> ⁻	GlnC NtrC	GGln	1600(11)	380
		GNGln	1500(11)	290
		HNGln	1100(12)	--
<u>glnG</u> ⁻ <u>glnL</u> ⁻	GlnR Ntr ⁻	GGln	250 (1)	120
		GN	150 (1)	--
<u>glnL</u> ⁻	GlnR Ntr ⁻	GNGln	100 (9)	--
		HNGln	80(10)	--
<u>glnA</u>	Gln ⁻ NtrC	GGln	ND ^c	370
		GNGln	ND	320
<u>glnA</u> ⁻ <u>glnG</u> ⁻ <u>glnF</u> ⁻ <u>glnB3</u>	Gln ⁻ Ntr ⁻	GGln	ND	40
		GNGln	ND	40
(glnL)	Gln ⁺ /NC Ntr ⁺	GGln	1000	--
		GNGln	300	--
		HNGln	55	--

(a) GH: Glucosa + Histidina; GGln: Glucosa + Glutamina; GN: Glucosa + NH₄⁺
GNGln: Glucosa + NH₄⁺ + Glutamina; HNGln: Histidina + NH₄⁺ + Glutamina.

(b) La actividad enzimática de GS está dada en nmolas de γ -glutamihidroxamato/min/mg de proteína (actividad de transferasa). Los números entre paréntesis representan el estado de adenilación de la enzima, desde (0) (no adenilada) hasta 12 (totalmente adenilada).

(c) ND: Actividad no detectable.

(d) La actividad enzimática de la histidasa está dada por nmolas de producto /min/mg de proteína. (---): en estos casos la actividad no fue determinada.

TABLA 2

Productos y localización de los genes del sistema gln.

GENE	LOCALIZACIÓN EN EL CROMOSOMA ^a	PRODUCTO
<u>glnA</u>	86	GS
<u>glnL</u>	86	pL
<u>glnG</u>	86	pG
<u>glnF</u>	68	pF
<u>glnB</u>	55	P ₁₁
<u>glnD</u>	4	UTasa
<u>glnE</u>	?	ATasa

- (a) La localización de cada gene está dada en minutos con respecto al cromosoma de Escherichia coli K12.
- (b) GS; Glutamina sintetasa; pL: producto de glnL; pG: producto de glnG; pF: producto de glnF; P₁₁: proteína P₁₁; UTasa: Uridiltransferasa; ATasa: Adeniltransferasa.

gar a un fenotipo GlnR Ntr⁻ (47).

Un resumen de las características de las mutaciones en los genes gln se muestra en la Tabla 1. Aún cuando no se conoce la función detallada de cada uno de los genes reguladores para glnA y Ntr en la discusión correspondiente a esta tesis se tratará de dar explicación a algunas de las diferentes mutantes que se han aislado en estos genes.

LA ORGANIZACION DE LOS GENES glnA, glnL y glnG.

La clonación de la región glnA del cromosoma de E. coli y su análisis con endonucleasas de restricción (23,43,49), así como los estudios de complementación de mutaciones en la misma región del cromosoma 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 una región de aproximadamente 4 500 pb.

El análisis de los polipéptidos codificados en los plásmidos híbridos utilizando el sistema de minicélulas (48,49,50), ha permitido identificar los productos de los genes glnL y glnG y tener una idea aproximada de sus pesos moleculares, los cuales son de 36,000 y 50,000, respectivamente.

También ha sido posible determinar la orientación de estos genes en el cromosoma de E. coli; lo que indica que estos genes se transcriben en el sentido contrario de las manecillas del reloj a partir de glnA y hacia glnG (29,49,51). Esto sugería que los tres

genes podrían formar parte de un operón. Sin embargo, el hecho de que la regulación de la síntesis de GS fuera normal en cepas merodiploides con inserciones en glnA y en glnG, éstas últimas en posición trans, no parecía apoyar la hipótesis de un operón sencillo (26,28,36).

Por otro lado, también existían las observaciones de que, primero, inserciones en glnA o en glnG producen un fenotipo Ntr^- , y segundo, que cepas con inserciones en glnA y glnG localizadas en posición trans, son incapaces de activar el operón hut en respuesta a la limitación de amonio (26). Esto hacía pensar que estos tres genes podrían seguir formando parte de un operón, siempre y cuando se considerara la existencia de por lo menos un segundo promotor, el cual podría estar localizado entre glnA y glnG. Por lo tanto, se tenía que asumir que el gene glnG (que se requiere para la regulación de la expresión de glnA) se puede transcribir a partir de cualquiera de dos promotores, pero que la concentración necesaria del producto de glnG para activar el operón hut sólo se obtenía cuando este gene se transcribía a partir del promotor de glnA (52).

Esta hipótesis se ve apoyada por estudios de la expresión de glnG en E. coli, donde este gene se fusionó al gene lacZ que carece de promotor, de tal manera que la actividad de β -galactosidasa, medida en diferentes condiciones y en diferentes mutantes, refleja la regulación a la cual se encuentra sometido glnG. Los resultados de tal estudio confirmaron que el producto de glnG funciona tanto como activador 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 (51). A partir de este mismo tipo de estudios se han reportado datos que sugieren la presencia de un segundo promotor (47) y éstos se ven apoyados por resultados que se presentan en este trabajo. Las actividades de β -galactosidasa, provenientes de las fusiones de glnG con lacZ, obtenidos en diversas condiciones de disponibilidad de nitrógeno, sugieren que la transcripción iniciada a partir del segundo promotor está sujeta a represión por el producto de glnG en condiciones en que este producto se encuentra en el estado que se requiere para la activación de glnA (51). Así pues, se sugiere que el producto de glnG está presente en, relativamente, altas concentraciones en células crecidas en un medio limitado de nitrógeno y, en este caso la transcripción se inicia en el promotor de glnA; por otro lado, en células crecidas en un medio con una fuente pobre de nitrógeno y un exceso de glutamina y amonio, este producto se encuentra en concentraciones bajas y su transcripción se inicia a partir del segundo promotor. Esta baja concentración del producto de glnG parece, sin embargo, suficiente para reprimir completamente en el promotor de glnA y, en su forma activa, también resulta suficiente para activar la transcripción a partir del mismo promotor; sin embargo, parece ser insuficiente para activar la expresión de hut.

La hipótesis de que glnA, glnL y glnG forman parte de un operón complejo también ha sido sugerida por Gutterman et al. (58), quienes encuentran que el fenotipo Ntr^- provocado por mu -

taciones puntuales en glnA puede ser suprimido por mutaciones en el gene que codifica para el factor de terminación rho.

Todos los resultados que llevaron a la conclusión de que los genes glnA, glnL y glnG forman parte de un operón complejo han descartado completamente que GS tenga alguna función importante tanto en la regulación de su propio gene (glnA) como de los genes bajo control nitrogenado, como se había sido erróneamente propuesto por Magasanik y colaboradores (5,8,19,27,53).

OBJETIVO

Cómo se pudo haber notado durante la sección anterior, los mecanismos que regulan tanto la expresión del gene estructural para GS (glnA) como la de aquellos otros genes involucrados en la utilización de nitrógeno en enterobacterias constituyen un sistema complejo que ha merecido la atención de diversos grupos de investigación.

Cuando iniciamos el trabajo con este sistema en E. coli K-12 existían resultados contradictorios al modelo de regulación autógena por GS inicialmente propuesto por Magasanik, por lo tanto, la clonación de la región glnA del cromosoma de E. coli, en conjunción con experimentos de genética y fisiología, resultaba ser una estrategia que ayudaría a la solución de algunas de las preguntas que entonces se planteaban en el círculo de los grupos de investigación involucrados en este problema. Por otro lado, el uso de las técnicas de recombinación in vitro de ácidos nucleicos resultaba ser de gran utilidad, ya que permitiría el establecimiento de sistemas experimentales, tanto in vivo como in vitro, como por ejemplo, al sistema acoplado de transcripción-traducción, estudios de complementación de diversas mutantes con plásmidos conteniendo los diferentes genes.

En ese momento resultaba importante para nosotros como para los otros grupos de investigación involucrados, el conocer, por ejemplo, si existía algún (os) otro (s) gene (es) en la región de

glnA que estuviera involucrado en la regulación de la síntesis de GS, ya que la evidencia genética obtenida, principalmente por el grupo de S. Kustu, indicaba que éste pudiera ser el caso. Esto tenía una cierta relevancia puesto que, por un lado, descartaría completamente la participación única de GS como regulador y, por otro, daría un mayor grado de complejidad a este sistema por la participación de más de una molécula reguladora en los mecanismos de control del metabolismo nitrogenado. La pregunta obvia ante la existencia de uno o más genes reguladores se refería a cual sería su papel en el control de la expresión de glnA y si su función también repercutiría sobre la expresión de otros genes cuyos productos participan en la asimilación del nitrógeno. También se tenían preguntas referentes a la estructura de la región de DNA que constituye la región de control de glnA, ya que su caracterización fina permitiría la identificación de aquellas zonas importantes en la regulación de la síntesis de GS a través de llevar a cabo experimentos de mutagénesis localizada, lo cual a su vez permitiría dar significado fisiológico a las regiones identificadas. Por otro lado también resulta interesante conocer la estructura correspondiente al gene estructural, ya que nos daría información sobre las estructuras primaria y terciaria de GS. Otro punto interesante se refería a la caracterización de las regiones de DNA adyacentes a glnA, desde el punto de vista de si existía alguna relación estructural o funcional, como podría ser el hecho de que genes aledaños formaran parte de un operón junto con glnA.

En seguida hago una breve descripción cronológica de los he-

chos con el fin de que se tenga una idea de cómo fueron surgiendo los experimentos y los resultados.

Se llevó a cabo el aislamiento de esta región a partir de un banco de genes proveniente del genoma de E. coli (como se describe en la sección de resultados), se realizó la caracterización física de la misma utilizando enzimas de restricción y se identificaron algunas algunas de las proteínas codificadas en ella. Experimentos de complementación en diferentes mutantes en los genes relacionados (glnA⁻, glnG⁻, glnL⁻), con plásmidos recombinantes conteniendo diferentes fragmentos de la región, confirmaron la existencia de glnG muy ligado a glnA, y permitieron establecer su localización de manera fina con respecto a glnA. Posteriormente, se localizó el gene glnL y, la identificación de su producto in vivo en un sistema de minicélulas no fue posible sino hasta que se obtuvo una mayor expresión del mismo. En algunos casos la pauta para la identificación de los genes estuvo dada por experimentos genéticos previos obtenidos en nuestro laboratorio o en otros.

Como se describe en la introducción la caracterización de mutantes en los diferentes genes gln así como la clonación de algunos de ellos introdujo nuevas ideas sobre la regulación tanto de la síntesis de GS, como de la asimilación del nitrógeno celular. Tales conceptos nuevos involucraban por un lado, el hecho de que glnA, glnL y glnG constituyeran una misma unidad transcripcional en ciertas condiciones; y por el otro la existencia de más de un gene regulador de la síntesis de GS y de los genes incluidos en el sistema Ntr (oRReg); ésto es, glnF y glnG, que parecen estar

involucrados en el mecanismo de activación, glnL, que junto con glnG intervienen en el mecanismo de represión, y glnB, al que se le atribuye una función de "interferencia" con el mecanismo de activación. Estas características hacen de este sistema un sistema singular dada su complejidad. Así pues resulta interesante cómo glnA siendo el gene para una enzima biosintética se regula de manera tan compleja y diferente a cualquier otro gene relacionado con la biosíntesis de aminoácidos. Por lo tanto, se pensó que la caracterización de la región de control de glnA así como las correspondientes a los otros genes de esta región ayudaría a mejorar nuestro entendimiento sobre su expresión y nos daría una visión molecular del sistema.

Este tipo de estrategia constituiría un primer paso, que se vería complementado por el análisis de mutaciones en estas regiones regulatorias, como por estudios de unión a proteínas (como serían los productos de los genes glnF, glnG, glnL, etc), y por la determinación de los inicios de transcripción correspondientes a diferentes condiciones de crecimiento.

ColE1 Hybrid Plasmids Containing *Escherichia coli* Genes Involved in the Biosynthesis of Glutamate and Glutamine

ALEJANDRA A. COVARRUBIAS, RAY SÁNCHEZ-PESCADOR, AURORA OSORIO,
FRANCISCO BOLIVAR, AND FERNANDO BASTARRACHEA

Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 70228, Ciudad Universitaria 20, D. F., Mexico

Received September 3, 1979

The Clarke-Carbon bank of *Escherichia coli* strains carrying ColE1 hybrid plasmids was screened for complementation of *gdh*, *gltB*, and *glnA* mutations affecting nitrogen metabolism in *E. coli*. Plasmids which complemented each one of these mutations were isolated. In every case, the plasmids conferred to otherwise mutant cells the capacity to synthesize the corresponding wild-type enzymes: glutamate dehydrogenase, glutamate synthase, and glutamine synthetase (GS), respectively. For three representative plasmids, endonuclease restriction maps were constructed. One of the plasmids, pACR1, which complemented *glnA* mutations, including the *glnA21::Tn5* insertion, was deemed to carry the *glnA*⁺ allele. GS synthesis by pACR1 *glnA*⁺/*glnA20* heterozygous merodiploids was subjected to repression by growth on 15 mM NH₄⁺ and had a twofold high derepressed level than wild-type (*glnA*⁺) haploid cells when grown on 0.5 mM NH₄⁺ or on glutamate as only nitrogen sources. The presence of glutamine as sole nitrogen source promoted repressed GS synthesis in the *glnA*⁺/*glnA20* merodiploids. By contrast, glutamine allowed almost fully derepressed synthesis of GS in *glnA*⁺ haploid cells.

Glutamate and glutamine act as the carriers of nitrogen for intermediary metabolism when an enteric bacterium utilized glucose as the preferred source of carbon, and ammonia as the main source of nitrogen. In *Escherichia coli* and other enteric bacteria, glutamate can be synthesized by a variety of reactions. One of these is from ammonia and 2-oxoglutarate, by a reaction catalyzed by glutamate dehydrogenase (GDH; EC 1.4.1.4).¹ Glutamate can also be synthesized by enteric bacteria from 2-oxoglutarate and glutamine in a reaction catalyzed by glutamate synthase (GOGAT; EC 2.6.1.15). Particularly during growth under conditions of nitrogen limitation, the GOGAT-catalyzed reaction

is coupled with the ATP-dependent production of glutamine from ammonia and glutamate catalyzed by glutamine synthetase (GS; EC 6.3.1.2).

Enteric bacterial strains lacking GDH do not require glutamate for growth. Such mutants grow as well as wild-type strains on both low and high ammonia concentrations and on other nitrogen sources (Brenchley and Magasanik, 1974; Pahel *et al.*, 1978). Mutants lacking GOGAT can grow without glutamate on minimal medium containing glucose and excess ammonia but are unable to grow on minimal medium containing ammonia at a low concentration or other organic compounds as sole sources of nitrogen (Brenchley *et al.*, 1973; Pahel *et al.*, 1978). Mutants lacking both GDH and GOGAT activities cannot utilize ammonia as only nitrogen source and require glutamate for growth (Berberich, 1972). It appears, therefore, that when the ammonia supply is limited, the GDH reaction does not

¹ Abbreviations used: GDH, glutamate dehydrogenase; GOGAT, glutamate synthase; GS, glutamine synthetase; EMS, ethylmethanesulfonate; NN minimal medium (in g/liter), KH₂PO₄ (13.6), K₂SO₄ (2.61), MgSO₄·7H₂O (0.2), CaCl₂ (0.01), FeSO₄·7H₂O (0.0005); γ GT, γ -glutamyl transferase; SDS, sodium dodecyl sulfate; Kb, kilobase.

function efficiently and ammonia is assimilated by the cells via the GS-GOGAT pathway. In cells growing with an excess of ammonia, glutamate can be formed either by way of GDH or by the GS-GOGAT pathway.

On the other hand, previous studies have shown that the enzymatic activity of GS is regulated by at least three different mechanisms (reviewed by Ginsburg and Stadtman, 1973; Wohlhueter *et al.*, 1973); (1) by the interconversion of relaxed and taut forms of the enzyme in response to variations in concentration of divalent cations, (2) by cumulative feedback inhibition by various end products of glutamine metabolism, and (3) by covalent alterations of the enzyme by the reversible adenylation of a specific tyrosyl residue on each subunit. The adenylylated GS is biosynthetically less active and more sensitive to feedback inhibition by products of glutamine metabolism than the unmodified form. In addition, studies on mutants in each of the components of this complex regulatory system and on strains altered in *glnA*, the structural gene for GS, led Magasanik and co-workers to propose a model of autogenous regulation in which GS regulates the synthesis of GS itself (Foor *et al.*, 1975; Streicher *et al.*, 1975; Bender and Magasanik, 1977b; Gaillardin and Magasanik, 1978).

Glutamine auxotrophs require glutamine for growth whether or not ammonia is also present in the medium. Two classes of mutations in the *glnA* gene lead to glutamine auxotrophy. One class does not synthesize a GS polypeptide (GlnA⁻ phenotype), and the other synthesizes an enzymatically inactive one (Gln(AC)⁻ phenotype). A third class of mutations results in the high-level constitutive synthesis of GS (GlnC⁻ phenotype). Mainly because two mutations resulting in the GlnC phenotype apparently map between mutations conferring the Gln(AC)⁻ phenotype, mutations leading to GS constitutivity have been considered to lie also in the *glnA* gene (Streicher *et al.*, 1975; Gaillardin and Magasanik, 1978). However,

the possibility that these mutations may lie in a tightly linked but separate gene has also been pointed out (Kustu *et al.*, 1979; Pahel and Tyler, 1979).

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

Using the "terminal transferase-tailing" method, Clarke and Carbon (1975) constructed a gene bank which is formed by cells carrying hybrid plasmids, each consisting of ColE1 DNA and a fragment of *E. coli* chromosomal DNA. We screened this *E. coli* bank for the presence of GS, GDH, and GOGAT gene-complementing mutations and have isolated three different plasmids: one apparently carrying the GS structural gene, *glnA* (pACR1); another one, pRSP1, complementing the *gdh-1* mutation affecting GDH activity; and a third, pRSP20, complementing the *gltB31* mutation that affects GOGAT activity. The isolation and initial characterization of these plasmids and of the bacterial strains harboring them are described in the present paper.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. These are listed in Table 1. They were all derivatives of *E. coli* K-12. The 2200 strains carrying the hybrid ColE1 plasmids were obtained from L. Clarke and J. Carbon. MX705 carrying the *glnA20* mutation was isolated after ethylmethanesulfonate (EMS) mutagenesis (Clark, 1967) followed by penicillin treatment (Miller, 1972) of RR1 cells to enrich for glutamine autotrophs. As expected for mutations in *glnA* (Mayer *et al.*, 1975; Tyler, 1978), the *glnA20* mutation has been shown to be linked by P1 cotransduction to *old*, *rha*, and other neighboring genes. MX705 reverted to the Gln⁺ phenotype at a rate of 5×10^{-10} per cell per division cycle. In addition, the F14

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLE I
LIST OF STRAINS

Strain	Genotype	Source or Reference
CS520	HfrC <i>trpA58 metB1 glyV50 supF58 relA1</i>	Clarke and Carbon (1975)
RR1	F ⁻ <i>proA2 leuB6 thi-1 lacY1 galK2 rpsL20 hsdS r₁₇m₁₇</i>	Bolivar <i>et al.</i> (1977)
AB1206	F'14/ <i>proA2 his-4 thi-1 rpsL8 lacY1 galK2 tfr-3 supE44 (ilvE-argH)_{ΔE2}</i>	A. J. Pittard via A. J. Clark
PA340	F <i>thr-1 leuB6 gdh-1 hisG1 gltB31 argH1 thi-1 ara-14 lacY1 gal-6 malA1 xyl-7 mtl-2 tonA2 λ¹⁸rpsL9 supE44</i>	F. Jacob via B. J. Bachmann
MX705	F ⁻ <i>glnA20 proA2 leu-6 thi-1 lacY1 galK2 rpsL20 rsdS r₁₇m₁₇</i>	EMS mutagenesis of RR1
MX727	F ⁻ <i>thi ilv-680 (pro-lac)_Δ (gal-pgl-attλ-bio)_Δ glnA21::Tn5</i>	S. Brom, A. Osorio and F. Bastarrachea, unpublished
MX729	Same as PA340 but carrying pRSP1	This paper
MX730	Same as PA340 but carrying pRSP20	This paper
MX731	Same as MX705 but carrying pACR1	This paper
MX735	F'14 <i>glnA⁺/glnA20 proA2 leu-6 thi-1 galK2 lacY1 rpsL20 hsdS r₁₇m₁₇</i>	AB1206 X MX705; this paper
MX746	Same as MX727 but carrying pACR1	This paper

merogenote, which is known to carry the *glnA⁺* allele, (Streicher *et al.*, 1975) fully complemented the *glnA20* mutation of MX705. Strain PA340 is the same as strain CB100 from B. D. Sanwal's laboratory with which Berberich (1972) showed that both *gltB* and *gdh* mutations are necessary to make a strain a glutamate auxotroph. PA340 reverts to glutamate independence at a frequency of 10⁻⁸ per cell (Pahel *et al.*, 1978).

Media and growth conditions. For most experiments the NN minimal medium was used. It contains in grams per liter: KH₂PO₄, 13.6; K₂SO₄, 2.61; MgSO₄·7H₂O, 0.2; CaCl₂, 0.01; FeSO₄·7H₂O, 0.0005. Glucose at 0.2% was always added as carbon source. The nitrogen source was either 0.5 or 15 mM NH₄Cl, L-glutamate (2 mg/ml), or L-glutamine (1 mg/ml; grade III, Sigma Chemical Co.). Other growth factors were added at predetermined optimal concentrations from 1 × 10⁻⁴ to 2 × 10⁻³ M. Luria broth (Miller, 1972) modified by the omission of glucose

was used as the rich medium. For solid medium, agar (Difco) at a final concentration of 1.5% was added. Strains were maintained as slants of Luria medium except MX705 and MX727 which were maintained on Luria supplemented with glutamine (1 mg/ml) and merodiploid strains which were maintained on glucose-NN medium with 15 mM NH₄Cl plus the required supplements. Cultures for DNA extraction were grown on M9 medium (Miller, 1972). All incubations were carried out at 37°C under shaking.

Genetic procedures. Construction of F14 merodiploids was carried out by mating AB1206 as donor with MX705 as recipient, and selecting for Gln⁺(His⁺) transconjugants as described by Miller (1972). Transformation was carried out essentially as described by Cohen *et al.* (1972).

Plasmid DNA purification and restriction endonuclease analysis. ColE1 and ColE1 hybrid plasmid DNAs were prepared by the method of Betlach *et al.* (1976) after chlor-

amphenicol (200 mg/liter) amplification. All the restriction enzymes used in this work were prepared by the method of Greene *et al.* (1978) with the exception of the enzyme *Sma*I which was obtained from Bio-Labs. The reaction conditions for the various restriction enzymes have been previously reported (Bolivar *et al.*, 1977). Agarose gel electrophoresis was carried out in a vertical slab gel apparatus using a Tris-borate-EDTA system (Bolivar *et al.*, 1977).

Enzyme assays. For enzyme assays, cultures were grown on glucose-NN medium with the nitrogen sources as indicated. Culture and harvesting conditions were those described by Bender *et al.* (1977). The GS assay used for whole cells and extracts was the γ -glutamyl transferase (γ GT) assay described by Shapiro and Stadtman (1970), using the final concentrations of reactants recommended by Bender *et al.* (1977), except that the pH was 7.33, the isoactivity point for both the adenylylated and nonadenylylated forms of *E. coli* GS (Bloom *et al.*, 1978). In parallel assays, 60 mM Mg^{2+} inhibits the activity of the adenylylated subunits only (Stadtman *et al.*, 1970).

To determine the average state of adenylylation (\bar{n}) we used the formula suggested by Stadtman *et al.* (1970),

$$\bar{n} = 12 - 12b/a,$$

where a is the measure of the total transferase activity ($-Mg^{2+}$) and b is the measure of transferase of the unadenylylated subunits ($+Mg^{2+}$).

GS ability to form glutamine was also determined by the forward reaction assay as described by Bender *et al.* (1977) except that the pH was 7.6 (Shapiro and Stadtman, 1970). One unit of GS activity is defined as that amount of enzyme producing one micromole of γ -glutamyl hydroxamate per minute at 37°C. Specific activity is given as units of enzyme per milligram of protein.

For determination of GDH and GOGAT activities, cells were centrifuged, resuspended in a 1/100 vol of buffer (50 mM Tris, pH

7.6, plus 10 mM mercaptoethanol), and disrupted in a Branson sonifier. A clear supernatant was obtained after centrifugation for 30 min at 10,000g. The GDH and GOGAT activities were determined spectrophotometrically by recording the rate of NADPH oxidation at 340 nm as described by Meers *et al.* (1970). Measurements were made in Zeiss PMQII spectrophotometer, using 1-cm-light path cells. One unit of GDH or GOGAT activity is expressed as that amount of enzyme that oxidizes one micromole of NADPH per minute at room temperature (20°C). Specific activity is given as units of enzyme per milligram of protein.

GS purification. The bacteria were grown in aerated cultures at 37°C in glucose-NN medium containing either 0.2% glutamic acid plus 0.5 mM NH_4Cl or glutamine (1 mg/ml) as nitrogen source. The cells were harvested in the late logarithmic growth phase, washed twice with extraction buffer (5 mM KH_2PO_4 /0.5 mM EDTA/50 mM K_2SO_4 , pH 7.2), resuspended in the same buffer containing 2.25 mM $MnCl_2$, and disrupted by sonication. The suspension was centrifuged 15 min at 10,000 rpm and the supernatant subjected to a purification procedure based on affinity chromatography on anthranilate-bound Sepharose (Palacios, 1976; S. López, R. Palacios, and F. Bastarrachea, unpublished). The GS protein from MX705 was purified using the method described above. Since it was not possible to follow the enzyme by its activity, the fractions of the column eluate pooled were those which corresponded to the activity peak of the wild-type GS in a duplicate column chromatography experiment.

Preparation of antibodies. To prepare anti-glutamine synthetase, rabbits (New Zealand, 2 to 3 kg) were injected with 250 μ g of purified *E. coli* (RR1, *glnA*⁺) glutamine synthetase in Freund's complete adjuvant. The animals were boosted two times at 15-day intervals with the same doses of glutamine synthetase. Starting 1 week after the second boost, rabbits were bled from the ear every week for about 3

months. Serum obtained from the different bleedings was pooled and the total γ -globulin fraction was prepared by three consecutive precipitations with 40% saturated ammonium sulfate. The final precipitate was dissolved in 10 mM phosphate buffer, pH 7.2, dialyzed against the same buffer, and frozen at -70°C .

Electrophoresis and immunoelectrophoresis studies. Slab gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate was performed as reported by Laemmli (1970). Molecular weight markers for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis were obtained from BDH biochemicals (Catalog No. 44223). Rocket immunoelectrophoresis was carried out as described by Weeke (1973). In this technique, the samples are applied in circular wells side by side and the electrophoresis is performed in agarose gel containing a monospecific antiserum. Quantitation was based measuring either the height or the area of the rocket-shaped precipitates that were formed. One percent gel containing 0.5% anti-GS γ -globulin fraction was used. The buffer was 25 mM sodium barbital, pH 8.6, containing 0.025% sodium azide. The gel was run 15 h at 5 V/cm. After electrophoresis the gel was washed extensively, dried, and stained with Coomassie brilliant blue R-250. Cell-free extracts were obtained by sonication as described in the previous section but without the anthranilate-Sephadex purification step.

Other methods. Colicin E1 was prepared from strain JC411 ColE1 as described by Schwartz and Helinski (1971) up to the ammonium sulfate precipitation step. Transformants were tested for colicin immunity by cross-streaking on L-broth agar plates previously spread with the colicin E1 preparation described above. Protein was determined in whole cells or in extracts by the method of Lowry *et al.* (1951) using bovine albumin as a standard.

RESULTS

ColE1 Hybrid Plasmid Isolation

One-liter batches of M9 medium were inoculated with 100 different *E. coli* strains

from the Clarke-Carbon bank, and plasmid DNA was purified after chloramphenicol amplification (Clewell, 1972). With each of the 22 DNA pools so obtained, two recipient strains were transformed: PA340, to isolate hybrid plasmids complementing either *gdh-1* or *gltB31* mutations, and MX705, for plasmids complementing the *glnA20* mutation. Two of the glutamate prototrophic PA340 transformed clones carried plasmids termed pRSP1 and pRSP20, which conferred to PA340 cells the ability to synthesize GDH and GOGAT, respectively. One of the Gln^+ -MX705 transformed clones carried a plasmid termed pACR1. Every one of the plasmids conferred to transformed cells immunity to colicin E1. Each plasmid DNA was purified from the primary transformants and used to transform again the corresponding recipient strains. Frequencies of glutamate prototrophic transformants of $1.3 \times 10^3/\mu\text{g}$ of pRSP1 DNA and of $0.9 \times 10^3/\mu\text{g}$ of pRSP20 DNA were obtained with PA340 as recipient. Using MX705 as recipient, we obtained a frequency of 5×10^3 Gln^+ transformants/ μg of pACR1 DNA.

GDH and GOGAT Activities in Cells

Harboring Plasmids pRSP1 or pRSP20

The activities of GDH and GOGAT were determined in cell extracts from strains MX729 (pRSP1/PA340) and MX730 (pRSP20/PA340). Results are shown in Table 2. GDH activity measured in strain MX729 was approximately twofold higher than that observed for the wild-type strain CS520. The GOGAT activity of MX729 cells was as low as that found in PA340 cells carrying no plasmid. By contrast, MX730 cells synthesized GOGAT with an activity higher by a factor of 2.5 than the one synthesized by wild-type CS520 cells but did not synthesize GDH activity. Thus, plasmid pRSP1 complemented the *gdh-1* mutation and plasmid pRSP20 complemented the *gltB31* mutation. The higher specific activities for both enzymes observed in the plasmid-carrying strains as compared to those of CS520 can be tentatively explained as due to

TABLE 2
GDH AND GOGAT SPECIFIC ACTIVITIES DETERMINED
BY PLASMIDS pRSP1 AND pRSP20^a

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

^a One-hundred-milliliter cultures were grown to a density of 6×10^8 cells/ml on glucose–NN medium with 30 mM NH₄Cl as the only nitrogen source, except strain PA340 which was grown on the same medium supplemented with 2 mg/ml glutamate. GDH and GOGAT activities were determined in cell-free extracts as described under Materials and Methods.

the high number of copies of ColE1 hybrid plasmids probably present per cell (Hersfield *et al.*, 1974) although this will have to await confirmation. Further studies are also necessary in order to determine the identity of the *E. coli* genes cloned in plasmids pRSP1 and pRSP20 that complemented the *gdh-1* and *gltB31* mutations, respectively.

GS Activity Determined by pACR1

The total amount of GS (–Mg²⁺) as well as the amount of nonadenylylated GS (+Mg²⁺) was determined using the γ GT assay in cells of strain MX731 (pACR1 *glnA*⁺/*glnA20*) and in the parental strains MX705 (*glnA20*), RR1 (the *glnA*⁺ strain from which MX705 was derived), and CS520 (*glnA*⁺) from which the colony bank of ColE1 hybrid plasmids was originally made (Clarke and Carbon, 1975). In addition, the GS biosynthetic activity was measured by the forward reaction assay. These results are summarized in Table 3.

Wild-type *glnA*⁺ strains RR1 and CS520 synthesized derepressed levels of half-adenylylated GS when grown on NN medium with either 0.5 mM ammonium or glutamate as sole nitrogen sources. Under similar growth conditions, MX731 cells had a twofold higher GS activity, half of which was also adenylylated. Our results do not agree with those reported by Bartnik and

Tyler (1977) who did not find a gene dosage effect in *E. coli* cells harboring a ColE1 hybrid plasmid also carrying the *glnA*⁺ gene. Very probably, pACR1 and the plasmid isolated by Bartnik and Tyler (1977) carry DNA fragments which are different, at least in part, as suggested by the presence of substrate sites for certain restriction endonucleases in each of the plasmids not present in the alternative one (see below).

For comparison, we also measured the GS activity of cells of MX735 strain (F14 *glnA*⁺/*glnA20*). Under derepressed conditions, MX735 synthesized GS similar in amount and in level of adenylylation to the GS synthesized by haploid strains RR1 and CS520. This is probably related to the fact that bacterial cells normally harbor only one to nearly two copies of any particular F-merogenote per chromosome in the autonomous state (Hayes, 1968; Frame and Bishop, 1971).

A 15 mM ammonium concentration supported good growth of all Gln⁺ strains that were tested (Table 3), even though it caused a strong repression of GS synthesis. The well-known pattern of enteric bacterial cells synthesizing small amounts of highly adenylylated GS in response to their culturing on high ammonia concentrations (see Tyler, 1978 for review) was strictly followed by all strains that were tested.

Growth of enteric bacteria on glutamine as sole nitrogen source results in a condition of nitrogen limitation (Bender and Magasanik, 1977). Thus glutamine allowed derepressed synthesis of GS in the haploid parental strains RR1 and CS520 but caused a marked repression of GS synthesis in MX731 and MX735 similar to that caused by 15 mM NH₄⁺, something we (Table 3) and others have not observed in haploid cells of *E. coli* (Pahel *et al.*, 1978) or *Klebsiella aerogenes* (Streicher *et al.*, 1976; Bender and Magasanik, 1977a; Gaillardin and Magasanik, 1978). The small amount of GS synthesized was partially adenylylated.

The unexpected finding of glutamine repressing GS synthesis in the merodiploids

TABLE 3
GS SPECIFIC ACTIVITIES AND ADENYLYLATION STATES OF *E. coli* STRAINS^a

Strain (genotype)	Nitrogen source	GS assay			Forward reaction assay
		-Mg ²⁺	+Mg ²⁺	\bar{n}	
CS520 (<i>glnA</i> ⁺)	0.5 mM NH ₄ ⁺	0.92	0.43	6	0.40
	15 mM NH ₄ ⁺	0.08	0.01	10	0.01
	Glutamate	0.66	0.34	6	0.35
	Glutamine	0.53	0.40	3	0.32
RR1 (<i>glnA</i> ⁺)	0.5 mM NH ₄ ⁺	1.03	0.52	6	0.52
	15 mM NH ₄ ⁺	0.09	0.02	9	0.02
	Glutamate	0.80	0.43	6	0.43
	Glutamine	0.64	0.57	1	0.37
MX705 (<i>glnA20</i>)	Glutamine	<0.01	<0.01	—	<0.01
MX731 (ColE1 <i>glnA</i> ⁺ / <i>glnA20</i>)	0.5 mM NH ₄ ⁺	1.95	1.07	5	0.93
	15 mM NH ₄ ⁺	0.08	<0.01	12	<0.01
	Glutamate	1.99	1.26	6	0.88
	Glutamine	0.16	0.06	7	0.06
MX735 (F14 <i>glnA</i> ⁺ / <i>glnA20</i>)	0.5 mM NH ₄ ⁺	0.64	0.36	5	0.34
	15 mM NH ₄ ⁺	0.08	<0.01	12	<0.01
	Glutamate	0.64	0.34	6	0.28
	Glutamine	0.08	0.05	4	0.04
MX727 (<i>glnA21</i> ::Tn5)	Glutamine	<0.01	<0.01	—	<0.01
MX746 (ColE1 <i>glnA</i> ⁺ / <i>glnA21</i> ::Tn5)	0.5 mM NH ₄ ⁺	1.96	1.11	5	0.68
	15 mM NH ₄ ⁺	0.17	0.04	9	0.01
	Glutamate	1.59	0.81	6	0.45
	Glutamine	1.68	1.46	2	0.72

^a Inocula were grown overnight in minimal medium with the nitrogen source indicated in the table. Cultures were diluted 1:10 into the corresponding fresh medium and aerated until growth reached approximately 6×10^8 cells/ml. Enzyme determinations were carried out as described under Materials and Methods. Samples of cultures of the merodiploid strains grown on glutamine as sole nitrogen source were removed before harvesting, plated, and screened for the presence of Gln⁻ segregants. These occurred but only at frequencies of 5% for MX731, 1% for MX735, and 0.5% for MX746.

was tentatively explained as triggered by the *glnA20* defective protein. In order to test this possibility we made use of strain MX727 (Table 1) which carries the *glnA21* mutation due to insertion of the Tn5 (Kan^R) transposable element (Berg *et al.*, 1975). This insertion apparently caused complete loss of *glnA* function since cross-reacting material against anti-GS antibodies was not detected in cell-free extracts of MX727 cells (Fig. 2). Purified pACR1 DNA transformed MX727 cells to glutamine prototrophy in the presence of kanamycin (20 μ g/ml) and colicin

E1, with an efficiency of 0.4×10^8 transformants/ μ g of pACR1 DNA. One of these transformants was purified and termed MX746.

As shown in Table 3, MX746 cells synthesized GS enzyme similar in amount and in adenylylation state to that made by MX731 under all growth conditions, except that glutamine no longer repressed GS synthesis. This result was taken as solid evidence in favor of the role of the *glnA20* protein as essential for repression by glutamine of GS synthesis in MX731 and MX735.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

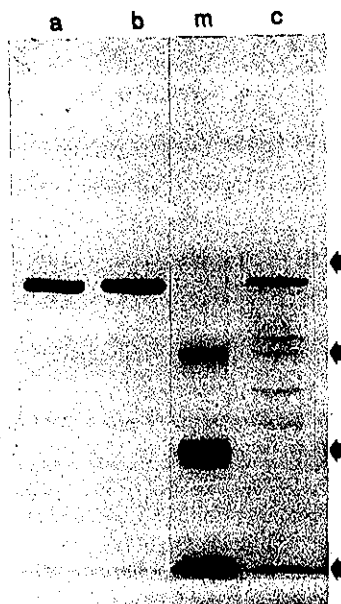


FIG. 1. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of the purified GS. GS obtained from (a) RR1 (*glnA*⁺), (b) MX731 (pACR1 *glnA*⁺/*glnA20*), and (c) MX705 (*glnA20*). In (c) the GS preparation was less pure due to the fact that more fractions were pooled, as compared to the wild type, to insure the presence of this protein. Molecular weight markers (m) are glutaraldehyde-crosslinked subunits of 14,300 monomer (14,300; 28,600; 42,900; and 57,200) as indicated by the arrows.

Some Properties of the GS Proteins Made by *E. coli* Strains

The defective GS protein made by MX705 (*glnA20*) cells was purified by the same affinity chromatography method used to purify the wild-type GS protein (see Materials and Methods). Its monomer had a molecular weight similar to that of the wild-type GS monomer (Fig. 1). Moreover, the GS mutant protein from MX705 was able to cross-react with antibodies prepared against wild-type GS (Fig. 2); MX705 extracts had an antigen level 75% that of wild-type (RR1 *glnA*⁺) extracts. MX731 (pACR1 *glnA*⁺/*glnA20*) cells synthesized an enzymatically active GS similar to wild-type GS in the molecular weight of their respective monomers (Fig. 1). The high level (250%) of GS antigen found in MX731 was equivalent to the high level of GS activity present in the extracts.

MX727 (*glnA21*::Tn5) cells did not synthesize detectable levels of GS protein or antigen, but MX746 (pCR1 *glnA*⁺/*glnA21*::Tn5) synthesized a level of GS antigen (174%) almost as high as that expected in correspondence to its high GS activity.

Restriction Endonuclease Analysis of Hybrid Plasmids

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

As can be seen in Figs. 3-5, a 0.7×10^6 -dalton restriction fragment can be derived from all three hybrid plasmids after digestion of DNA with the restriction endonuclease *Pst*I. The same fragment that includes a *Sma*I site, can be obtained from plasmid ColE1. Therefore, we assume that this fragment is part of the inactivated colicin E1 production gene in the ColE1 hybrid plasmids (Bell *et al.*, 1977). These data allowed us to localize the position of the colicin E1 immunity gene and the origin of replication in the hybrid plasmids, assuming that no deletion or insertion of foreign DNA in the ColE1 segment occurred during the bank construction.

The plasmid pRSP1 (Fig. 3) had a molecular weight of 8.8×10^6 d, one substrate site for each of the restriction enzymes *Sal*I, *Bgl*II, and *Sma*I, two for the endonuclease *Eco*RI, three for *Pst*I, and three or four of the endonuclease *Hpa*I (only two of these *Hpa*I sites have been mapped). No sites for the restriction enzymes *Hind*III and *Bam*HI were detected in pRSP1.

Plasmid pRSP20 (Fig. 4) with a molecular weight of 12×10^6 d, had one substrate site for each of the restriction enzymes *Sal*I and *Bgl*II. It carried two substrate sites for the

Strain	Per Cent Antigen
RR1	100
MX705	75
MX731	250
MX746	174
MX727	0

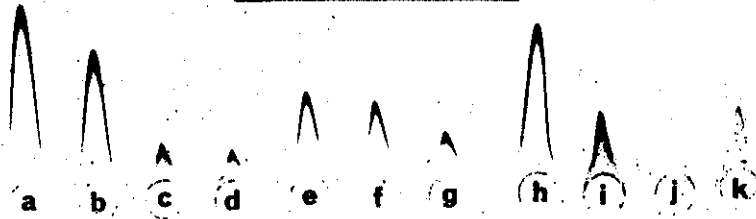


FIG. 2. Rocket quantitative immunoelectrophoresis of glutamine synthetase from extracts of RR1 (*glnA*⁺), MX705 (*glnA20*), and MX731 (*pACR1 glnA*⁺/*glnA20*). Procedures were performed according to Weeke (1973) as described under Materials and Methods. The amount of antigen was quantitated by measuring the peak height from the upper edge of the application well to the top of the peak, using a standard curve of protein concentration vs peak height as a reference. (a,b) GS purified from RR1 (4 and 3 µg of total protein, respectively); (c,d) extract from RR1 (4 and 3 µg of total protein, respectively); (e,f) GS purified from MX705 (4 and 3 µg of total protein, respectively); (g) extract from MX705 (3 µg of total protein); (h) GS purified from MX731 (3 µg of total protein); (i) extract from MX731 (3 µg of total protein); (j) extract from MX727 (4 µg of total protein); and (k) extract from MX746 (4 µg of total protein). To prepare the extracts, all strains were grown on glucose-NN minimal medium containing glutamate (2 mg/ml) plus 0.5 mM NH₄Cl, except MX705 and MX727 which were grown on glucose-NN containing glutamine (1 mg/ml). The percentage of antigen shown in the inset was calculated by taking the amount of antigen present in RR1 (*glnA*⁺) as 100%.

endonucleases *EcoRI* and *SmaI*, three for the endonuclease *PstI*, and four (possibly five) *HindIII* sites. Three of these *HindIII* sites have been mapped in the molecule; a fourth was localized in either one of the two *HindIII* positions shown as dashed lines in the map. A fifth site could be localized very close to one of these four sites. No *BamHI* site was present in the hybrid molecule.

The third hybrid plasmid, *pACR1* (Fig. 5), had a molecular weight of 10.6×10^6 d, and carried unique restriction sites for endonucleases *BglII*, *EcoRI*, and *HindIII*. It carried two substrate sites for the restriction enzymes *SalI* and *BamHI*, three for *SmaI*, and four for *PstI*. There were at least five *HpaI* restriction sites in the molecule. In contrast to *pACR1*, the *ColE1 glnA*⁺ plasmid described by Bartnik and Tyler (1977) does not carry sites for the *EcoRI*, *BamHI*, and *HindIII* restriction endonucleases.

Screening for Genetic Markers in *pACR1*

Using the conversion factor of 41 kilobases (kb) per minute of *E. coli* we calculated that the DNA fragment cloned in *pACR1*, having a molecular length of 9.4 kb, carries approximately 0.23 min of the bacterial chromosome. The closest marker thus far known to lie at one side of *glnA* is *polA*: the genetic map interval between these two genes being 0.27 min (based on 65% cotransduction, Tyler, 1978). The closest gene thus far identified on the other side of *glnA* is *chlB*, which lies 0.80 min apart (S. Brom, A. Osorio, and F. Bastarrachea, unpublished). Therefore, it was not surprising to find that *pACR1* did not complement either *polA* or *chlB* mutations.

Any doubts that still remained as to whether we had cloned the *glnA*⁺ gene in *pACR1* were dissipated after we transformed MX727 (*glnA21::Tn5*) cells with *pACR1*.

Since MX746 did not segregate plasmid-free cells even in the presence of glutamine as sole nitrogen source, we isolated plasmid DNA from it and showed that such DNA had the *Pst*I endonuclease restriction pattern characteristic of pACR1. Moreover, when

AB1206 was mated with MX746, and selection was made for kanamycin-resistant Ilv^+ Gln^+ transconjugants, it was found that the F14-merogenote displaced the pACR1 plasmid in 2 out of 50 progeny clones that were tested.

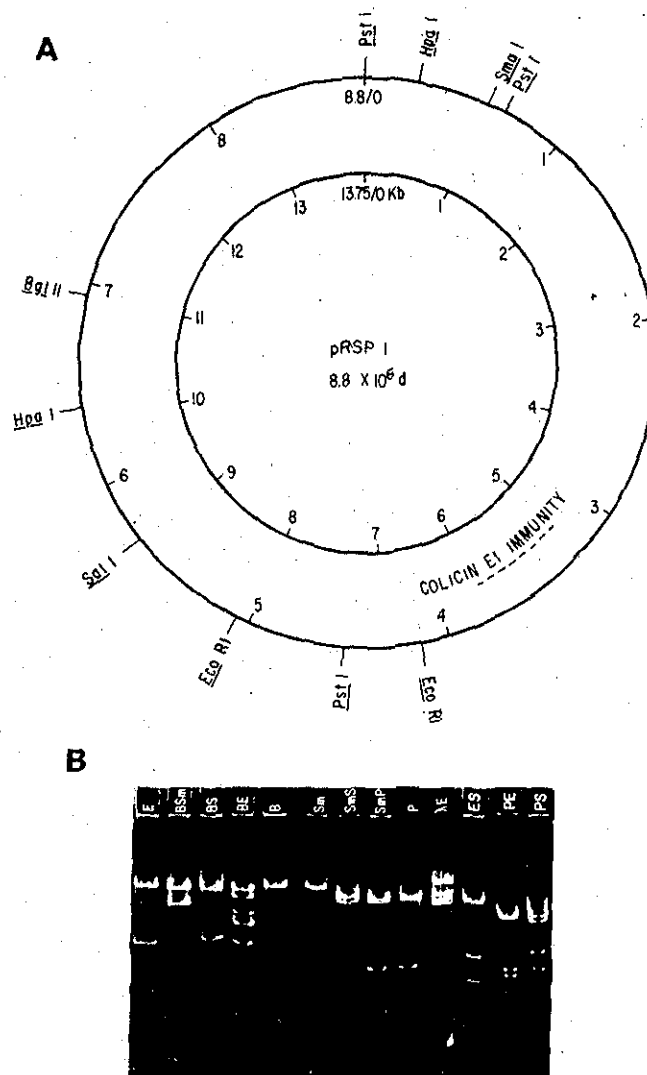


FIG. 3. (A) Circular restriction map of pRSP1. The relative positions of restriction sites are drawn to scale on a circular map divided into units of 1×10^6 daltons (outer circle) and 1 kb (inner circle) (B) One percent agarose gel electrophoresis of the plasmid pRSP1 digested with various restriction enzymes. E: *Eco*RI; BSm: *Bgl*II and *Sma*I; BS: *Bgl*II and *Sall*; BE: *Bgl*II and *Eco*RI (partial); B: *Bgl*II; Sm: *Sma*I; Sm S: *Sma*I and *Sall*; Sm P: *Sma*I and *Pst*I; P: *Pst*I; ES: *Eco*RI and *Sall*; PE: *Pst*I and *Eco*RI; PS: *Pst*I and *Sall*. Molecular weight estimates are based on the six λ DNA fragments generated by *Eco*RI (λ E): 13.7, 4.68, 3.7, 3.56, 3.03, and 2.09 mdal (Bolivar *et al.*, 1977).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSSION

The results presented above describe the isolation and characterization of three different plasmids from the Clarke-Carbon

bank, pACR1, pRSP1, and pRSP20, carrying the wild-type genes coding for the enzymes GS, GDH, and GOGAT, respectively. Evidence that a particular gene is carried on a plasmid, however, is incomplete. Gene

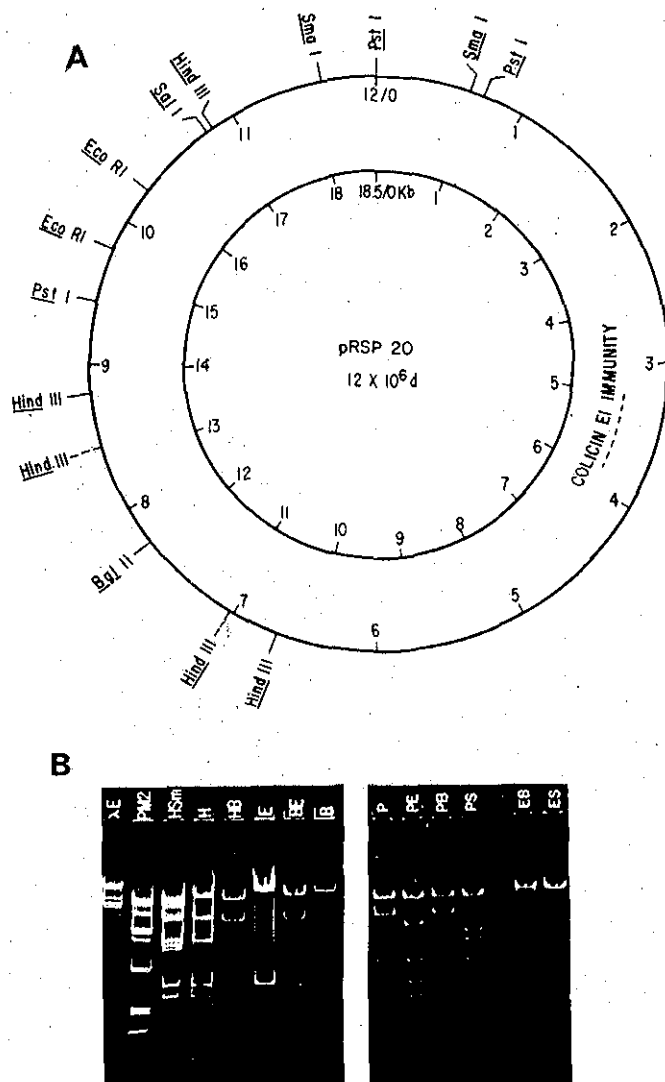


FIG. 4. (A) Circular restriction map of pRSP20. The relative positions of restriction sites are drawn to scale as in Fig. 3A. (B) One percent agarose gel electrophoresis of the plasmid pRSP20 digested with various restriction enzymes: HSm: *Hind*III and *Sma*I; H: *Hind*III; HB: *Hind*III and *Bgl*II; E: *Eco*RI; BE: *Bgl*II and *Eco*RI; B: *Bgl*II; P: *Pst*I; PE: *Pst*I and *Eco*RI; PB: *Pst*I and *Bgl*II; PS: *Pst*I and *Sal*I; EB: *Eco*RI and *Bgl*II; ES: *Eco*RI and *Sal*I. Molecular weight markers as in the legend for Fig. 3B. In addition, PM2 DNA digested with *Hind*III (PM2) was used. The resulting fragments are 3.14, 1.34, 0.6, 0.31, 0.29, 0.14, and 0.06 m daltons; the last one was not seen in the gel. (W. Brown, personal communication; Bolivar *et al.*, 1977).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

assignments basically relied upon the complementation pattern of the plasmids; thus, pACR1 complemented two different *glnA* mutations, including the *glnA21::Tn5* insertion, while pRSP1 and pRSP20 complemented the *gdh-1* and *gltB31* mutations, respectively.

The possibility that we have isolated revertants is totally unlikely in view of the further transfer observed from each of the complemented strains.

Another explanation of the apparent complementation such as suppression, also appears unlikely in view of the high enzyme

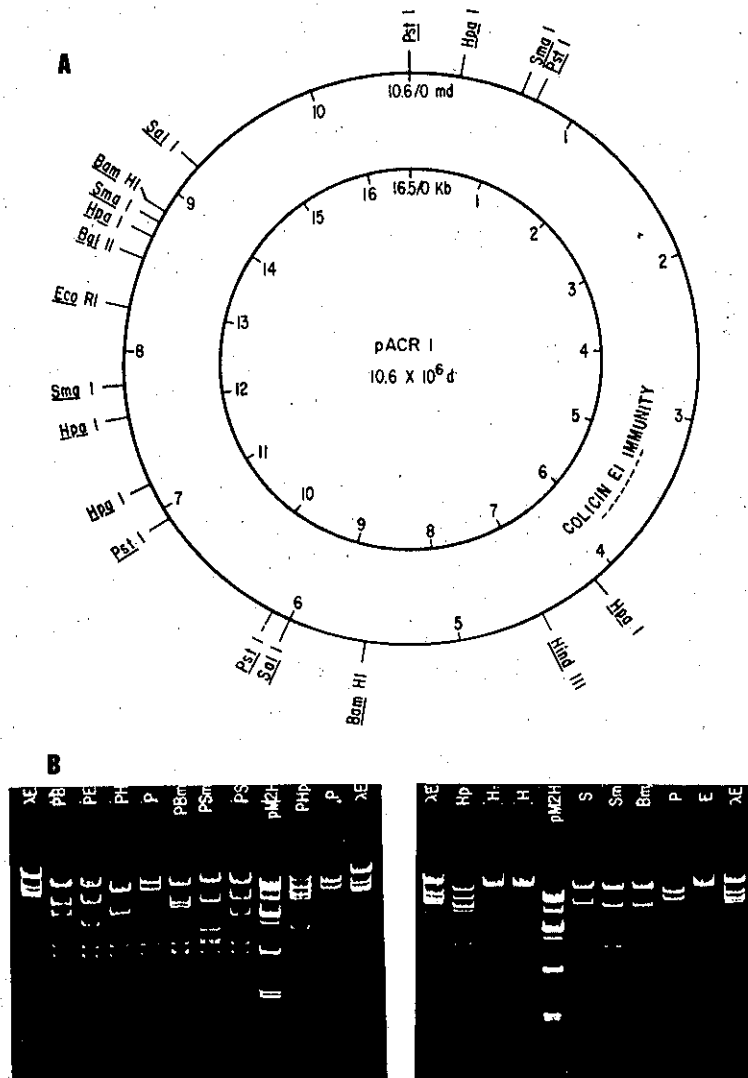


FIG. 5. (A) Circular restriction map of pACR1. The relative positions of restriction sites are drawn to scale as in the legend for Fig. 3A. (B) One percent agarose gel electrophoresis of the plasmid pACR1 digested with various restriction enzymes. PB: *PstI* and *BglII*; PE: *PstI* and *EcoRI*; PH: *PstI* and *HindIII*; P: *PstI*; PBm: *PstI* and *BamHI*; PSm: *PstI* and *SmaI*; PS: *PstI* and *Sall*; PHp: *PstI* and *HpaI*; H: *HindIII*; S: *Sall*; Sm: *SmaI*; Bm: *BamHI*; P: *PstI*; E: *EcoRI*. Molecular weight markers as in the legend for Figs. 3B and 4B.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

levels synthesized by the complemented strains. Merodiploid strains MX729 and MX730, carrying plasmids pRSP1 and pRSP20, respectively, and MX731 and MX746, carrying plasmid pACR1, showed elevated levels of enzyme activity. MX729 and MX730 synthesized about 2.5-fold the levels of wild-type GDH and GOGAT activities, respectively (Table 2). Under derepressed conditions, i.e., in the presence of low (0.5 mM) ammonium concentration or glutamate as only nitrogen sources, MX731 and MX746 synthesized twice the level of wild-type GS activity (Table 3). It is not known whether these values reflect different plasmid copy numbers. It should be noticed that no gene dosage effects were previously observed in cells carrying another ColE1 *glnA*⁺ plasmid (Bartnik and Tyler, 1977). In homozygous *glnA*⁺/*glnA*⁺ or heterozygous F14 *glnA*⁺/*glnA* merodiploids, no gene dosage effects have been observed either (i.e., MX735, Table 3; Streicher *et al.*, 1976).

The question of whether the genes on the plasmids are under normal control can be partially answered only in the case of the *glnA*⁺ gene carried by plasmid pACR1. As already mentioned, growth of heterozygous pACR1 *glnA*⁺/*glnA* merodiploids (i.e., MX731 and MX746) under nitrogen limitation (i.e., in the presence of 0.5 mM ammonium or glutamate) led to derepressed synthesis of GS. By contrast, GS synthesis was repressed when the same strains were grown on high (15 mM) ammonium concentrations. As expected, the repressed enzyme had high adenylation levels, whereas the derepressed enzyme was mostly unadenylylated (Table 3). Thus, expression of the *glnA*⁺ gene from pACR1 appeared to be regulated similarly to the chromosomal *glnA*⁺ gene of haploid *E. coli* cells.

Growth of *K. aerogenes* cells in a minimal glucose medium with glutamine as only nitrogen source results in a condition of nitrogen limitation, thus leading to derepressed synthesis of GS (Bender and Magasanik,

1977). These authors concluded that, apparently, exogenous glutamine is not transported into the cell at a rate sufficient to cause repression. Growth of strains MX731 and MX746 on glutamine as only nitrogen source resulted in different effects on GS synthesis. GS synthesis was not repressed by glutamine in MX746 cells whereas it was severely repressed in MX731 cells (Table 3). This differential effect can be related to the different genetic constitution of the two strains. They both carry the pACR1 plasmid, but the chromosomal *glnA* mutation that is complemented in each of the strains is different. The *glnA20* allele determines a protein devoid of GS activity, yet able to react with antibodies prepared against purified wild-type GS enzyme (Figs. 1 and 2, Table 3). In MX746, the glutamine auxotrophy is caused by the *glnA21::Tn5* insertion and apparently, it does not give place to a detectable product. This glutamine effect seems to be somehow associated with the product of the *glnA20* mutation. In order to validate this conclusion, a more detailed study of this mutation is being undertaken.

Attempts to subclone the *glnA*⁺, *gdh*⁺, and *gltB*⁺ genes from the pACR1, pRSP1, and pRSP20 plasmids, respectively, have met with success. Moreover, the proteins encoded by the three above-mentioned plasmids have been determined by taking advantage of the fact that these plasmids readily segregate into *E. coli* minicells. Finally, immunoprecipitation of the polypeptides expressed by minicells containing the pACR1 plasmid have shown that this plasmid does indeed carry the structural gene for GS (to be published).

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to John Carbon to supplying the hybrid plasmid gene bank of *E. coli* and to Barbara Bachmann for the gift of strains, for her assignments of a block of allele numbers for *gln* mutations, and for checking the genealogy of most of the *E. coli* strains that were used. We are also thankful to Alvin J. Clark for his critical review of the manuscript and to Rafael

Palacios and Jaime Mora for various discussions. Aurora Blanco is acknowledged for her technical assistance. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México) Grants PNCB-1649 and PNCB-1650.

REFERENCES

- BACHMANN, B. J., LOW, K. B., AND TAYLOR, A. L. (1976). Recalibrated linkage map of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol. Rev.* **40**, 116-167.
- BARTNIK, E., AND TYLER, B., (1977). Studies on a ColE1 *glnA* plasmid. *Abstr. 77th Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol.*, 201.
- BELL, G. I., DEGENNARO, L. J., GELFAND, D. H., BISHOP, R. J., VALENZUELA, P., AND RUTTER, W. J. (1977). Ribosomal RNA genes of *Saccharomyces cerevisiae*. Physical map of the repeating unit and location of the regions coding for 5 S, 5.8 S, 18 S and 25 S ribosomal RNAs. *J. Biol. Chem.* **252**, 8118-8125.
- BENDER, R. A., AND MAGASANIK, B. (1977a). Regulatory mutants in the *Klebsiella aerogenes* structural gene for glutamine synthetase. *J. Bacteriol.* **132**, 100-105.
- BENDER, R. A., AND MAGASANIK, B. (1977b). Autogenous regulation in the synthesis of glutamine synthetase in *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* **132**, 106-112.
- BENDER, R. A., JANSSEN, K. A., RESNICK, A. D., BLUMENBERG, M., FOOR, F., AND MAGASANIK, B. (1977). Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* **129**, 1001-1009.
- 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.
- BERG, D. E., DAVIES, J., ALLET, B., AND ROCHAIX, J. (1975). Transposition of R factor genes to bacteriophage λ . *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**, 3628-3632.
- BETLACH, M., HERSHFIELD, V., CHOW, L., BROWN, W., GOODMAN, H. M., AND BOYER, H. W. (1976). A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the *EcoRI* restriction and modification of DNA. *Fed. Proc.* **35**, 2037-2043.
- BLOOM, F. R., LEVIN, M. S., FOOR, F., AND TYLER, B. (1978). Regulation of glutamine synthetase formation in *Escherichia coli*: characterization of mutants lacking the uridylyltransferase. *J. Bacteriol.* **134**, 569-577.
- BOLIVAR, F., RODRIGUEZ, R. L., BETLACH, M. C., AND BOYER, H. W. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles: I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene* **2**, 75-93.
- BRENCHLEY, J. E., AND MAGASANIK, B. (1974). Mutants of *Klebsiella aerogenes* lacking glutamate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **117**, 544-550.
- BRENCHLEY, J. E., PRIVAL, M. J., AND MAGASANIK, B. (1973). Regulation of the synthesis of enzymes responsible for glutamate formation in *Klebsiella aerogenes*. *J. Biol. Chem.* **248**, 6122-6128.
- CLARK, A. J. (1967). The beginning of a genetic analysis of recombination proficiency. *J. Cell. Physiol.* **70** (Suppl. 1), 165-180.
- CLARKE, L., AND CARBON, J. (1975). Biochemical construction and selection of hybrid plasmids containing specific segments of the *Escherichia coli* genome. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**, 4361-4365.
- CLEWELL, D. B. (1972). Nature of ColE1 plasmid replication in *Escherichia coli* in the presence of chloramphenicol. *J. Bacteriol.* **110**, 667-676.
- COHEN, S. N., CHANG, A. C. Y., AND HSU, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 2110-2114.
- FOOR, F., JANSSEN, K. A., AND MAGASANIK, B. (1975). Regulation of the synthesis of glutamine synthetase by adenylylated glutamine synthetase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**, 4844-4848.
- FRAME, R., AND BISHOP, J. O. (1971). The number of sex-factors per chromosome in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **121**, 93-103.
- GAILLARDIN, C. M., AND MAGASANIK, B. (1978). Involvement of the product of the *glnF* gene in the autogenous regulation of glutamine synthetase formation in *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* **133**, 1329-1338.
- GINSBURG, A., AND STADTMAN, E. R. (1973). Regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. In "The Enzymes of Glutamine Metabolism (S. Prusiner and E. R. Stadtman, eds.), pp. 9-43. Academic Press, New York.
- GREENE, P. J., HEYNEKER, H. L., BOLIVAR, F., RODRIGUEZ, R. L., BETLACH, M. C., COVARRUBIAS, A. A., BACKMAN, K., RUSSEL, D. J., TAIT, R., AND BOYER, H. W. (1978). A general method for the purification of restriction enzymes. *Nuc. Acids Res.* **5**, 2373-2380.
- HAYES, W. (1968). "Studies of Bacteria and Their Viruses, 2nd. ed. Wiley, New York.
- HERSHFIELD, V., BOYER, H. W., YANOFSKY, C., LOVETT, M. A., AND HELINSKI, D. R. (1974). Plasmid ColE1 as a molecular cloning vehicle for cloning and amplification of DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**, 3455-3459.
- KUSTU, S., BURTON, D., GARCIA, E., MCCARTER, L., AND MCFARLAND, N. (1979). Nitrogen control in *Salmonella*: Regulation by the *glnR* and *glnF* gene products. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **76**, 4576-4580.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**, 680-685.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

46

- 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.
- MAYER, E. P., SMITH, O. H., FREDRICKS, W. W., AND MCKINNEY, M. A. (1975). The isolation and characterization of glutamine-requiring strains of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* 137, 131-142.
- MEERS, J. L., TEMPEST, D. W., AND BROWN, C. M. (1970). "Glutamine (amide); 2-oxoglutarate amino transferase oxido-reductase (NADP)" an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 64, 187-192.
- MILLER, J. (1972). "Experiments in Molecular Genetics," 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- PAHEL, G., AND TYLER, B. (1979). A new *glnA*-linked regulatory gene for glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76, 4544-4548.
- PAHEL, G., ZELENETZ, A. D., AND TYLER, B. M. (1978). *gltB* gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 133, 139-148.
- PALACIOS, R. (1973). *Neurospora crassa* glutamine synthetase: purification by affinity chromatography and characterization of subunit structure. *J. Biol. Chem.* 251, 4787-4791.
- SCHWARTZ, S. A., AND HELINSKI, D. R. (1971). Purification and characterization of colicin E1. *J. Biol. Chem.* 246, 6318-6327.
- SHAPIRO, B. M., AND STADTMAN, E. R. (1970). Glutamine synthetase (*Escherichia coli*): In "Methods in Enzymology" (H. Tabor and C. W. Tabor, eds.), Vol. 17A, pp. 910-922. Academic Press, New York.
- STADTMAN, E. R., GINSBURG, A., CIARDI, J. E., YEH, J., HENNING, S. B., AND SHAPIRO, B. M. (1970). Multiple molecular forms of glutamine synthetase produced by enzyme catalyzed adenylation and deadenylation reactions. *Advan. Enzyme Regul.* 8, 99-118.
- STREICHER, S. L., BENDER, R. A., AND MAGASANIK, B. (1975). Genetic control of glutamine synthetase in *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* 121, 320-331.
- STREICHER, S. L., DELEO, A. B., AND MAGASANIK, B. (1976). Regulation of enzyme formation in *Klebsiella aerogenes* by episomal glutamine synthetase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 127, 184-192.
- TYLER, B. (1978). Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Annu. Rev. Biochem.* 47, 1127-1162.
- WEEKE, B. (1973). Rocket immunoelectrophoresis. In "A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis" (N. N. Axelsen, J. Kroll, and Weeke, eds.), pp. 37-46. Universitetsforlaget, Oslo.
- WOHLHUETER, R. M., SCHUTT, H., AND HOLZER, H. (1973). Regulation of glutamine synthesis *in vivo* in *E. coli*. In "The Enzymes of Glutamine Metabolism" (S. Prusiner and E. R. Stadtman, eds.), pp. 45-64. Academic Press, New York.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cloning and physical mapping of the *glnA* gene of *Escherichia coli* K-12

(Glutamine synthetase; pBR322 cloning vehicle; restriction mapping; minicells; transcription)

Alejandra A. Covarrubias, Mario Rocha, Francisco Bolivar and Fernando Bastarrachea

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

(Received April 25th, 1980)

(Accepted July 17th, 1980)

SUMMARY

We have isolated part of the *glnA* region of *Escherichia coli* K-12 as a 6.4 Md DNA fragment on the ColE1 hybrid plasmid pACR1. DNA fragments from pACR1 obtained by cleavage with certain restriction endonucleases were subcloned into the pBR322 cloning vehicle. Recognition sites for the endonucleases *Bam*HI, *Sma*I, *Bgl*II, and *Eco*RI were localized inside the *glnA* gene sequence. De novo synthesized polypeptides, employing minicells that carried some of these plasmids, allowed us to determine the direction of transcription of the *glnA* gene relative to an adjoining gene that codes for a 65 000 dalton protein.

INTRODUCTION

The *glnA* gene, which maps at 85 min on the *E. coli* chromosome (Bachmann and Low, 1980), codes for the Gln synthetase [L-glutamate: ammonia ligase (ADP-forming), EC 6.3.1.2.] monomer (MW 53 000). In enteric bacteria, the enzymatically active Gln synthetase consists of 12 identical monomeric subunits (Ginsburg and Stadtman, 1973). This enzyme is not only responsible for the synthesis of glutamine but also for the assimilation of ammonia

Abbreviations: Ap^R, ampicillin resistance; Gln synthetase, glutamine synthetase; Md, megadaltons; MW molecular weight; NN minimal medium (in g/l), KH₂PO₄ (13.6), K₂SO₄ (2.61), MgSO₄ · 7H₂O (0.2), CaCl₂ (0.01), FeSO₄ · 7H₂O (0.0005), pH 7.4; SDS, sodium dodecyl sulphate; Tc^R, tetracycline resistance; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane.

into glutamate through a coupled reaction with glutamate synthetase [L-glutamate NADP⁺ oxidoreductase, EC 1.4.1.13] (Meers et al., 1970). The biosynthetic activity of Gln synthetase is reversibly modified by the covalent attachment of an adenylyl moiety to each of its 12 subunits; the enzymatic activity being inversely proportional to the number of covalently bound AMP groups (Ginsburg and Stadtman, 1973).

The amount of Gln synthetase inside the cells can vary over a 50-100-fold range (Bender and Magasanik, 1977), depending upon the availability of nitrogen in the growth medium. The products of two positive regulatory genes, *glnF* and *glnG* (called *glnR* in *Salmonella typhimurium* by Kustu et al., 1979), have a pleiotropic role in controlling synthesis of Gln synthetase (Kustu et al., 1979a; Pahel and Tyler, 1979), and of amino acid transport components (Kustu et

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

al., 1979a,b). The *glnF* and *glnG* products appear also to regulate synthesis of enzymes necessary for the utilization of various nitrogenous compounds (Pahel and Tyler, 1979; Tyler et al., 1980). Whether other regulatory elements, in addition to the *glnF* and *glnG* products, are involved in the regulation of nitrogen metabolism, such as the Gln synthetase as originally proposed (reviewed by Magasanik, 1977 and Tyler, 1978), remains to be elucidated.

In order to understand the details of the in vitro transcription, the physical organization, and the regulation of the *glnA* region, it was deemed necessary to isolate this DNA chromosomal fragment. We have previously described the isolation and initial characterization of a hybrid ColE1 plasmid, pACR1, which complements different *glnA* mutations (Covarrubias et al., 1980). In this communication we wish to report evidence which conclusively demonstrates that the pACR1 plasmid readily carries the *glnA* structural gene. Moreover we have been able to subclone different chromosomal DNA fragments from pACR1 into the pBR322 cloning vehicle and to determine the direction of *glnA* transcription relative to a contiguous gene.

MATERIALS AND METHODS

(a) Bacterial strains

Bacterial strains used were MX705 (F^- *glnA20 proA2 leu-6 thi-1 lacY1 galK2 rpsL20 hsdS r_Bm_B*) (Covarrubias et al., 1980), MX742, a *recA56* derivative of MX705, and P678-54 (F^- *thr leu thi-1 supE lacY tonA gal mal xyl ara mtl min*) (Meagher et al., 1977). These are all derivatives of *E. coli* K-12.

(b) Enzymes and chemicals

The restriction endonucleases were purified by the procedure reported by Greene et al. (1978). T4 DNA ligase was purified according to the method described by Panet et al. (1973). [35 S]Methionine (800 Ci/mmol) was supplied by New England Nuclear. Chloramphenicol was obtained from Sigma Chemical Co. Other reagents used were of the highest purity available.

(c) Restriction digests and ligation conditions

Reaction conditions for the various restriction endonucleases and for the T4 DNA ligase have been described previously (Heyneker et al., 1976; Bolivar et al., 1977). The conditions for agarose gel electrophoresis have also been described (Bolivar et al., 1977).

(d) Transformation of *E. coli*

Plasmid DNA was purified as described by Betlach et al. (1976). *E. coli* cells were prepared for transformation by the procedure of Cohen et al. (1972); transformants were selected for Ap^R or Tc^R in Luria medium supplemented with 25 μ g/ml of either antibiotic and were subsequently screened for glutamine independence in NN minimal medium (Covarrubias et al., 1980).

(e) Gln synthetase activity

This was measured by the γ -glutamyl transferase assay of Shapiro and Stadtman (1970) as modified by Bender et al. (1977) and Covarrubias et al. (1980). Specific activities are given as μ mol of γ -glutamyl hydroxamate formed/min/mg of protein at 37°C. The protein content of cells or cell extracts was determined by the method of Lowry et al. (1951) using bovine albumin as a standard.

(f) Minicell purification

The minicell-producing strains were cultured and the minicells purified by a modification of the procedure of Roozen et al. (1971) as reported by Meagher et al. (1977). 2 ml of the suspension, previously adjusted to 0.2 absorbance at 620 nm, were then labeled with 50 μ Ci/ml of [35 S]methionine in the presence of 50 μ g/ml of each of the unlabeled amino acids. Radioactively labeled minicells were resuspended in 50 μ l of sample buffer (10% glycerol, 2.3% SDS, 0.0625 M Tris pH 6.8 and 5% β -mercaptoethanol) and boiled for 2–4 min before subjecting 15 μ l aliquots to electrophoresis on 11% SDS-polyacrylamide gels (Meagher et al., 1977).

(g) Immunoprecipitation procedures

Labeled minicells were resuspended in 100 μ l of 50 mM Tris pH 7.2 and lysed by sonication after a

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

treatment with lysozyme (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The suspension was centrifuged 60 min at 12 000 rev./min. The supernatant was immunoprecipitated following the procedure of Palacios et al. (1977) with minor modifications. Aliquots of the supernatant were incubated with 50 μl of anti-Gln synthetase. Incubation was for 120 min at 4°C in the presence of 3 μg of purified *E. coli* Gln synthetase, 2 mg/ml of bovine serum albumin, 0.5% sodium deoxycholate, 0.5% Triton X-100, 0.03 M NaCl, 2 mM Tris (pH 7.2) and 4 mM L-methionine in a final volume of 100 μl . The incubation mixture was then layered over discontinuous sucrose gradients prepared in microfuge tubes. The gradients contained 150 μl of 1.0 M sucrose and 50 μl of 0.5 M sucrose. Both sucrose solutions were prepared in a buffer containing Triton X-100, 5 g/l; sodium deoxycholate, 5 g/l; 0.15 M NaCl; 20 mM L-methionine and 10 mM Tris of pH 7.2. The gradients were centrifuged 5 min at 7000 rev./min, and the tubes were frozen in dry ice. The tips (containing the pellets) were processed for electrophoresis.

RESULTS

(a) Synthesis of the Gln synthetase monomer by minicells carrying pACR1

We previously reported the isolation from the Clarke-Carbon bank of a ColE1 recombinant plasmid which complemented two independent *glnA* auxotrophic mutations (Covarrubias et al., 1980). This plasmid, pACR1, has the size of about 10.6 Md, of which 6.4 Md correspond to the cloned chromosomal DNA fragment. The restriction map of pACR1 is shown in Fig. 1.

To prove that the *glnA* gene was present in the pACR1 plasmid, we examined the proteins synthesized by this plasmid in a minicells system. To this end, the minicell-producing strain P678-54 was transformed with either ColE1 or pACR1. Minicells were purified from cultures of the transformed cells and allowed to synthesize proteins in the presence of [^{35}S]methionine. The de novo synthesized plasmid-encoded proteins were electrophoresed on SDS-polyacrylamide gels and visualized by autoradiography. Fig. 2 shows that the pattern of proteins synthesized by minicells carrying the ColE1 plasmid resembles that reported

previously (Meagher et al., 1977), and that pACR1 codes for some additional proteins.

One of those pACR1-coded proteins comigrated with the purified Gln synthetase monomer (Fig. 2, lane a). Since the possibility existed that this protein did not correspond to the Gln synthetase monomer but to a truncated colicin E1 protein, the radioactively labeled minicell extracts were treated with rabbit anti-Gln synthetase γ -globulin fraction as described in MATERIALS AND METHODS. These antibodies specifically precipitated only the protein band from pACR1, which comigrated with the purified Gln synthetase monomer (Fig. 3, lanes c and d). No protein, which precipitated with antibodies against Gln synthetase, was present in the minicell extracts from the ColE1-carrying strain (Fig. 3, lanes a and b). This evidence conclusively demonstrated the presence of the *glnA* gene in pACR1.

(b) Subcloning of chromosomal DNA fragments derived from pACR1 into pBR322

To localize the relative position of the *glnA* gene in the chromosomal DNA fragment cloned in pACR1, different DNA segments generated with various restriction endonucleases were subcloned into the pBR322 plasmid. Fig. 1 shows the restriction maps of some of the relevant plasmids thus obtained. Endonuclease *SalI* cuts pACR1 at two sites, generating fragments of 3.1 and 7.5 Md. Plasmid pACR23 contained the smaller *SalI* fragment from pACR1. *PstI* cuts pACR1 at four sites. The 3.7 Md *PstI* fragment from pACR1 (coordinates 6.9–10.6 Md) was inserted into the *PstI* site of pBR322, thus generating plasmid pACR34. Both pACR23 and pACR34 complemented the *glnA20* mutation of MX742 to glutamine independence (Table I). These data allowed us to locate the *glnA* gene between the *PstI* and *SalI* restriction sites at positions 6.9 and 9.05 Md, respectively, in the pACR1 map.

A 3.6 Md fragment from pACR1 between coordinates 4.5 and 8.1 Md was cloned into pBR322 after complete digestion of both plasmids with a combination of *EcoRI* and *HindIII* endonucleases followed by ligation. The resulting plasmid, pACR41 (Fig. 1), did not complement either the *glnA20* or the *glnA21::Tn5* mutations. Therefore, it should not carry an intact *glnA* gene. These results indicate that the *glnA* gene should be located between the *EcoRI* site at 8.2 Md

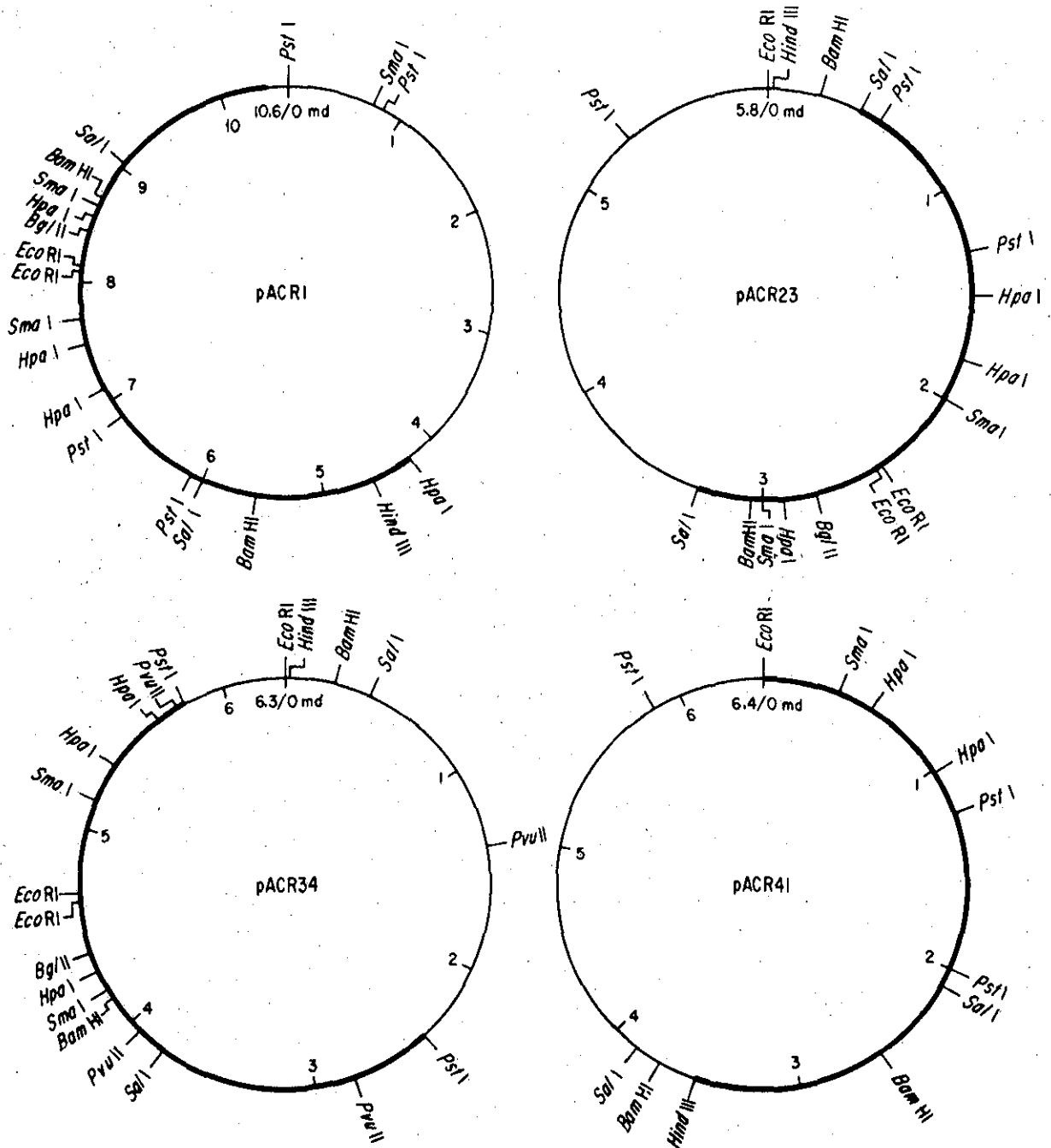


Fig. 1. Circular restriction maps of pACR1, pACR23, pACR34 and pACR41. The positions of the recognition sites for the various restriction endonucleases are drawn to scale on circular maps divided into units of 1 Md. The heavy lined regions of the four plasmids represent the *E. coli* chromosomal DNA fragments.

and the *SalI* site at 9.05 Md of pACR1. Alternatively, these data can also be explained if one or both *EcoRI* sites at positions 8.1 and 8.2 Md were in the *glnA* gene. To verify which of these two possibilities was correct, pACR23 was completely digested with

EcoRI and the largest generated fragment (which included the *EcoRI-SalI* fragment at coordinates 8.2 to 9.05 Md of pACR1) was recircularized. The new plasmid so obtained, pACR238 (data not shown), was unable to complement the *glnA20* mutation (Table I).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

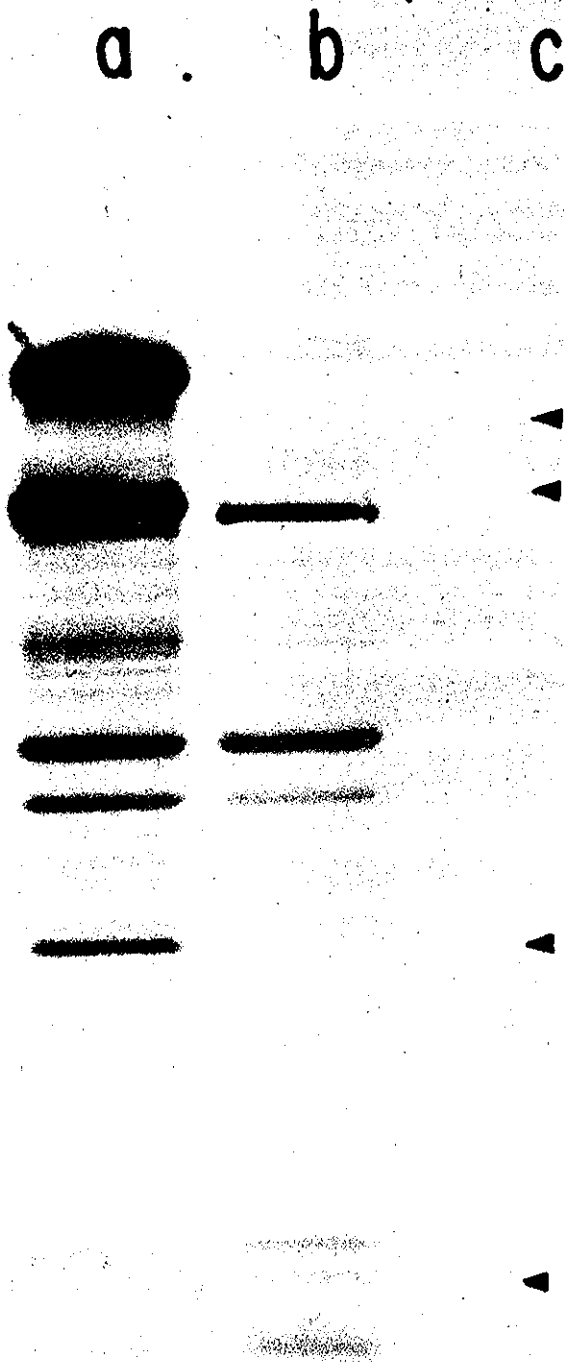


Fig. 2. Autoradiograph of proteins synthesized by minicells carrying pACR1 (lane a) or ColE1 (lane b). ^{35}S -labeled minicell extracts were electrophoresed on a 11% SDS-polyacrylamide gel. The arrowheads in lane c indicate the position of molecular weight markers in kilodaltons (from top to bottom: albumin, 64; Gln synthetase from *E. coli*, 53; chymotrypsinogen A, 23; myoglobin, 17.8).

Therefore, at least the *Eco*RI site localized at 8.2 Md in the pACR1 map should be located in the *glnA* gene.

(c) Gln synthetase activity determined by the hybrid plasmids

As can be seen in Table I, high values of Gln synthetase activity were obtained in MX742 cells carrying hybrid plasmids with an intact *glnA*⁺ gene (i.e. pACR1, pACR23 or pACR34). In all cases, however, the general pattern of repressibility by ammonium ions was conserved. Whereas the high specific activities determined by pACR1 and pACR34 can be attributed to the multicopy nature of the plasmids, the reason for the variability in the maximum values of Gln synthetase activity attained by MX742 cells carrying these two plasmids is not readily apparent. The low enzyme activity determined by pACR23 has been tentatively ascribed to *Sal*I cutting close to the *glnA* promoter region (see below).

(d) Synthesis of proteins by minicells carrying pBR322 hybrid plasmids

As expected for plasmids complementing *glnA* auxotrophic mutations, plasmids pACR23 and pACR34 promoted de novo synthesis of the Gln synthetase monomer in minicells. This was shown by the presence in extracts of minicells carrying these plasmids, of a protein band which comigrated with purified *E. coli* Gln synthetase (Fig. 4, lanes b and e). Most probably, this protein band corresponded to the protein of MW 53 000 which immunoprecipitated with anti-Gln synthetase antibodies (data not shown). Extracts from minicells carrying plasmids pBR322 or pACR41 did not show any detectable band which comigrated with the Gln synthetase monomer (Fig. 4, lanes a and c) or any protein which immunoprecipitated with anti-Gln synthetase.

In the electrophoretic patterns of proteins from minicells carrying pACR1 two strong bands were observed, in addition to the Gln synthetase polypeptide, which were not present in patterns of minicells carrying ColE1. These polypeptides had MWs of approx. 26 000 and approx. 65 000 (Fig. 2, lanes a and b).

Apparently, the gene coding for the 65 000 polypeptide could be interrupted at the *Pst*I site located at 6.9 Md of the pACR1 map, since minicells carrying pACR34 synthesized a polypeptide of MW 63 000

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

a b c d e



Fig. 3. Autoradiograph of immune precipitates with anti-Gln synthetase antibodies. ^{35}S -labeled extracts from minicells, containing either ColE1 (a and b, 0.5×10^5 cpm and 1×10^6 cpm, respectively) or pACR1 (c and d, 0.5×10^6 cpm and 1×10^6 cpm, respectively), were reacted with purified Gln synthetase antibodies. Immune precipitates were subjected to electrophoresis on a 11% SDS-polyacrylamide gel and autoradiographed. The arrowheads indicate the position of molecular weight markers as described in Fig. 2.

(Fig. 4, lane b), which probably corresponded to the 65 000 polypeptide shortened at its carboxyl end. This possibility was strengthened by the finding that an intact 65 000 polypeptide was also synthesized by minicells carrying either pACR23 or pACR41 (Fig. 4, lanes a and e).

The 26 000 polypeptide was not synthesized by minicells carrying either pACR23, pACR34 or pACR41. We ignore whether this polypeptide corresponds to a native *E. coli* protein, since it could represent the degradation product of a higher molecular weight protein codified by pACR1. Alternatively, it

could be the product of an *E. coli* gene, either intact or truncated, localized somewhere in the region between the *Hpa*I and the *Bam*HI sites at 4.2–5.5 Md of pACR1.

(e) Direction of *glnA* transcription

As previously mentioned, plasmid pACR238 carries a fragment at coordinates 8.2 to 9.05 of pACR1 and does not complement the *glnA*20 mutation (Table I). Presumably, this plasmid is missing an end of the *glnA* gene. We examined the proteins synthesized by

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLE I

Characteristics of the plasmids used in this study

Plasmids	MW	Relevant genotype ^a	Gln synthetase ^b	
			N excess	N limiting
pBR322	2.8×10^6	<i>tet</i> ⁺ <i>amp</i> ⁺	ND ^c	ND
pACR1	10.6×10^6	<i>glnA</i> ⁺ <i>col</i> ^{imm}	0.12	2.02
pACR23	5.8×10^6	<i>glnA</i> ⁺ <i>amp</i> ⁺ <i>tet</i> ⁻	0.08	1.33
pACR34	6.3×10^6	<i>glnA</i> ⁺ <i>amp</i> ⁻ <i>tet</i> ⁺	1.03	3.20
pACR41	6.4×10^4	<i>glnA</i> ⁻ <i>amp</i> ⁺ <i>tet</i> ⁻	ND	ND
pACR238	3.4×10^6	<i>glnA</i> ⁻ <i>amp</i> ⁺ <i>tet</i> ⁻	ND	ND
pACR341	5.0×10^6	<i>glnA</i> ⁻ <i>amp</i> ⁻ <i>tet</i> ⁺	ND	ND
pACR346	6.3×10^6	<i>glnA</i> ⁻ <i>amp</i> ⁻ <i>tet</i> ⁺	ND	ND

^a Genotypic symbols *tet*⁺ and *amp*⁺ are used to denote that a given plasmid carries the genes conferring Tc^R and Ap^R, respectively. *tet*⁻ and *amp*⁻ are used to indicate that a chromosomal fragment has been cloned in one of the restriction sites of either gene, thus converting it to the allelic state conferring Tc^S and Ap^S, respectively.

^b Gln synthetase activity was determined in MX742 cells transformed with each of the corresponding plasmids. Cells were grown to 100 Klett units on 0.2% glucose NN minimal medium plus to required supplements. N excess: 15 mM NH₄⁺; N limiting: 0.5 mM NH₄⁺. Gln synthetase specific activities of 0.09 in N excess and 1.03 in N limiting were obtained for the Gln⁺ parental strain RR1 from which MX705 and MX742 were derived (Covarrubias et al., 1980).

^c Gln synthetase was not determined (ND) in these cases since MX742 cells were not complemented to glutamine prototrophy by any of these plasmids.

pACR238 in the minicell system because there was a 50% probability that this plasmid should contain the *glnA* promoter as well as most of the gene, including that region encoding for the amino terminal portion of the Gln synthetase monomer. As can be seen in Fig. 5, lane b, plasmid pACR238 did not determine synthesis of an intact Gln synthetase monomer. Instead, a polypeptide of MW approx. 48 000 was made.

This result indicates that the *glnA* gene must be transcribed in the counterclockwise direction of the pACR1 map (Fig. 1). Therefore, the *EcoRI* site at position 8.2 Md in pACR1 should cut the *glnA* gene by about 135 base pairs thus leading to synthesis of a Gln synthetase monomer shorter than the wild-type monomer by about 45 aminoacids at its carboxyl end.

Two more plasmids were constructed whose characterization also supported the above conclusion. Plasmid pACR34 contains only one *BglII* restriction site and two substrate sites for *SmaI* (Fig. 1). Cleavage of pACR34 with *BglII* followed by S1 nuclease treatment and recircularization led to plasmid pACR346Δ (*BglII*). Cleavage of pACR34 with *SmaI* followed by ligation of the 5.3 Md fragment led

to plasmid pACR341, which only carried one *SmaI* site and consequently lacked the 0.85 Md *SmaI-SmaI* fragment of pACR1.

Plasmids pACR346 and pACR341 did not promote synthesis in minicells of a Gln synthetase comigrating protein. Instead, they determined synthesis of polypeptides of MWs of approx. 31 200 and approx. 32 200, respectively (Fig. 5, lanes d and e). These polypeptides did not end at the exact site of the deletions, but apparently ended up until the first nonsense codons were encountered by the translation machinery of the minicells. Such nonsense codons were probably generated by the shifts of phase in the reading frames created by the action of S1 nuclease in pACR346 or by deletion of the 0.85 Md *SmaI-SmaI* fragment in pACR341. From these results it is evident that the *BglII* and *SmaI* sites (at 8.45 and 8.55 Md, respectively, in pACR1) and very probably a *HpaI* site located between these two sites, also are in the *glnA* gene. According to these data, transcription of this gene is probably initiated after the *SaII* site at 9.05 Md towards the *EcoRI* site at 8.2 Md of pACR1 (Fig. 6). A summary of some relevant characteristics of the plasmids herein described is given in Table I and Fig. 6.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

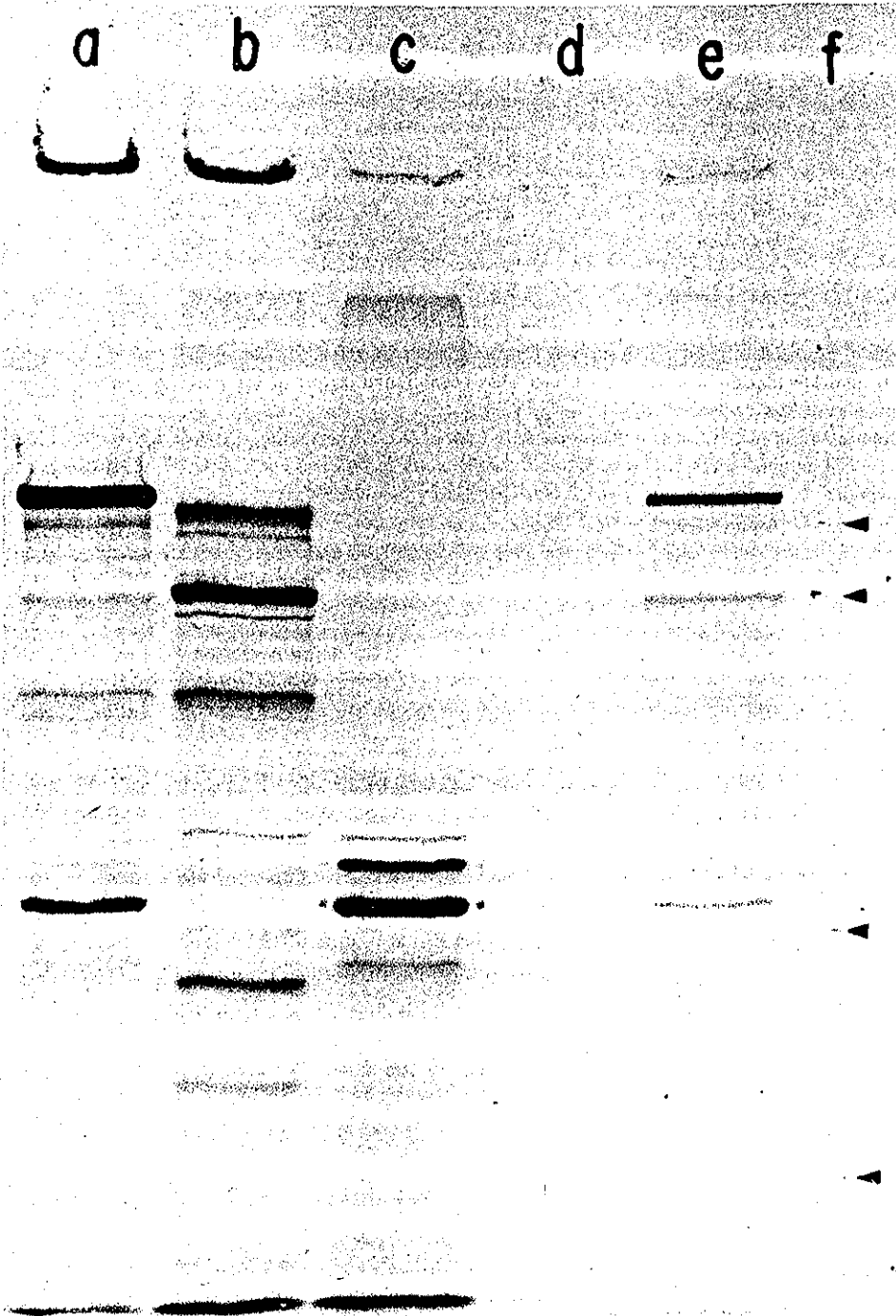


Fig. 4. Autoradiograph of a 11% SDS-polyacrylamide gel electropherogram of ^{35}S -labeled extracts from minicells carrying pACR41 (a), pACR34 (b), pBR322 (c) or pACR23 (e). Lane d shows a ^{35}S -labeled plasmid-free minicell extract. Arrowheads in lane f show the position of molecular weight markers as in Fig. 2.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

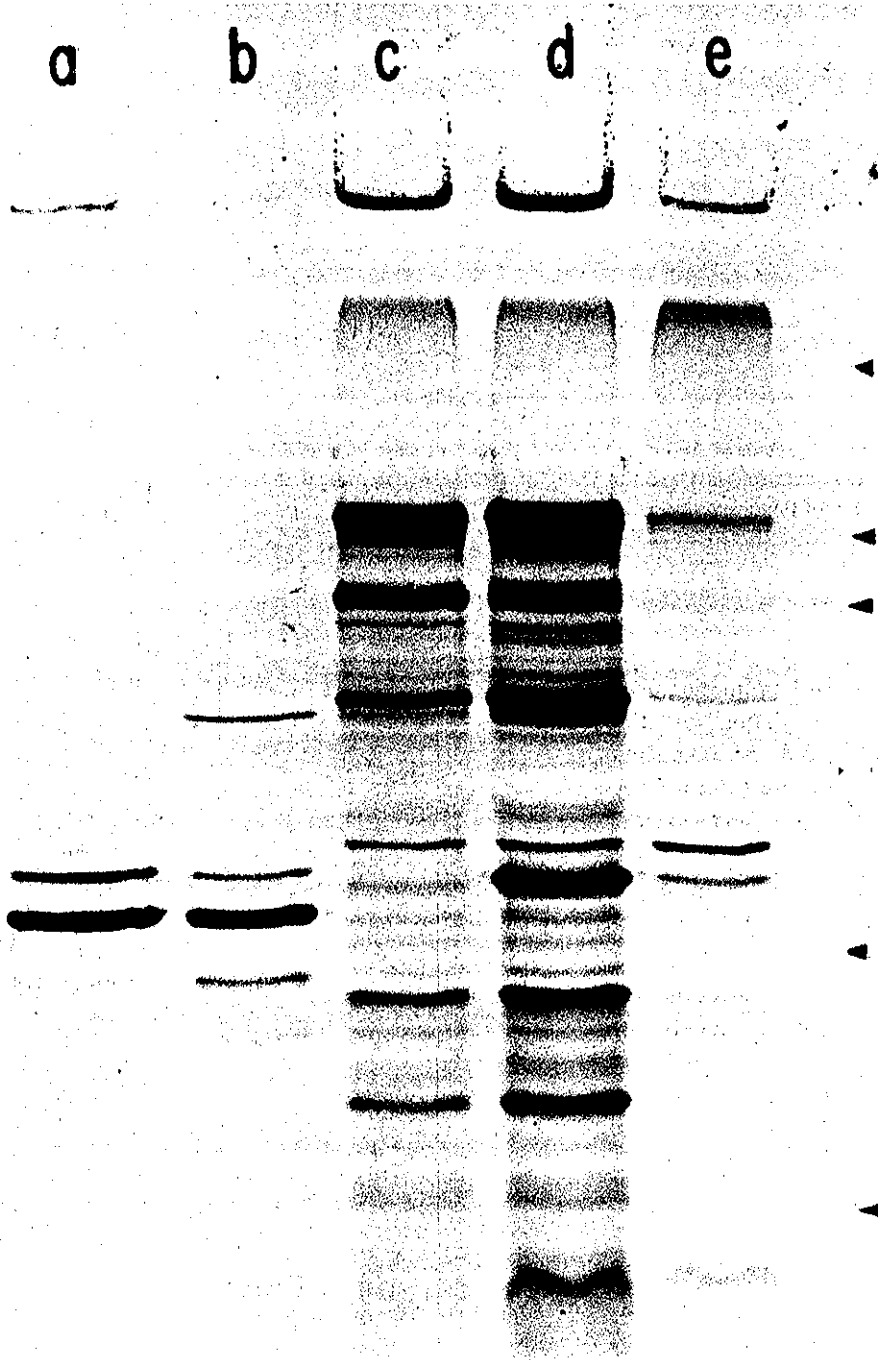


Fig. 5. Autoradiograph of 11% SDS-polyacrylamide gel electropherograms of ^{35}S -labeled extracts from minicells carrying plasmids (a) pBR322, (b) pACR238, (c) pACR34, (d) pACR341 or (e) pACR346. The arrowheads indicate the position of molecular weight markers in kilodaltons (from top to bottom the large *E. coli* glutamate synthetase subunit, 153; albumin, 64; Gln synthetase, 53; chymotrypsinogen, 25; myoglobin, 17.8).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

56

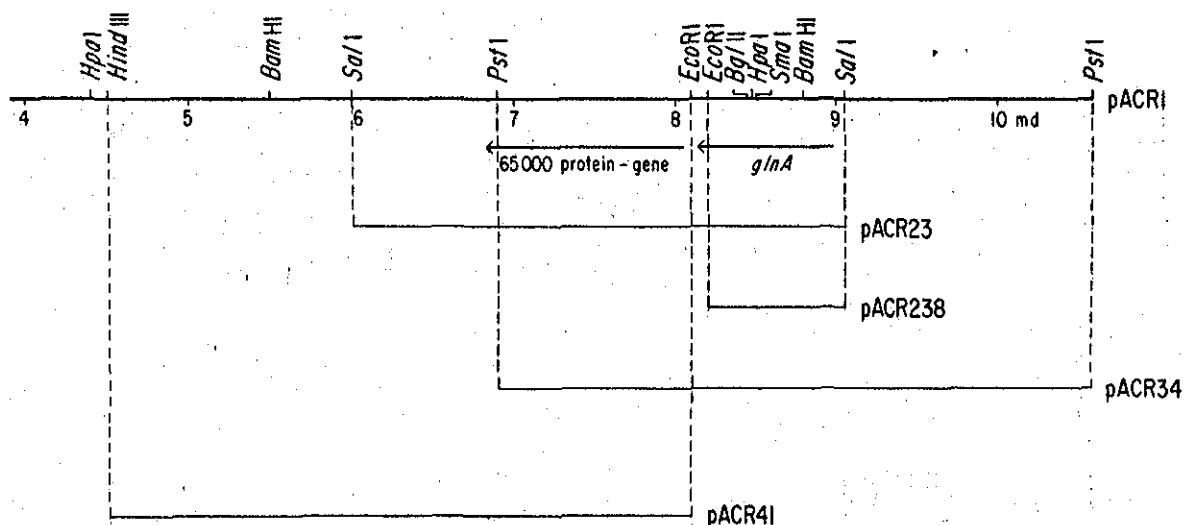


Fig. 6. Schematic representation of the segments of chromosomal DNA present in plasmids pACR1, pACR23, pACR238, pACR34 and pACR41. The position of genes coding for *glnA* and the 65 000 protein were determined as described in the text. The arrow indicates the direction of transcription of these genes.

(f) RNA polymerase binding

In an attempt to locate the *glnA* promoter, plasmid pACR34 was digested to completion with the restriction endonuclease *Hae*III, and the fragments were incubated with RNA polymerase (10 : 1 RNA polymerase/DNA molar ratio) at low ionic concentration (75 mM KCl). The RNA polymerase-DNA open complexes that were formed were trapped on nitrocellulose filters and analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis. The results showed that nine *Hae*III fragments were retained on nitrocellulose filters (Fig. 7A, lane a). Four of these fragments corresponded to filter-retainable pBR322 fragments. The Ap^R and Tc^R promoters were easily identified by comparing the molecular weights of each of the

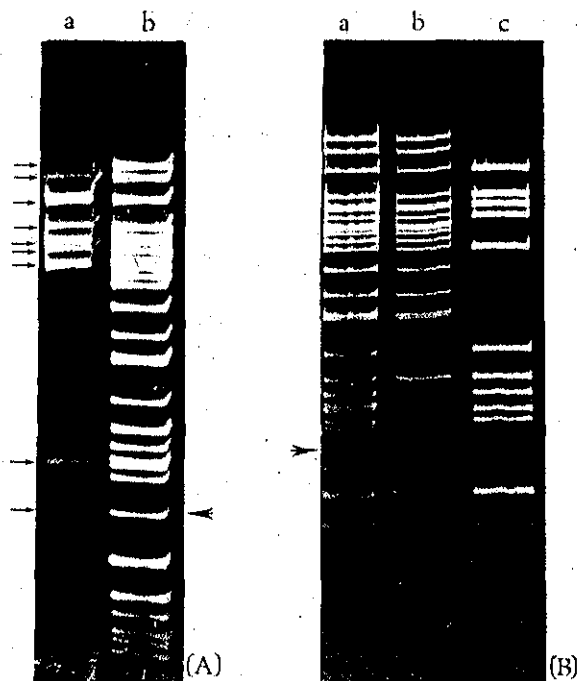


Fig. 7. RNA polymerase binding to *Hae*III-generated fragments of pACR34. In (A), lane a contains those DNA fragments from pACR34 that were retained on a nitrocellulose filter after digestion with *Hae*III and incubation with RNA polymerase as described by West and Rodriguez (1980). These fragments are indicated by the small arrows. Lane b shows a single *Hae*III digest of pACR34. In (B), lane a contains a *Hae*III-*Sal*I double digest of pACR34 while lane b and lane c contain a single *Hae*III digest of pACR34 and pBR322,

respectively. The smaller *Hae*III fragment (No. 9) bound to RNA polymerase in (A) lane a corresponds to the *Hae*III fragment No. 24 indicated by the arrowheads in (A) lane b and (B) lane b. As can be seen, in (B) lane a, *Sal*I cleaves the *Hae*III segment No. 18 (which arises from the gene conferring Tc^r in pACR34) which comigrates with fragment 19 as a single band, and the *Hae*III fragment No. 24 that arises from the cloned chromosomal DNA.

*Hae*III fragments from pACR34 with the *Hae*III restriction map of pBR322 (Fig. 7B, lane c) (Sutcliffe, 1978). The Ap^R promoter resides on the 0.39 Md *Hae*III fragment and the Tc^R promoter was located on a 0.13 Md *Hae*III fragment. The identities of the other two filter-retainable pBR322 fragments (0.36 Md and 0.30 Md) are not currently known (West and Rodriguez, 1980). Therefore, the five additional filter-retainable *Hae*III fragments from pACR34 must come from the *E. coli* chromosomal DNA present in this plasmid (Fig. 7A, lane a).

The experiments described in the preceding section suggested that *glnA* transcription is initiated near the *Sal*I site (at 9.05 Md in pACR1). Of the many DNA fragments obtained after *Hae*III digestion of pACR34, as expected, only two of them contained a *Sal*I restriction site (compare in Fig. 7B, lanes a and b), one arising from the Tc^r gene present in pBR322, and the other from the cloned chromosomal DNA. Only one of these two fragments (the one that carries the *Sal*I site located at 9.05 Md in pACR1) was able to bind RNA polymerase. These results suggest that this fragment contains a promoter, which possibly could be the *glnA* promoter, in agreement with the initiation of *glnA* gene transcription postulated above.

DISCUSSION

The evidence presented clearly demonstrates that the *glnA* gene of *E. coli*, which codes for the Gln synthetase enzyme, has been cloned on a 6.4 Md chromosomal fragment in the ColE1 hybrid plasmid, pACR1. Subcloning of DNA fragments from this chromosomal region with different restriction endonucleases into the pBR322 cloning vehicle have allowed us to further locate this gene within a 1.3 Md DNA segment between the *Sma*I and *Sal*I sites at positions 7.8 Md and 9.05 Md, respectively, in pACR1 (Fig. 1). One particular plasmid, pACR328, was prone to show that the *Eco*RI site at 8.2 Md of the pACR1 map cuts the *glnA* gene. Since the shortened Gln synthetase monomer made from pACR328 has a MW of 48 000 this *Eco*RI site should be located at the region encoding for the carboxyl terminus of the Gln synthetase monomer; consequently, the *glnA* gene should initiate its transcription near the *Sal*I site located at 9.05 Md. Also consistent with this conclu-

sion was the finding that restriction sites for endonucleases *Bgl*II and *Sma*I which lie between the above-mentioned *Sal*I and *Eco*RI sites of pACR1, were also within the *glnA* gene sequence. A deletion created by the action of S1 nuclease of this *Bgl*II site and a *Sma*I-*Sma*I deletion which eliminated a large part of the *glnA* gene including the end which encodes for the carboxyl terminus of the Gln synthetase protein, yielded plasmids pACR346 and pACR341, respectively. These two plasmids determined synthesis of polypeptides smaller than the Gln synthetase wild-type monomer.

A partial structural identity of the polypeptides determined by pACR238, pACR346 and pACR341 with the wild-type Gln synthetase monomer could not be established, particularly since the shortened polypeptides did not detectably cross react with anti-Gln synthetase antibodies.

The mRNA transcript of the shortened Gln synthetase made by pACR238 should start about 0.77 Md from the *Eco*RI site (8.2 Md in pACR1), i.e., close to the *Sal*I site (9.05 Md in pACR1). pACR23 carries the *Sal*I-*Sal*I fragment of pACR1 (6.0–9.05 Md) and concomitantly a functional *glnA*⁺ gene (Table I). The Gln synthetase activity determined by pACR23, however, was lower than that determined by pACR1 or pACR34 (Table I). Therefore, the possibility that this *Sal*I site (at 9.05 Md in pACR1) cuts close to the *glnA* promoter cannot be discarded. The tight RNA polymerase binding to a pACR34 *Hae*III fragment that carries this *Sal*I site (Fig. 7) supports the hypothesis that *glnA* transcription is probably initiated near this *Sal*I restriction site.

Of the two other proteins encoded by the *E. coli* chromosomal region cloned in pACR1, at least that of MW 65 000 seems to be of great interest. Plasmid pACR34 directs synthesis of a 63 000 polypeptide which very likely corresponds to the 65 000 protein shortened at its carboxyl end (Fig. 4, lane b). If this is the case, its transcription should start between the *Sma*I and *Eco*RI sites at 7.8 and 8.1 Md in pACR1. These results suggest that the *glnA* gene and that coding for the 65 000 protein are contiguous, both having the same direction of transcription.

The role of the 65 000 protein product in nitrogen metabolism in general or in Gln synthetase synthesis in particular, if any, remains unknown. The *glnG* gene, whose product in conjunction with the *glnF* product acts as a positive regulator of the *glnA* gene, has been

previously mapped closely linked to *glnA* (Kustu et al., 1979; Pahel and Tyler, 1979). A possible relationship between the *glnG* product and the 65 000 protein coded for by the gene contiguous to *glnA*, remains to be investigated. Experiments are now in progress to determine the relative orientation of these two genes in the *E. coli* chromosome. Previous experiments by Weglenski and Tyler (1977), however, suggest that in *Klebsiella aerogenes glnA* transcription is initiated at the *rha* proximal end of the gene.

In order to get an insight into the molecular basis of the expression of the *glnA* gene and its regulation by the *glnG* and *glnF* products, it will be necessary to study the interaction of such proteins with the promoter-operator region of the *glnA* gene and its mutant alleles. The availability of the plasmids reported here will facilitate the purification of specific DNA fragments carrying the *glnA* gene as well as its controlling DNA sequences.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge the collaboration and kind hospitality of Dr. R. Rodriguez in whose laboratory the RNA polymerase-binding experiments were carried out. We also wish to thank Irma Vichido for her technical help. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México) Grants PNCB1649 and PNCB1650.

REFERENCES

Bachmann, B.J. and Low, K.B.: Recalibrated linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 6. *Microbiol. Rev.* 44 (1980) 1-56.

Bender, R.A. and Magasanik, B.: Regulatory mutants in the *Klebsiella aerogenes* structural gene for glutamine synthetase. *J. Bacteriol.* 132 (1977) 100-105.

Bender, R.A., Janssen, K.A., Resnick, A.D., Blumenberg, M., Foor, F. and Magasanik, B.: Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* 129 (1977) 1001-1009.

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

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Betlach, M.C. and Boyer, H.W.: Construction and characterization of new cloning vehicles: I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene* 2 (1977) 75-93.

Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. and Hsu, L.: Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69 (1972) 2110-2114.

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

Ginsburg, A. and Stadtman, E.R.: Regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*, Prusiner, S. and Stadtman, E.R. (Eds.), *The Enzymes of Glutamine Metabolism*. Academic Press, New York, 1973, pp. 9-43.

Greene, P.J., Heyneker, H.L., Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Betlach, M.C., Covarrubias, A.A., Backman, K., Russel, D.J., Tait, R. and Boyer, H.W.: A general method for the purification of restriction enzymes. *Nucl. Acids Res.* 5 (1978) 2373-2380.

Heyneker, H.L., Shine, J., Goodman, H.M., Boyer, H.W., Rosenberg, J., Dickerson, R.E., Narang, S.A., Itakura, K., Liu, S. and Riggs, A.D.: Synthetic *lac* operator is functional in vivo. *Nature* 263 (1976) 752-847.

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

Kustu, S.G., McFarland, N.C., Hui, S.P., Esmon, B. and Ames, G.F.: Nitrogen control in *Salmonella typhimurium*: co-regulation of synthesis of glutamine synthetase and amino acid transport systems. *J. Bacteriol.* 138 (1979b) 218-234.

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

Magasanik, B.: Regulation of bacterial nitrogen assimilation by glutamine synthetase. *Trends Biochem. Sci.* 2 (1977) 9-12.

Meagher, R.B., Tait, R.C., Betlach, M. and Boyer, H.W.: Protein expression in *E. coli* minicells by recombinant plasmids. *Cell* 10 (1977) 521-536.

Meers, J.L., Tempest, D.W. and Brown, C.M.: "Glutamine (amide): 2-oxoglutarate amino transferase oxido-reductase (NADP)" an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 64 (1970) 187-192.

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

Palacios, R., Campomanes, M. and Quinto, C.: *Neurospora crassa* glutamine synthetase. *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 3028-3034.

Panet, A., Van de Sande, J.H., Loewen, P.C., Khorana, H.G., Raae, A.J., Lillehaug, J.R. and Kleppe, K.: Physical characterization and simultaneous purification of bacteriophage T4 induced kinase, polynucleotide ligase and

- deoxyribonucleic acid polymerase. *Biochemistry* 12 (1973) 5045-5050.
- Roozen, K.J., Fenwick, R.G. and Curtiss, R. III: Synthesis of ribonucleic acid and protein in plasmid containing minicells of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 107 (1971) 21-33.
- Shapiro, B.M. and Stadtman, E.R.: Glutamine synthetase (*Escherichia coli*), in Tabor, H. and Tabor, C.W. (Eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. 17A, Academic Press, New York, pp. 910-922.
- Sutcliffe, J.G.: pBR322 restriction map derived from the DNA sequence: accurate DNA size markers up to 4361 nucleotide pairs long. *Nucl. Acids Res.* 5 (1978) 2721-2728.
- Tyler, B.: Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Annu. Rev. Biochem.* 47 (1978) 1127-1162.
- Tyler, B., Bloom, F. and Pahel, G.: Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli*. in Mora, J., Palacios, R., Mcister, A. and Cohen, P.P. (Eds.), *Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation*. Academic Press, New York, 1980, in press.
- Weglenski, P. and Tyler, B.: Regulation of *glnA* messenger ribonucleic acid synthesis in *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* 129 (1977) 880-887.
- West Jr., R.W. and Rodriguez, R.L.: Construction and characterization of *E. coli* promoter-probe plasmid vectors, II. RNA polymerase binding sites on antibiotic-resistance promoters, *Gene* 9 (1980) 175-193.

Communicated by W. Szybalski.

CARACTERIZACION DE LA REGION glnA-glnG DE Escherichia
coli K12.

Mario Rocha, Fernando Bastarrachea y Alejandra A. Covarrubias.

Departamento de Biología Molecular
Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.
Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, D.F.
04510 México, D.F., MEXICO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN.

La regulación de la expresión del gene estructural para glutamino sintetasa, glnA, es un sistema modelo para el estudio del control de la expresión genética. La máxima expresión de glnA requiere de un complejo activador, probablemente, constituida de tres proteínas reguladoras; por otro lado, una disminución en la expresión de glnA es llevada a cabo por otro complejo, en este caso, represor, el cual está constituido por dos proteínas. A partir de un banco de genes provenientes del génoma total de Escherichia coli K12 hemos aislado un plásmido híbrido el cual contiene el gene estructural para glutamino sintetasa, glnA, así como dos de los genes reguladores, glnL y glnG. Cada uno de estos genes han sido localizados en la región de ADN clonada, tanto por métodos físicos como genéticos determinándose también su dirección de transcripción.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCION:

La enzima glutamino sintetasa (G.S.), la cual juega un papel importante en el metabolismo nitrogenado de enterobacterias, se puede regular a varios niveles (1,2), la actividad biosintética de GS es controlado por un sistema enzimático complejo que adenila de manera reversible cada una de las 12 subunidades de esta proteína. Es posible hacer una correlación entre la actividad enzimática y el estado de adenilación de la enzima, esto es, cuando el estado de adenilación es bajo entonces la actividad enzimática es elevada y, viceversa. El aminoácido glutamina estimula la reacción de adenilación, y 2-cetoglutarato la inhibe, sin embargo, éste último estimula la reacción de desadenilación, de tal manera que la concentración de estos dos metabolitos determina el estado de adenilación de G.S. (3,4). Por otro lado, la disponibilidad de nitrógeno en la célula también influye en la síntesis de GS, ya que cuando el amonio está en exceso en el medio de cultivo la síntesis de GS está reprimida, en cambio cuando el amonio está presente en bajas concentraciones los niveles de GS son altos (5,6).

Se han identificado varios genes cuyos productos pare

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

cen estar involucrados en la expresión del gene estructural para GS, glnA. Además del gene glnF, que se localiza en el minuto 72 en el cromosoma de E. coli, recientemente se han identificado dos genes más glnL y glnG que están muy ligado a glnA (min 85) (7,8). Kustu et al (7) y McFarland et al (9) han propuesto que el producto de glnF convierte al producto de glnG en una forma con carácter de regulador positivo, además, el producto de glnL puede interaccionar también con el producto de glnG y formar un complejo el cual parece ser requerido para la regulación negativa de la expresión de glnA. Foor et al (10) ha sugerido que la proteína P_{II}, involucrada en el sistema de adenilación-desadenilación, también tiene una función en este sistema regulatorio. Es importante mencionar que hay evidencia que sugiere que los productos de los genes arriba mencionados no solo se restringen al control de glnA, sino que también están involucrados en la regulación de la expresión de otros operones y genes cuyos productos son responsables de la utilización de ciertos compuestos nitrogenados (7,8). Un gran número de preguntas relacionadas con el mecanismo molecular de estos controles se hacen evidentes dada la complejidad de la regulación de la expresión de glnA, así como la de la utilización del nitrógeno.

Con el objetivo de llevar a cabo estudios relacionados

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

con el control molecular de GS hemos clonado la región de DNA la cual contiene el gene glnA de Escherichia coli K12 (11,12). Aquí se presenta evidencia que demuestra que el fragmento de DNA clonado contiene, además, el gene glnG y muy probablemente el gene glnL.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIALES Y METODOS:

Cepas bacterianas y plásmidos.

Las cepas bacterianas usadas en este trabajo se muestran en la Tabla 1. Los plásmidos utilizados fueron pBR322 y pBR327, los cuales ya han sido descritos (13,14).

Enzimas y químicos.

La mayor parte de las endonucleasas de restricción utilizadas fueron purificadas por el método reportado por Greene, et al (17). Algunas enzimas de restricción como SmaI y PvuII fueron obtenidas de Bethesda Research Laboratories (BRL). La endonucleasa ClaI se obtuvo de Boehringer Mannheim. La ligasa de ADN proveniente del bacteriófago T4 se purificó de acuerdo al método descrito por Panet et al (18). $[^3\text{S}]$ -metionina (800 Ci/mmol) se obtuvo de New England Nuclear. Otros reactivos utilizados fueron obtenidos de Sigma Chemical Co.

Condiciones para reacciones con enzimas de restricción o con ligasa de ADN.

Las condiciones para las diferentes enzimas de res-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

tricción y para la ligasa de ADN han sido descritas anteriormente (13,14,19).

Condiciones para electroforesis.

Las condiciones para electroforesis de ADN en gel de agarosa o acrilamida ya han sido descritas (13,14). La electroforesis de proteínas en geles de acrilamida-SDS se llevaron a cabo de acuerdo a Laemmli (20).

Transformación de E. coli.

El DNA de plásmido se purificó de acuerdo a Betlach et al (21). Las células de E. coli se prepararon para transformación por el procedimiento reportado por Cohen et al (22) seleccionándose las transformantes para Ap^R ó Tc^R en medio Luria adicionado con antibióticos (ampicilina o tetraciclina) a una concentración final de 25 $\mu\text{g/ml}$. Aquellas células transformantes Ap^R o Tc^R fueron probadas para crecimiento en medio mínimo NN (11) sin glutamina o con arginina como fuente de nitrógeno, según el caso.

Determinación de la actividad de glutamino sintetasa.

La actividad de GS se midió por el ensayo de γ -glutamil transferasa reportado por Shapiro y Stadtman (23) y modificado por Bender et al (24) y Covarrubias et al (11). Las actividades específicas se dan en μmol de γ -glutamil

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

hidroxamato formada/min/mg de proteína a 37°C. El contenido de proteínas de células o de extractos de células se determinó por el método de Lowry et al (25) usando albúmina sérica bovina como estándar.

Purificación de minicélulas.

La cepa productora de minicélulas se creció hasta fase estacionaria y se purificaron las minicélulas por el procedimiento reportado por Meagher et al (26). La suspensión de minicélulas purificadas se ajusta a una absorbancia de 0.2 a 620 nm y, 2 ml de ésta suspensión se marcan con 50 μ Ci/ml de $\{^{35}\text{S}\}$ -metionina en presencia de 50 μ g/ml de cada uno de los aminoácidos no marcados. Las minicélulas marcadas radioactivamente se resuspendieron en 50 μ l de buffer S (10% glicerol, 2.3% SDS, 0.0625 M Tris pH 6.8 y 5% β -mercaptoctanol) y se hirvieron durante 2.4 min antes de someter, una alícuota de 15 μ l, a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

RESULTADOS

Construcción de pACR2.

Se han aislado dos plásmidos híbridos los cuales contienen la región glnA-glnG de E. coli K12, pACR1 y pACR2; el aislamiento y caracterización del primero de ellos ya han sido reportados (11,12). El segundo de estos plásmidos, pACR2, fue construido a partir del ADN de un fago λ transductante el cual contiene la región glnA-glnG de E. coli, y que fue generosamente regalado por la Dra. S. Kustu. El ADN del fago λ transductante fue digerido con la endonucleasa de restricción HindIII y los fragmentos de restricción producidos fueron ligados con la ligasa de ADN al vehículo molecular pBR327, previamente digerido con HindIII. La mezcla de ligasa se usó para transformar la cepa RRI (glnA⁺, Tabla 1) y, se seleccionaron aquellas transformantes Ap^R que crecían lento en medio NN más amonio, como única fuente de nitrógeno. El racional de haber usado este último método para seleccionar plásmidos que contuvieran además de glnA, los genes glnL y glnG está basado en la posible función de los productos de estos genes como complejo represor de la síntesis de GS. Posteriormente se purificó ADN de plásmido de aquellas

transformantes Ap^R y de crecimiento lento en medio mínimo con amonio como fuente de nitrógeno, con el fin de demostrar que el plásmido híbrido aislado era el responsable de este fenotipo en la cepa receptora. Por análisis de restricción del ADN de plásmido se demostró que todos los plásmidos contenidos en las transformantes seleccionadas llevaban el mismo fragmento de HindIII, por lo tanto, se seleccionó uno de ellos al que se denominó pACR2. El patrón de restricción obtenido con diferentes enzimas de restricción demostró una gran similitud con el patrón obtenido para pACR1 como se muestra en la figura 1. El fragmento de HindIII clonado tiene un peso molecular de aproximadamente de 7.0 md, siendo el peso molecular total de este plásmido de aproximadamente 9.2 md. La diferencia entre este fragmento de HindIII y el clonado en pACR1 comprende solo los extremos, de acuerdo al patrón de restricción.

Por otro lado, se determinó la actividad específica de GS en la cepa RRI/pACR2, siendo la actividad obtenida de aproximadamente 2.5 veces la de la cepa RRI sin plásmido, y encontrándose regulada en las diferentes condiciones de crecimiento.

Localización del gene glnG

Datos genéticos sugieren que glnG es un gene localizado muy cerca de glnA, por lo tanto, era muy posible que glnG

estuviera contenido en el fragmento de ADN cromosomal clonado tanto en pACR1 como pACR2. Ambos plásmidos fueron introducidos en la cepa MX902 (glnG::Tn5, Tabla 1) por transformación. La cepa MX902, derivada de la MX614, fue aislada como glnG⁻ por inserción del transposón Tn5, ya que presentaba el fenotipo Reg⁻ (no utilización de arginina como única fuente de nitrógeno) y sus actividades de GS eran bajas en las diferentes fuentes de nitrógeno (Tabla 3)). Hibridaciones tipo Southern confirman la localización del Tn5 en glnG. Ambos plásmidos confieren a la cepa mutante la capacidad de crecer en arginina como única fuente de nitrógeno; sin embargo, MX902/pACR2 tiene un lag de aproximadamente 12 hrs, después del cual crece con una cinética igual que MX902/pACR1. En ambas cepas las actividades de GS se encuentran reguladas, siendo elevadas cuando arginina (0.2%) se usa como fuente de nitrógeno, y observándose una baja en exceso de amonio (15 mM). Puesto que la mutación en glnG de la MX902 es complementada positivamente tanto por pACR1 como pACR2 es posible concluir que ambos plásmidos contienen glnG. Es importante mencionar que este tipo de complementaciones se llevaron a cabo con los plásmidos pACR23 y pACR34, ambos derivados de pACR1 (12, Fig. 1), siendo el pACR23 incapaz de complementar la mutación en glnG de la MX902, a diferencia del pACR34 el cual se comporta igual que el plásmido padre, pACR1. Esto sugería que glnG se encuen-

tra localizado en el fragmento de 2.0 md de SalI-HinIII del pACR2, ó bien, en el fragmento de 1.55 md de SalI-PstI de pACR1.

Con el fin de afinar la localización de glnG en esta región de ADN, se subclonó al fragmento de ClaI-HinIII de pACR2. La estrategia seguida fue la siguiente: el plásmido pACR2 fue digerido con ClaI, se purificó el fragmento mayor que contiene el origen de replicación y el gene que confiere resistencia a ampicilina, además de la región de ADN cromosomal deseada, y se ligó en presencia de ligasa de ADN, en condiciones tales que favorecieran la recirculación del fragmento. La cepa MX902 fue transformada con la mezcla de ligasa y se seleccionaron aquellas células Ap^R y capaces de crecer en arginina como única fuente de nitrógeno. El plásmido contenido en éstas células se denominó pACR3 (Fig. 1). Con el objeto de aislar una deleción parcial de glnG en el plásmido, que nos ayudara a localizar el gene y a identificar su producto, el pACR3 fue digerido con HinIII, tratado con exonucleasa BAL31 y posteriormente ligado con ligasa de ADN. El nuevo plásmido construido, pACR7, incapaz de complementar la mutación en glnG de la cepa MX902, tiene un peso molecular de 2.9 md, lo que significa una deleción de aproximadamente 2.1 md del pACR3, cuyo peso molecular es de 5.0 md (Fig. 1).

Identificación del producto de glnG.

Con el fin de identificar el producto de glnG y afinar su localización, la cepa productora de minicélulas P678-54 fue transformada con los plásmidos pACR1, pACR2, pACR3, pBR327 y Cole1. Se purificaron minicélulas de cultivos en fase estacionaria de cada una de las transformantes de P678-54, y se dejó que sintetizaran proteínas en presencia de [³⁵S]-metionina. Las minicélulas se lisaron con SDS y las proteínas fueron separadas electroforéticamente en un gel de poliacrilamida-SDS. Las proteínas marcadas con [³⁵S] fueron identificadas por autorradiografía. Los resultados de estos experimentos (Fig. 2) muestran que minicélulas que llevan pACR2 (carril b) sintetizan, al igual que pACR1 (carril c) los siguientes polipéptidos: uno de 68,000 d, otro de 53,000 d el cual corresponde al monómero de GS, como ya se había demostrado antes (11), y otro de 51,000 d. El resto de las bandas que se observan en la autorradiografía correspondiente a los extractos de P678-54/pACR2 (carril 6), entre ellas dos muy densamente marcadas, corresponden a polipéptidos codificados en el vehículo molecular pBR327 (carril a) y a productos de degradación principalmente del polipéptido de 68,000 d. En el caso de los extractos de minicélulas conteniendo pACR3 (Fig. 3, carril b), se puede observar que no aparecen el polipéptido de 68,000 d ni el polipéptido de 53,000 d correspondiente a GS; sin embargo el poli-

péptido de 51,000 d sigue presente, pero esta vez aparece con una intensidad mayor. Este polipéptido de 51,000 d ya no es codificado por el derivado de pACR3, el plásmido pACR7, apareciendo en su lugar un polipéptido de aproximadamente 41,000 d (carril d). Estos resultados indican que el polipéptido de 51,000 d, corresponde al producto de glnG, ya que es este polipéptido el que disminuye de tamaño en el plásmido pACR7 el cual es incapaz de complementar la mutación en glnG de la cepa MX902. Además, el hecho de haber obtenido un polipéptido más pequeño en el caso de pACR7 nos permitió determinar la dirección de transcripción para glnG, como se indica en la Fig. 1. A su vez, el peso molecular de este polipéptido ha permitido localizar el gene con gran exactitud.

DISCUSION:

En este trabajo se demuestra que los plásmidos pACR1 y pACR2 contienen, además de glnA, el gene regulador glnG. Datos genéticos reportados por McFarland, et al (9) indican que glnL, otro de los gene reguladores, se encuentra localizado entre glnA y glnG, lo cual sugiere que muy probablemente glnL también esté contenido en estos plásmidos. Otro dato que apoya lo antes dicho, se refiere al hecho de que las actividades de GS obtenidas en las cepas que contienen tanto pACR1 como pACR2 se encuentran reguladas de la misma manera que en la cepa silvestre.

Los resultados obtenidos en los experimentos de complementación con los diferentes plásmidos, y en los experimentos realizados en minicélulas indican que glnG está localizado a aproximadamente 1 200 pb de glnA como se indica en la Figura 1. Por otro lado, el hecho de que pACR7 codifique para un polipéptido más pequeño (41K) que el producto original (51K) sugiere que la dirección de transcripción para glnG tiene el mismo sentido que la obtenida para glnA (Figura 1). Es importante hacer notar que muy probablemente glnG se transcribe a partir de un promotor propio y no del promotor de glnA, ya que el pACR3 por sí sólo es capaz de

complementar totalmente la mutación en glnG de la cepa MX902, así como de codificar para el producto de glnG intacto. Esto descartaría la posibilidad de que estos tres genes, glnA, glnL y glnG, estuvieran formando parte de un operón. Se han llevado a cabo estudios de unión de ADN a ARN polimerasa que confirman la presencia de un probable promotor para glnG.

Una observación interesante es que la cantidad del polipéptido correspondiente al producto de glnG que se sintetiza en minicélulas con pACR3 es aproximadamente cinco veces mayor que la cantidad sintetizada en minicélulas conteniendo pACR2, lo que sugiere una posible regulación sobre la expresión de glnG por GS, o bien, por glutamina. Actualmente se están llevando a cabo experimentos tendientes a aclarar este fenómeno.

La identificación del producto de glnG reviste gran importancia para el avance de este trabajo, ya que esto permitirá en un futuro su purificación y caracterización fisicoquímica, así como la identificación de su sitio de unión en la región regulatoria de glnA, y un conocimiento más profundo sobre su función en éste y otros sistemas.

Por lo que se refiere a la diferencia de comportamientos de las cepas MX902/pACR2 y MX902/pACR1 cuando se crecen en

un medio con arginina como única fuente de nitrógeno (MX902/pACR2 tiene un lag de aproximadamente 12 hrs, cosa que no ocurre con MX902/pACR1), nos indica que pACR2 y pACR1 son diferentes en lo que se refiere a su contenido genético relacionado con metabolismo nitrogenado; sin embargo hasta ahora no tenemos ninguna explicación que nos satisfaga.

La caracterización de la región glnA-glnG de estos plásmidos nos permitirá en un futuro definir estrategias para contestar una serie de preguntas sobre la regulación de la expresión de estos genes. En la actualidad se llevan a cabo experimentos enfocados a conocer la estructura de la región regulatoria tanto de glnA como glnL y glnG, y también se pretende tener un sistema in vitro de transcripción y traducción acopladas que nos permita definir la función de cada uno de sus productos.

R E F E R E N C I A S .

1. Ginsburg, A. y Stadtman, E.R., The Enzymes of Glutamine Metabolism, Academic Press, New York, 1973, pp. 9-43.
2. Wohlhueter, R.M., Schutt, H., Holzer, H., The Enzymes of Glutamine Metabolism, Academic Press, New York, 1973, pp. 45-61.
3. Tyler, B., Regulation of the assimilation of nitrogen compounds, Ann. Rev. Biochem. 47: 1127-1162, 1978.
4. Senior, P.J., Regulation of nitrogen metabolism in Escherichia coli and Klebsiella aerogenes: Studies with the continuous culture technique, J. Bacteriol. 123: 407-418, 1975.
5. Woolfolk, C.A., Shapiro, B.M. y Stadtman, E.R., Regulation of glutamine synthetase I. Purification and properties of glutamine synthetase from Escherichia coli, Arch. Biochem. Biophys. 116: 177-192, 1966.
6. Bender, R.A. y Magasanik, B., Regulatory mutants in the Klebsiella aerogenes structural gene for glutamine synthetase, J. Bacteriol. 132: 100-105, 1977.
7. Kustu, S., Burton, D., García, E., McCarter, L. y McFarland, N., Nitrogen control en Salmonella: Regulation by the glnR and glnF gene products, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4576-4580, 1979.
8. Pahel, G. y Tyler, B., A new glnA-linked regulatory gene for glutamine synthetase in Escherichia coli, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 4544-4548, 1979.
9. McFarland, N., McCarter, L., Artz, S., y Kustu, S., 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, 1981.
10. Foor, F., Réwveny, Z., y Magasanik, B., Regulation of the synthesis of glutamine synthetase by the P^{II} protein in Klebsiella aerogenes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 2636-2640, 1980.

- 11.- Covarrubias, A.A., Sánchez-Pescador, R., Osorio, A., Bolivar, F., y Bastarrachea, F., ColE1 hybrid plasmids containing Escherichia coli genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine, Plasmid 3: 150-164, 1980.
12. Covarrubias, A.A., Rocha, M., Bolivar, F., y Bastarrachea F., Cloning and physical mapping of the glnA gene of Escherichia coli K12. Gene 11: 239-251, 1981.
13. Bolivar, F., Rodríguez, R.L., Betlach, M.C., y Boyer, H.W., Construction and characterization of new cloning vehicles I: Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9, Gene 2: 75-93, 1977.
14. Soberón, X., Covarrubias, L., y Bolivar, F., Construction and characterization of new cloning vehicles. IV: Deletion derivatives of pBR322 and pBR325, Gene 9: 287-305, 1980.
15. Bastarrachea, F., Brom, S., Covarrubias, A.A., Osorio, A., Bolivar, F., Genetic characterization of mutations affecting glutamine biosynthesis and its regulation in Escherichia coli K12. En: Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation, Academic Press, New York, 1980, pp. 107-121.
16. Osorio, A., Servin, L., Covarrubias, A.A., y Bastarrachea, F., Cis-dominant mutations of Escherichia coli conferring independence of actuation by the glnG or glnF products for glnA expression. Artículo en preparación, 1981.
17. Greene, P.J., Heyneker, H.L., Bolivar, F., Rodríguez, R.L., Betlach, M.C., Covarrubias, A.A., Backman, K., Russell, D.J., Tait, R., and Boyer, H.W., A general method for the purification of restriction enzymes. Nucl. Acids Res., 5: 2373-2380, 1978.
18. Panet, A., Van de Sande, J.H., Loewen, P.C., Khovana, H.G., Raae, A.J., Lillehang, J.R., and Kleppe, K., Physical characterization and simultaneous purification of bacteriophage T4 induced kinase, polynucleotide ligase and deoxyribonucleic acid polymerase. Biochemistry 12: 5045-5050, 1973
19. Heyneker, H.L., Shine, J., Goodman, H.M., Boyer, H.W., Rosenberg, J., Dickerson, R.E., Narang, S.A., Itakura, K., Liu, S., and Riggs, A.O., Synthetic lac operator is functional in vivo. Nature 263: 752-847, 1976

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

20. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* (London) 227: 680-685, 1970.
21. Betlach, M.C., Hershfield, V., Chow, L., Brown, N., Goodman, H.M., and Boyer, H.W., A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the EcoRI restriction and modification of DNA., *Fed. Proc.* 35: 2037-2043, 1976.
22. Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., and Hsu, L., Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69: 2110-2114, 1972.
23. Shapiro, B.M., and Stadtman, E.R., Methods in Enzymology, Academic Press, New York, 1970, pp. 910-922.
24. Bender, R.A., Janssen, K.A., Resnik, A.D., Blumenberg, M., Foor, F., and Magasanik, B., Biochemical parameters of glutamine synthetase from Klebsiella aerogenes, *J. Bacteriol.* 129: 1001-1009, 1977.
25. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
26. Meagher, R.B., Tait, R.C., Betlach, M., and Boyer, H.W., Protein expression in E. coli minicells by recombinant plasmids, *Cell* 10: 521-536, 1977.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 1

LISTA DE CEPAS BACTERIANAS.

Cepa	Genotipo	Origen o, referencia
ERRI	F ⁻ <u>proA</u> <u>leu-6</u> <u>thi-1</u> <u>lacY1</u>	
	<u>galk2</u> <u>rpsL20</u> <u>hsdS</u> <u>r_B⁻</u> <u>m_B⁻</u>	13
MX614	F ⁻ <u>thi</u> <u>ilv-680</u> (<u>pro-lac</u>)	15
MX902	Derivada <u>glnG-74::Tn5</u> de MX614	16
678-54	F ⁻ <u>thr</u> <u>leu</u> <u>thi-1</u> <u>supE</u>	
	<u>lacY</u> <u>tonA</u> <u>gal</u> <u>mal</u> <u>xyl</u> <u>ara</u> <u>mtl</u> <u>min</u>	26

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ACTIVIDADES ESPECIFICAS DE GS EN CEPAS DE E. coli

pa	Fuente de Nitrógeno	Actividad específica*
614 (<u>glnA</u> ⁺ <u>glnG</u> ⁺)	NH ₄ ⁺ 15 mM	0.094
	Arginina 0.2%	0.877
902 (<u>glnA</u> ⁺ <u>glnG</u> ⁻)	NH ₄ ⁺ 15 mM	0.029
902/pACR1	NH ₄ ⁺ 15 mM	0.221
	Arginina 0.2%	2.520
902/pACR2	NH ₄ ⁺ 15 mM	0.337
	Arginina 0.2%	2.670
902/pACR3	NH ₄ ⁺ 15 mM	0.139
	Arginina 0.2%	0.669
902/pACR34	NH ₄ ⁺ 15 mM	0.250
	Arginina 0.2%	2.698
902/pACR23	NH ₄ ⁺ 15 mM	0.910
902/pACR7	NH ₄ 15 mM	0.03

Actividad específica: μ molas de γ -glutamil hidroxamato/min/mg de proteína.

Todas las cepas fueron crecidas en presencia de Kanamicina (30 μ g/ml), excepto la cepa MX614, para evitar la pérdida del transposon Tn5.

Las actividades de GS de las cepas MX902/pACR23, MX902/pACR7, y MX902 no se reporta en arginina 0.2% ya que no crecen con esta fuente de nitrógeno.

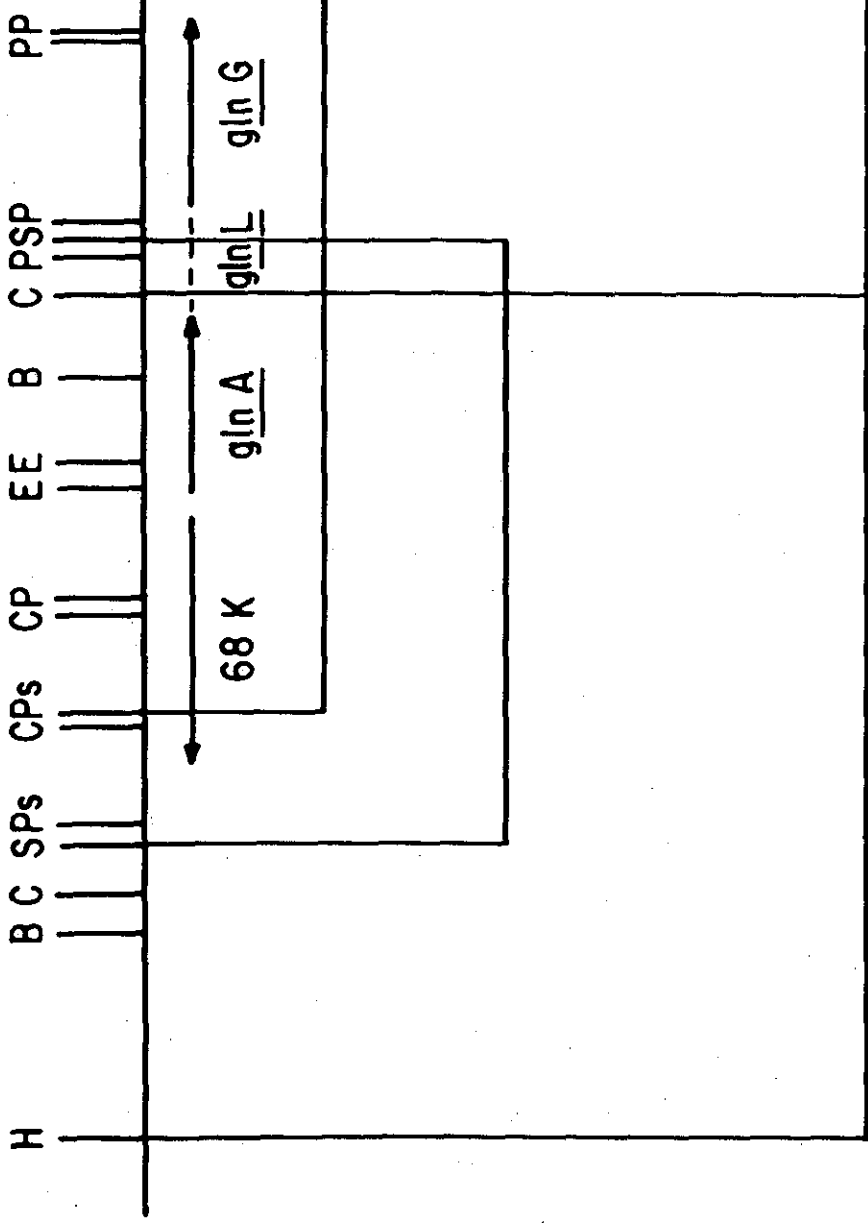
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 1. Mapa de restricción de pACR1, pACR2 y algunos derivados. Se muestra la localización de algunos sitios de restricción en el fragmento de ADN cromosomal clonado en los diferentes plásmidos.; H: HindIII, B: BamHI, C: ClaI, S: SalI, Ps: PstI, P: PvuI, E: EcoRI. En ninguno de los casos se muestra la región de ADN correspondiente al vehículo molecular. Las flechas indican la dirección de transcripción del gene respectivo. Las líneas verticales indican los límites de cada fragmento con respecto a pACR1.

Figura 2. Autorradiografía de un gel de poliacrilamida 11%-SDS de extractos de minicélula conteniendo (a) pBR327, (b) pACR2, (c) pACR1 y (d) Cole1. La localización de las cabezas de flecha corresponde a la migración de marcadores de peso molecular: albúmina (60,000 d), glutamino sintetasa de E. coli (53,000 d) y monómero de 14,300 obtenido de "Marcadores de peso molecular" de BDH-Biochemicals.

Figura 3. Autorradiografía de un gel de poliacrilamida 11%-SDS de extractos de minicélulas conteniendo (a) pACR2, (b) pACR3, (c) pACR6, (d) pACR7 y (e) pBR327. El plásmido pACR6, que no se describe en resultados, es una delección de pACR3 que no afecta ninguno de los productos codificados por pACR3. La localización de las flechas corresponde a la migración de los marcadores de peso molecular: albúmina (60,000d), glutamino sintetasa de E. coli (53,000 d), agregado de 42,900 d del monómero de 14,300d, éste último migra en la posición de la última flecha.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



pACR1
10.9 md
pACR 34
6.6 md
pACR 23
6.1 md

25

pACR 2
9.2 md
pACR 3
4.8 md
pACR 7
2.0 md

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

26

a

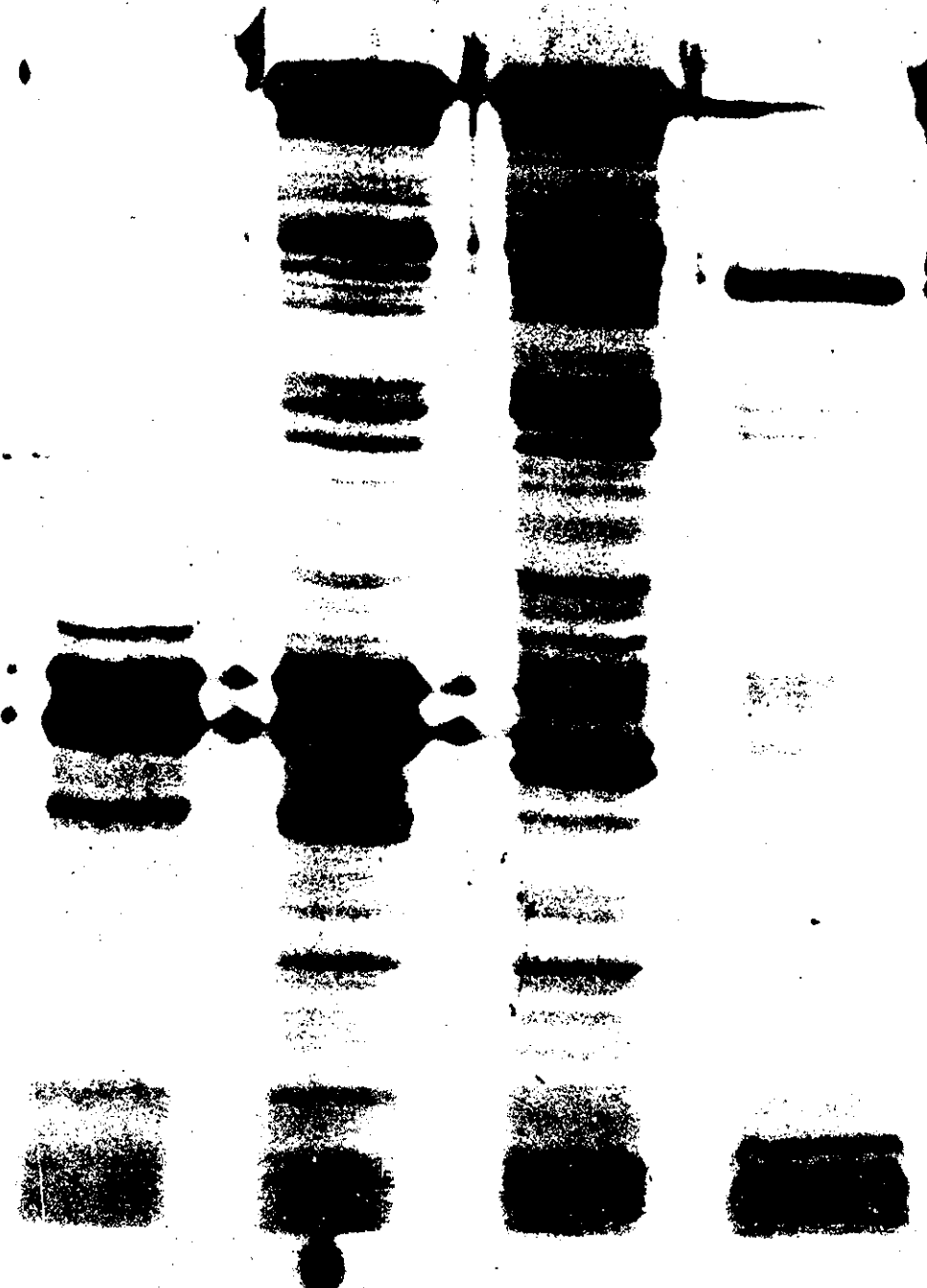
b

c

d

V
V

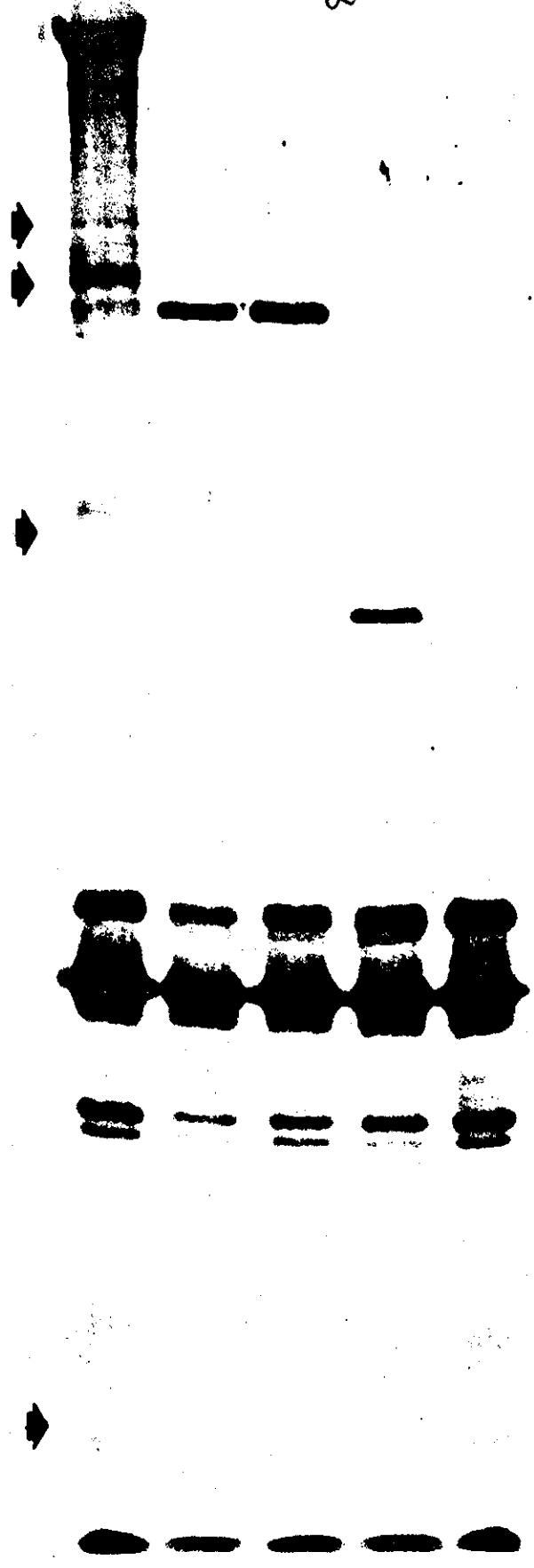
V



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

a b c d e

27



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Short Communication

Nucleotide Sequence of the *glnA* Control Region of *Escherichia coli*

Alejandra A. Covarrubias* and Fernando Bastarrachea

Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, 04510 México, D.F., Mexico

Summary. The RNA polymerase binding sites present along a DNA segment encompassing the *glnA*, *glnL*, and *glnG* genes have been identified in a hybrid plasmid carrying this chromosomal region of *Escherichia coli*. The DNA sequence was determined of an 817 base pair segment that contains the region coding for the first 42 amino acids of the NH₂-terminal and of the *glnA* structural gene, as well as its regulatory region. Analysis of this nucleotide sequence revealed three probable RNA polymerase recognition sites, imperfect palindromes, inverted repeats, and repeated sequences.

direct

The enzyme glutamine synthetase (Gln synthetase; L-glutamate: ammonia ligase (ADP-forming); EC 6.3.1.2), the product of the *glnA* gene, has an important role in the assimilation of ammonia by enteric bacteria. Its synthesis is controlled by the availability of nitrogen in the growth medium (Woolfolk et al. 1966) both at the level of enzymatic activity, by covalent adenylation of each subunit (Ginsburg and Stadtman 1973), and at the level of synthesis (Bender and Magasanik 1977; Tyler 1978). Expression of *glnA* is controlled by the products of several genes. These include, the product of *glnF*, a gene unlinked to *glnA*, as well as the product of the genes *glnL* and *glnG* which are closely linked to *glnA* (Kustu et al. 1979; Gaillardin and Magasanik 1980; Pahel and Tyler 1979; McFarland et al. 1981). Mutations in these genes also affect the expression of other operons and/or genes whose products are responsible for the utilization of nitrogenous compounds. In addition, it has been shown that the level of Gln synthetase also responds to the state of the PII protein, the *glnB* product, independently of the adenylation state of Gln synthetase (Foor et al. 1980). One of our approaches to understand the control of Gln synthetase synthesis more thoroughly at the molecular level has been the analysis of the *glnA* regulatory region. We report here the RNA polymerase binding sites inside the DNA region which contains the *glnA*, *glnL*, and *glnG* genes from *Escherichia coli* K12. The DNA sequence was determined for one of these RNA polymerase binding sites, the *glnA* control region, which contains the DNA encoding the first 40 amino acids at the NH₂-terminus of Gln synthetase.

Previous work suggested that five RNA polymerase

binding sites were present on the *glnA-glnG* region carried by plasmid pACR34 (Covarrubias et al. 1980a). To localize these sites precisely, RNA polymerase binding studies were carried out using plasmids pACR5 and pACR3 (Fig. 1). Plasmid pACR5 was constructed by introducing a *ClaI* fragment, which contains the intact *glnA* gene from pACR1 (Covarrubias et al. 1980 b), into pBR322 previously digested with endonuclease *ClaI* (Fig. 1). Plasmid pACR3 was obtained by recircularization of the large *ClaI* fragment from pACR2. The chromosomal DNA subcloned in pACR3 includes the intact *glnG* gene and part of the DNA region between *glnA* and *glnG* (Fig. 1). The DNA of each of these plasmids was digested with *HinfI* endonuclease to generate small fragments. After this treatment, the DNA was incubated with RNA polymerase and passed through nitrocellulose filters. The DNA fragments retained by the filters were eluted and examined, following electrophoresis on acrylamide gels and staining with ethidium bromide (Fig. 2).

In the case of pACR5 we found seven fragments that bind to RNA polymerase (Fig. 2, lanes a and b), four of them corresponding to fragments from pBR322. Band 1 contains the promoter for the β -lactamase gene, band 4 contains a promoter that initiates transcripts priming DNA synthesis, while promoters in bands 5 and 6 may direct synthesis of the RNA's involved in the replication of the plasmid (West and Rodriguez 1980; Stuber and Bujard 1981). The remaining fragments were located in the chromosomal DNA insert of pACR5; band 6 corresponds to a *HinfI* fragment located at the right end of the *glnA* gene; the *HinfI* fragment of band 2 was mapped in the joint between the insert and the inactivated Tc^r gene of pBR322, and the fragment corresponding to band 3 contains most of the *glnA* structural gene including its carboxy-terminal end. Evidence obtained from the same type of experiment but using plasmid DNA's digested with the enzyme *HaeIII* (data not shown) confirmed that the RNA polymerase binding site corresponding to the *HinfI* fragment of pACR5, which migrates as band 3, is located inside the *glnA* gene or very close to the region encoding its carboxy-terminal end. This result is in agreement with data obtained by Koduri et al. who showed that this region in *Salmonella typhimurium* encodes the site of adenylation of Gln synthetase and also contains the probable control region for the *glnL* gene (R.K. Koduri, N. Ho, and J. Brenchley, personal communication). The physical map and the RNA polymerase binding studies suggest that the *glnA* control

Offprint requests to: A.A. Covarrubias

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

29
Kb

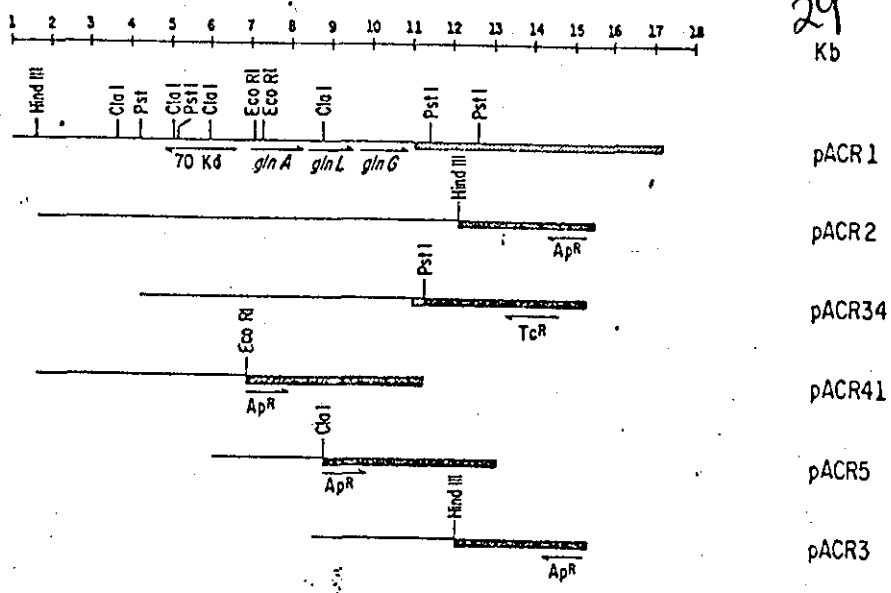
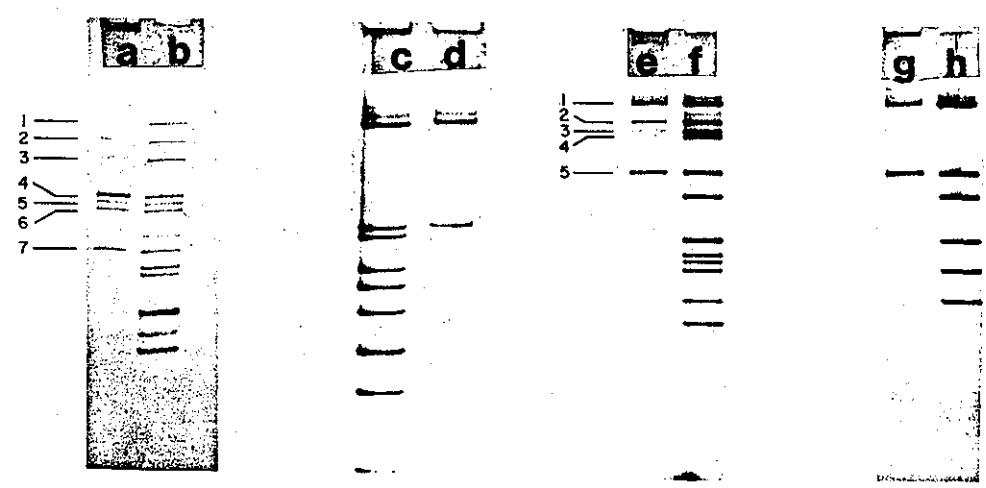
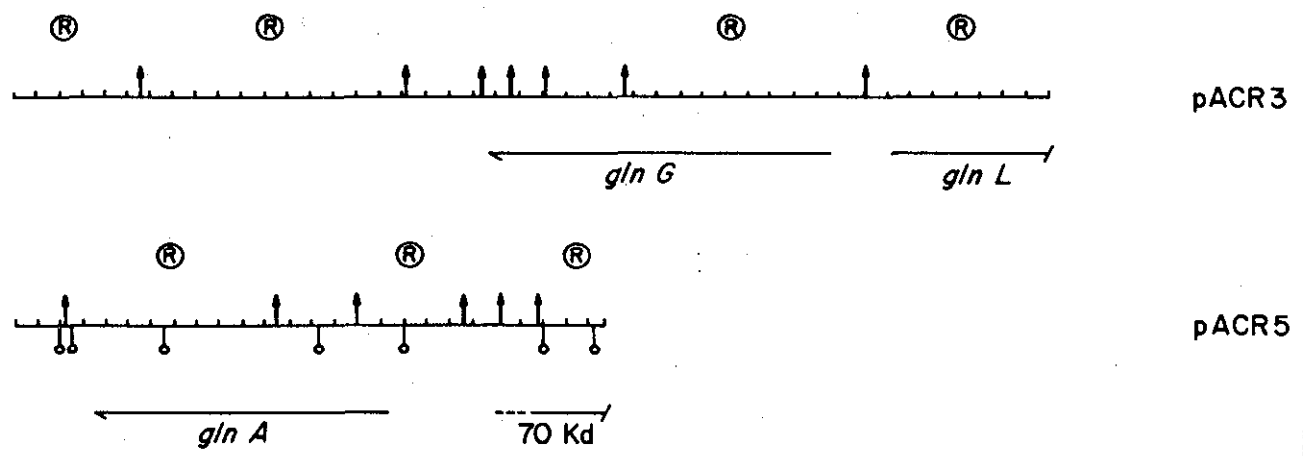


Fig. 1. Restriction map of various plasmids containing DNA derived from *E. coli*. As indicated in the text, pACR5, pACR34, and pACR41 were derived from pACR1, while pACR3 was derived from pACR2. Cross-hatched bars indicate DNA from ColE1; black bars indicate DNA from pBR322, except in the cases of pACR2 and pACR3 where they indicate DNA from pBR327. The horizontal lines indicate DNA derived from wild-type *E. coli*. The positions for *glnA*, *glnL* and *glnG* are shown immediately below pACR1, the arrowheads indicating the direction of transcription. *E. coli* chromosomal DNA cloned in each of the different plasmids is aligned with respect to pACR1



30

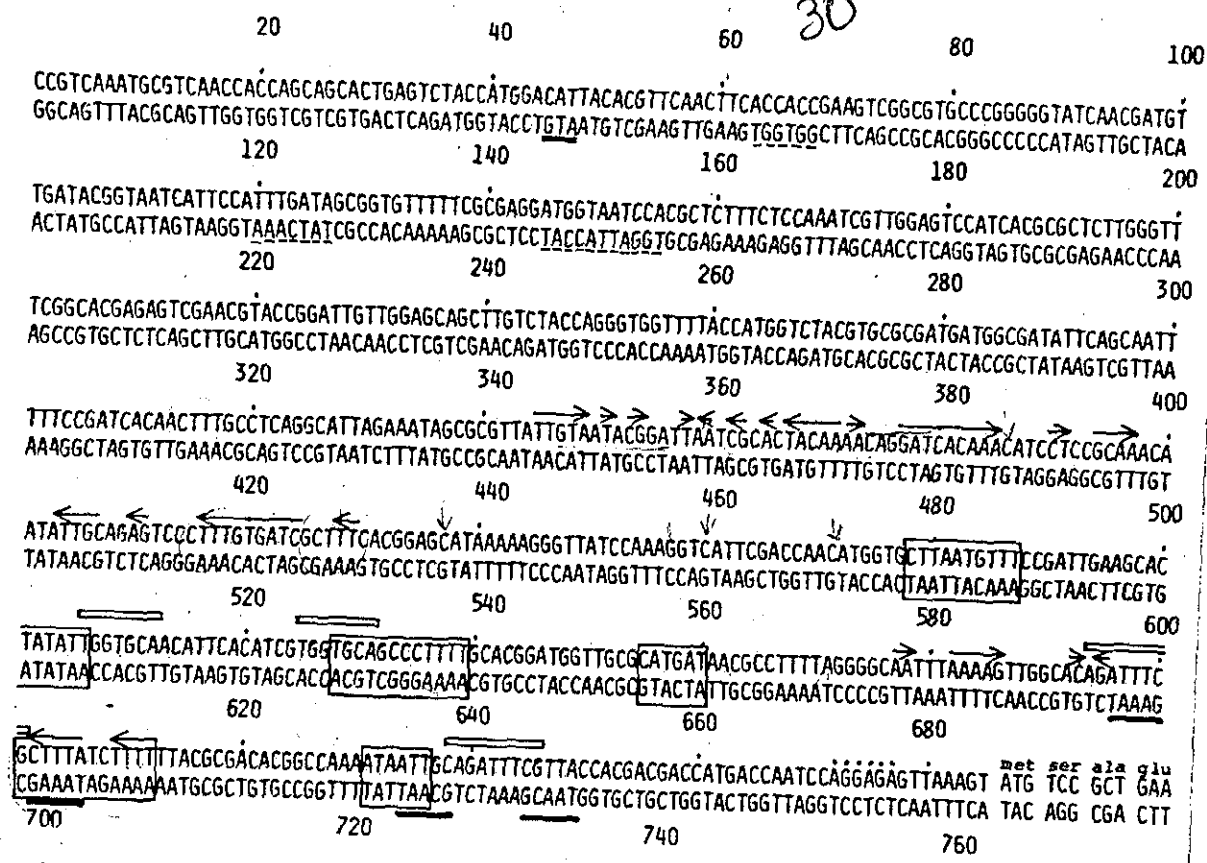


Fig. 3. Nucleotide sequence of the *glnA* control region. The nucleotide sequence of the DNA region that goes from nucleotide 1 to 620 was obtained from M13 mp7 derivatives which carry an *Hae*III fragment inserted into the *Hin*II site, in both orientations. The chain terminators method modified by Messing et al. (1981) was followed using a synthetic primer. The nucleotide sequence from base pair 540 to 817 was obtained from plasmid pACR41 (see Fig. 1), as described in the text. Since the site of initiation of transcription is not known, the numbering is progressive from the first base of the 5' end to the last base at the 3' end. The amino acids corresponding to the amino termini are shown immediately above their respective codons. The probable promoters (RNA polymerase recognition sequences: -10 and -35) are squared. Palindromic sequences are indicated by the arrows, repeated sequences by the empty bars, and mirror symmetries by the black bars. The dots indicate the possible ribosome binding sites. The ATG of position 47 probably represents the initiation for the 70 K protein. The broken line indicates the possible promoter and ribosome binding site for this gene

Fig. 2. RNA polymerase binding sites in the *glnA-glnG* region. The RNA polymerase binding experiments were carried out as described by West and Rodriguez (1980). Reactions were performed in 15 µl RNA polymerase-binding reaction buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 0.1 EDTA, 0.1 mM dithiothreitol, 5% glycerol and 75 mM KCl). In all cases, 3 µg DNA restricted with the *Hin*II endonuclease was used for each reaction mixture. RNA polymerase (Bethesda Research Laboratories, USA) was added at the appropriate molar ratio (10:1, RNA_p/DNA) for 30 min. Heparin (Sigma, USA) was then added to give a final heparin/RNA polymerase ratio of at least 15:1 and the reaction continued for 20 min at 37° C. These conditions minimized the nonspecific binding of RNA polymerase to DNA. The reaction mixtures were diluted with 100 µl RNA polymerase-binding reaction buffer and the mixture was passed over a 6 mm nitrocellulose filter (Schleicher and Schuel-BA85). The filters were immersed in 50 µl buffer containing sodium dodecyl-sulfate; they were ethanol-precipitated and resuspended in 15 µl 0.025% bromophenol blue in 25% glycerol. The samples were then subjected to polyacrylamide gel electrophoresis. Lane a: pACR5-*Hin*II + RNAP; lane b: pACR5-*Hin*II; lane c: pBR322-*Hin*II; lane d: pBR322-*Hin*II + RNAP; lane e: pACR3-*Hin*I + RNAP; lane f: pACR3-*Hin*I; lane g: pBR327-*Hin*I + RNAP; lane h: pBR327-*Hin*I. In the upper part of the figure the chromosomal DNA's contained in pACR3 and pACR5 are represented by horizontal lines. Each division indicates 100 bp. The (R) immediately above pACR5 or pACR3 indicates the location of the fragments that bind to RNA polymerase. The position of the *Hin*I (†) and *Hae*III (⊥) sites are also indicated. The arrowheads indicate the position of *glnA* as well as its direction of transcription

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

region is contained, at least in part, in the *HinfI* fragment which migrates as band 6.

Similar data obtained for plasmid pACR3 indicate that five *HinfI* fragments were bound to RNA polymerase (Fig. 2, lanes e and f). Fragments corresponding to bands 1 and 5 are contained in the molecular vehicle pBR327 (Fig. 2, lanes g and h); band 2 corresponds to a fragment generated by the fusion between chromosomal DNA and pBR327 and contains part of the *Tc^r* gene promoter; the *HinfI* fragment that migrates as band 3 is located adjacent to the *glnG* gene, and band 4 corresponds to a *HinfI* fragment which contains the *glnA* proximal half of the *glnG* gene (Fig. 2). These results suggest that the *glnG* gene may have its own promoter from which it could be transcribed under certain physiological conditions. Complementation analysis between a variety of plasmids and mutants carrying deletions entering the *glnA* region confirmed that *glnG* has a promoter of its own (Covarrubias et al. in preparation).

To obtain the nucleotide sequence of the region that could be immediately upstream from the *glnA* structural gene, plasmid pACR41 (Fig. 1) was used as a substrate for the Sanger method (Sanger et al. 1977). The plasmid DNA was linearized, denatured, and annealed to a synthetic single-stranded primer which is homologous to the sequence adjacent to the *EcoRI* site in pBR322. The nucleotide sequence corresponding to the NH₂-terminal amino acids of the *glnA* structural gene was identified (Fig. 3). The sequence of the first 26 amino acid residues at the NH₂-terminus of the Gln synthetase is in agreement with the amino acid sequence obtained by Kingdon et al. (1972), except for amino acid 19 which we found to be Asp instead of Asn; 16 additional amino acids could be deduced from the nucleotide sequence obtained. To enlarge the nucleotide sequence obtained from pACR41, a 625 bp *HaeIII* fragment located upstream of the amino terminus of *glnA* obtained from pACR5 (which was shown to contain a RNA polymerase binding site) was cloned in both orientations into the *HincII* site of the M13mp7 cloning vehicle (Messing et al. 1981). The sequence prior to the start of the coding region for the Gln synthetase protein was analyzed for ribosome binding sites, RNA polymerase binding sites, palindromes, and repeated sequences. In Fig. 3 it can be seen that a possible ribosome binding site is located 8 bp from the initiator codon with the sequence AGGAGA having 83% homology with the consensus sequence of Shine and Dalgarno (1974). Three DNA regions showing significant homology with the promoter consensus sequence or with promoter sequences for other operons (*lac*, *gal*, *ara*, Rosenberg and Court 1979) were found, and they are shown in the squares of Fig. 3. From the Pribnow boxes shown, the one located at position 501 has the more conserved sequence relative to the consensus. In addition, a good transcription initiation site (CAT) is localized 7 bp downstream from this sequence.

When one looks for possible secondary structures, an imperfect palindrome can be found with a center of symmetry between the T at position 358 and the A at position 359. Overlapping with this sequence was the small palindrome, GATTAATC. Adjacent to this region, a larger imperfect palindrome was found between two A's at positions 400 and 401. It should be noted that another imperfect palindrome was found between position 577 and 610. In this case the symmetrical sequence is located downstream from one of the probable *glnA* control regions. These palin-

dromes remain as putative binding sites for repressors or activators.

During the analysis of repeated sequences it was found that the sequence TGGTGCA and CAGATTTTCG are repeated twice (506 and 525, 593 and 638). We have also found two regions of mirror symmetry centered on bases 601 and 641. As proposed by Higgins and Ames (1982) mirror symmetries could serve as a symmetrical recognition sites for dimeric proteins. It should be emphasized, however, that the mirror symmetries we found in the *glnA* control region are considerably smaller than those found by Higgins and Ames (1982) in the *argT* and *dhuA* control regions.

According to the physical map, the NH₂-terminus for the 70 K protein gene as well as its control region could be contained in the sequence shown in Fig. 3. The gene for this protein, whose function remains unknown, is transcribed in a direction opposite to that the *glnA* gene. The probable promoter and ribosome binding site for this gene are indicated in Fig. 3.

Although the sequence analysis of the *glnA* control region has located parts of RNA polymerase interaction sites as well as potentially critical regions to be studied, it does not yet provide a clear picture of how this gene is regulated. What now remains to be done is to determine the influence of mutations in these regions on the regulation of *glnA* as well as their effect on the binding of RNA polymerase and other regulatory proteins.

Acknowledgements. We thank P. Seeburg, for help with the M13 sequencing system, R. Crea for providing the synthetic DNA primers, F. Sánchez for help in the computer sequence analysis, F. Bolívar for valuable discussions and C. González and A. Ayala for typing the manuscript. The work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico) grants PCCBNAL-001364 and PCCBBNA-005216.

References

- Bender RA, Magasanik B (1977) Regulatory mutations in the *Klebsiella aerogenes* structural gene for glutamine synthetase. *J Bacteriol* 132:100-105
- Covarrubias AA, Rocha M, Bolívar F, Bastarrachea F (1980a) Cloning and physical mapping of the *glnA* gene of *Escherichia coli* K-12. *Gene* 11:239-251
- Covarrubias AA, Sánchez-Pescador R, Osorio A, Bolívar F, Bastarrachea F (1980b) ColE1 hybrid plasmids containing the *Escherichia coli* genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine. *Plasmid* 3:150-164
- Foor F, Reuveny Z, Magasanik B (1980) Regulation of the synthesis of glutamine synthetase by the PII protein in *Klebsiella aerogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2636-2640
- Gaillardin CM, Magasanik B (1978) Involvement of the product of the *glnF* gene in the autogenous regulation of glutamine synthetase-formation in *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* 133:1329-1338
- Ginsburg A, Stadtman ER (1973) Regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. In: Prusiner S, Stadtman ER (eds) *The enzymes of glutamine metabolism*. Academic Press, New York, pp 9-43
- Higgins CF, Ames FG (1982) Regulatory regions of two transport operons under nitrogen control: Nucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:1083-1087
- Kingdon SH, Noyes C, Lahiri A, Heinrikson RL (1972) Primary structure of *Escherichia coli* glutamine synthetase. *J Biol Chem* 247:7923-7926

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Kustu S, Burton D, Garcia E, McCarter L, McFarland N (1979) Nitrogen control in *Salmonella*: Regulation by the *glnR* and *glnF* gene products. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4576-4580
- Messing J, Crea R, Seeberg PH (1981) A system for shotgun DNA sequencing. *Nucl Acids Res* 9:309-321
- McFarland N, McCarter L, Artz S, Kustu S (1981) Nitrogen regulatory locus "*glnR*" of enteric bacteria is composed of cistrons *ntrB* and *ntrC*: identification of their products. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:2135-2139
- Pahel G, Tyler B (1979) A new *glnA*-linked regulatory gene for glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4544-4548
- Rosenberg M, Court D (1979) Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu Rev Genet* 13:319-353
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467
- Shine J, Dalgarno L (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA; complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:1342-1346
- Stuber D, Bujard H (1981) Organization of transcriptional signals in plasmids pBR322 and pACYC 184. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:167-171
- Tyler B (1978) Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Annu Rev Biochem* 47:1127-1162
- West RW, Rodríguez RL (1980) Construction and characterization of *E. coli* promoter - probe plasmid vectors II. RNA polymerase binding studies on antibiotic - resistance promoters. *Gene* 9:175-193
- Woolfolk CA, Shapiro BM, Stadtman ER (1966) Regulation of glutamine synthetase. I. Purification and properties of glutamine synthetase of *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 116:177-192

Communicated by G. O'Donovan

Received September 27 / November 17, 1982

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

cis- Dominant, Glutamine Synthetase Constitutive Mutations of
Escherichia coli Independent of Activation by the glnG and glnF products

Aurora V. Osorio, Luis Servín-González, Mario Rocha,
Alejandra A. Covarrubias and Fernando Bastarrachea

Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Apartado Postal 70-228,
04510 México 20, D.F., México

Offprint requests to: F. Bastarrachea

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Summary. Mutants resistant to 80µM L-methionine-DL-sulfoximine (MS) were isolated on minimal-glucose-15mM NH₄⁺ medium plates from Escherichia coli cells which were hypersensitive to this concentration of the analog by virtue of their harboring glnG mutations. MS-resistant mutants derived from strain MX902 carried, in addition to its glnG74::Tn5 allele, mutations tightly linked to glnA as shown by P1-mediated transduction experiments. One particular allele, gln-76, which suppressed the MS-sensitivity conferred by glnG74::Tn5 but not its Ntr⁻ phenotype (inability to transport and utilize compounds such as arginine or proline as only nitrogen sources), was shown to allow constitutive expression of glutamine synthetase in the absence not only of a functional glnG product but of a functional glnF product as well. This behavior was found to be cis-dominant in complementation experiments with F'14 merogenotes. In an otherwise wild genetic background as in MX929 (gln-76 glnA⁺ glnL⁺ glnG⁺ glnF⁺), however, normal activation mediated by the glnG and glnF products was apparently preferred over that mediated by gln-76. The results are discussed in terms of gln-76 altering or destroying a repressor site at the glnA control region and simultaneously creating a highly efficient promoter. glnA expression from this promoter is more evident in the absence of activation by the glnG and glnF products.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Introduction

Glutamine synthetase (L-glutamate: ammonia ligase (ADP-forming), EC 6.3.1.2) is one of several proteins of enteric bacteria whose synthesis is regulated by availability of nitrogen in the growth medium (Woolfolk et al., 1966). Under nitrogen limitation as in the presence of glutamine, glutamate, arginine, proline or low concentration of ammonium ions as only nitrogen sources, glutamine synthetase is derepressed. The addition of high ammonium ion concentrations to the media causes repression by about 10 to 20-fold. Experimental evidence obtained in different laboratories indicates that the products of several genes, glnF, glnL, glnG and glnB, appear to mediate regulation of glnA, the structural gene for the glutamine synthetase monomer, presumably at the transcription level (Rothstein et al., 1980; Pahel et al., 1982; Goldie and Magasanik, 1982; Guterman et al., 1982). These genes also regulate the expression of other operons or genes whose products are involved in the transport and utilization of a number of organic nitrogenous compounds such as histidine, arginine or proline, the previously named Reg phenotype (Pahel and Tyler, 1979; Guterman et al., 1982; MacNeil et al., 1982), later renamed the Ntr phenotype (Magasanik, 1982). glnF mutations first discovered in Salmonella typhimurium by Garcia et al. (1977), map at min 86 in the Escherichia coli map (Bachmann and Low, 1980). Cells carrying mutant glnF are glutamine requirers e.g., they synthesize glutamine synthetase in amounts even lower than those found under extreme repressing conditions. glnF mutants revert to the Gln⁺ phenotype at frequencies about 10⁻⁶. The great majority of revertants carry, in addition to the

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

original glnF mutation, secondary mutations in a gene closely linked to glnA named glnG in E. coli (Pahel and Tyler, 1979) and glnR in S. typhi murium (Kustu et al., 1979a). As already mentioned, glnG mutants are Gln^+ . They synthesize low constitutive levels of glutamine synthetase and are also Ntr^- in either a glnF⁺ or glnF background. Recent evidence (McFarland et al., 1981) indicates that glnG (or glnR) is not one but two genes. The relative orientation of these genes in the E. coli chromosome is polA...glnG glnL glnA...rha; the direction of transcription of the three genes occurs in the same counterclockwise direction (Backman et al., 1981; Pahel et al., 1982).

On the basis of their results, McFarland et al., (1981) have proposed a model in which the glnL and glnG products function as a repressor protein complex for glnA and other nitrogen controlled genes. The repressor complex may be acted upon by the glnF product either directly or through a catalytic small molecular weight product, thus converting it to a form with positive regulatory character, i.e., an activator.

Since the frameshift mutations of McFarland et al., (1981) in either glnL or glnG affected only the expression of one protein product but not that of the other, and since we know that frameshift mutations are highly polar, it is probable that glnL and glnG belong to different transcriptional units. In agreement with these observations, Backman et al., (1981) have described a deletion within glnL which is non polar to glnG in a plasmid containing the whole glnA region. Nevertheless, glnL mutations polar to glnG have also been isolated by

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

G. Pahel (quoted in Chen et al., 1982). According to Pahel et al. (1982) glnA and glnG are expressed under nitrogen limiting growth conditions as a single transcriptional unit; thus the three genes, glnA, glnL and glnG seem to constitute an operon. Further evidence in support for the operon model comes from studies on β -galactosidase expression of MudI (lac) insertions in glnA, glnL or glnG (Rothstein et al., 1980; Guterman et al., 1982; Pahel et al., 1982) and from suppression of the Ntr⁻ phenotype of glnA point mutants by rho mutations (Guterman et al., 1982).

The presence of a promoter starting transcription from glnL and being negatively controlled by the glnG product has been suggested (Pahel et al., 1982; Chen et al., 1982). Evidence is also available for the presence of a functional promoter transcribing only the glnG gene (Covarrubias et al., to be published). It will be therefore of no surprise if expression of these genes turns to be achieved by a series of overlapping mRNA transcripts depending upon the quality and the quantity of the nitrogen source available for growth. This is in agreement with observations indicating that some expression of glnG takes place in strains in which glnA (Pahel and Tyler, 1979; Pahel et al., 1982; Goldie and Magasanik, 1982) or glnL (Urbina and Bastarrachea, unpublished data) have been mutated by insertions.

We have characterized a number of glnG mutants and have found, in addition to their low level constitutivity for glutamine synthetase and their Ntr⁻ phenotypes, that they are also hypersensitive to the glutamine analog L-methionine-DL-sulfoximine (MS). We have used

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MS-resistance as a good selected marker for wild type recombinants in crosses involving glnG mutations, as well as for complementation experiments with F'14 merogenotes. Selection for MS resistant revertants of the glnG74::Tn5 allele led to cis-dominant mutations tightly linked to glnA which allowed constitutive synthesis of glutamine synthetase independent of the glnG and glnF products under otherwise ammonium repressing conditions. Our results indicate that gln-76 may lie in the control region of the glnA transcriptional unit making it independent of activation and poorly repressible, if at all, by the normal regulatory effectors within the general framework of McFarland's et al. (1981) model.

Material and Methods

Bacterial Strains. They were all derivatives of E. coli K12 and are listed in Table 1.

Culture Media. The NN minimal and the complex Luria media used have been described (Covarrubias et al., 1980). Additions to minimal medium, in final concentrations, were as follows: G, 0.2% glucose, LA and HA, 0.5mM and 15mM ammonium chloride, respectively; gln, 1mg/ml L-glutamine. The utilization of 0.2% L-arginine as only nitrogen source (Aut) was used as an indicator of the Ntr phenotype. Other supplements for minimal medium to satisfy nutritional requirements were added at predetermined optimal concentrations ranging from 5×10^{-4} M to 2×10^{-3} M. Glutamine auxotrophs were maintained in slants of Luria medium supplemented with 1mg/ml of L-glutamine. Merodiploid strains were maintained on slants of minimal medium devoid of isoleucine and valine.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Isolation of Mutants. Tn5 insertions were isolated following infection of MX615 (Table 1) with λ Kan2 (Berg et al., 1975). P1 lysates were then prepared on pools made of a large number of kanamycin resistant (Km^R) individual colonies. Following transduction of MX727 (glnA71::Tn5), selection was made for Gln^+ [Km^R Aut^-] colonies which turn to carry Tn5 insertions into either glnG or glnL.

Genetic Procedures. Preparation of P1 lysates and the protocol for transductions were according to Miller (1972). Merodiploids strains were constructed by transfer of F'14 merogenotes from AB1206 or its derivatives to appropriate recipients and selection for Ilv^+ complementarity. Since for unknown reasons F'14 merodiploids constructed in recA56 backgrounds were highly unstable, all our recipients were recA⁺. Their merodiploid state was verified by curing with acridine orange (Bastarrachea and Willetts, 1969). The polA genotype was recognized by its sensitivity to methyl methanesulphonate (De Lucia and Cairns, 1969) and the Tn5 transposon by its resistance to 30 μ g/ml of kanamycin. Curing of MX927 (glnG74::Tn5) from its transposon was achieved by selection of Aut^+ [Km^S] spontaneous revertants.

Glutamine Synthetase Activity. The γ -glutamyl transferase assay used, the preparation of cell-free extracts and the determination of the average state of adenylation, were as previously reported (Covarrubias et al., 1980). Specific activities are given as nanomoles of γ -glutamyl hydroxamate formed per min per mg of protein at 37°C. Protein was determined by the method of Lowry et al., (1951) using bovine serum albumin as a standard. The screening of individual colonies for high constitutive level

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

synthesis was carried out using the qualitative assay described by Pahel et al, (1978).

Southern Hybridizations. These experiments were carried out using purified DNA's (Betlach et al., 1976) from plasmid probes pACR2 and pACR10. pACR2 carries an E. coli DNA chromosomal fragment of approximately 10.5 kb that contains the glnA, glnL and glnG genes (Fig. 2B). pACR10 is pBR322 carrying a Tn5 insertion of unknown location. Chromosomal DNA from strains MX615 and MX902 were purified (Marmur, 1961) and digested to completion with endonucleases BamHI and PstI. The digested mixtures were subjected to agarose gel electrophoresis and the DNA's transferred to nitrocellulose paper (Schleicher and Schüel BA85) for hybridization against nick-translated pACR2 or pACR10 DNA's as described by Southern (1975).

Reagents. All amino acids and vitamins as well as the L-methionine-DL-sulfoximine were from Sigma Chem. Co. The restriction endonucleases were purified by the procedure of Greene et al. (1978). The plasmid DNA's used as probes were labeled using a nick-translation kit (code PBS100) from Amersham International. All other reagents and media ingredients used were of analytical grade.

Genetic Nomenclature. Inasmuch as the gene designations glnF, glnL and glnG have been used extensively in E. coli (see for instance Chen et al., 1982; McNeil et al., 1982) they are preferred here over those known as ntrA, ntrB and ntrC, their counterparts in S. typhimurium (McFarland et al. 1981). All other genotypic symbols are those recommended by Backman and

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Low (1980). The genotypic designation msr, for the mutation associated with the MS resistance of strain MX981 (Table 1) is tentative. Alleles glnA70 and glnA71::Tn5 are those previously known as glnA20 and glnA21::Tn5 (Covarrubias et al., 1980; Bastarrachea et al., 1980; MacNeil, 1981; Pahel et al., 1982) respectively.

Results

Hypersensitivity to L-methionine-DL-sulfoximine of glnG mutants. The GlnR phenotype of glnG mutants in enteric and other bacteria is characterized by an inability to transport and utilize compounds such as arginine, proline or histidine as only nitrogen sources (i.e., the Ntr phenotype) and by a low level constitutive expression of glutamine synthetase (Kustu et al., 1979a; Pahel and Tyler, 1979). Based on the known irreversible inhibition of glutamine synthetase by the glutamine analoge, L-methionine-S-sulfoximine (MS) in the presence of ATP (Ronzio and Meister, 1968; Ronzio et al. 1969; Rowe et al., 1969; Manning et al., 1969), we reasoned that cells synthesizing small amounts of this enzyme should be hypersensitive to MS. Indeed, we have found that all the glnG mutants of E. coli we have tested are hypersensitive to MS. At 80µM MS in GHA medium, glnG cells fail to grow while glnG⁺ cells do grow (Fig. 1). In the presence of glutamine as only nitrogen source, MS inhibition of growth of either glnG⁺ or glnG cells was not observed; methionine also prevented the growth inhibitory effects of MS on MX902 cells after a prolonged lag (Fig. 1; Ayling and Bridgeland, 1972; Betteridge and Ayling, 1975).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

consistent with those obtained in crosses with mutants carrying well defined deletions entering the glnA region. In transductional crosses using MX902 (glnG74::Tn5) as a recipient and P1 propagated on either MX850 $\Delta(\underline{glnG} \underline{glnL} \underline{glnA} \dots \underline{rha})$ or MX852 $\Delta(\underline{glnA} \dots \underline{rha})$, we obtained $GlnG^+$ recombinants only with MX852 but not with MX850 as the donor.

In order to locate more precisely the glnG74::Tn5 mutation, Southern type hybridization experiments were carried out using two plasmids as probes; pACR2 which carries the glnA - glnL - glnG region (Fig. 2B) and plasmid pACR10, a derivative of pBR322 carrying a Tn5 insertion. These plasmids were nick translated and hybridized against chromosomal DNA from strains MX615 (wild type) and MX902 (glnG74::Tn5) previously digested with endonucleases BamHI and PstI. As shown in Fig. 2A, five BamHI-PstI DNA fragments from MX615 were found to hybridize with pACR2 DNA. Three of them seemingly corresponded to the internal pACR2 DNA region, since similar bands were observed in the pACR2 vs pACR2 hybridization (Fig. 2A). The remaining two fragments represented the joints between each of the ends of the chromosomal DNA fragment carried by pACR2. In the case of the hybridization MX902 vs pACR2, we noticed the disappearance of the 3.9 kb BamHI-PstI fragment. Instead, two fragments of 2.77 kb and 2.55 kb were visualized. These results indicate that the glnG74::Tn5 insertion occurred inside the 3.9 kb BamHI-PstI fragment, approximately 2.77 kb from the BamHI site. The data were confirmed by results obtained using pACR10 DNA as probe (Fig. 2A). Our hybridization results, therefore, are consistent with the conclusion that the glnG74::Tn5 insertion readily interrupts the

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

glnG gene sequence (Fig. 2C).

Isolation of constitutive mutations for glutamine synthetase as suppressors of glnG74::Tn5. - From MX614 cells, we isolated and characterized 17 independent mutants carrying Tn5 insertions tightly linked to glnA in P1 transduction experiments. Most of them were shown to be insertions in glnG but a few were insertions in glnL that were polar to glnG. Nevertheless, they were all MS^S and Aut⁻. None of the glnG::Tn5 insertions reverted to Aut⁺ in the presence of kanamycin. They did revert, however, to the MS^R phenotype whether or not kanamycin was present in the selection medium. MX902, for instance, reverted to MS^R at a frequency of 1×10^{-7} . Ten independent MS^R revertants from MX902 were screened for glutamine synthetase activity after growth on GHA medium. Specific activities ranged between 370 and 1900. The MS^R strain having the highest glutamine synthetase specific activity under otherwise repressing conditions was selected for detailed study.

This MS^R revertant strain, termed MX927, synthesized high constitutive levels of glutamine synthetase but failed to utilize arginine as a nitrogen source (Table 3), thus indicating that this derivative carried in addition to the original glnG74::Tn5 mutation, a secondary mutation which suppressed only the glnG functions related to glnA expression but not those related to expression of the Aut⁺ phenotype.

Mapping of gln-76. P1 lysates made on MX927 (glnG74::Tn5 gln-76) were used to transduce two independent glutamine auxotrophs, MX727 and MX822, to prototrophy. glnG74::Tn5 was found to cotransduce 82% and 96% with the wild chromosomal regions corresponding to the glnA71::Tn5 and glnA70

mutations, respectively (Table 4). This is consistent with an ordering of the mutations as glnG74::Tn5-glnA70-glnA71::Tn5. The fact that all the glnA⁺ glnG74::Tn5 transductants from either cross that were tested also coinherited gln-76 was indicative of the tight linkage of this mutation with glnA. A third cross was performed which helped to locate gln-76 unambiguously. Pl was propagated on MX852 a strain carrying Δ (glnA rha) with one deletion end cutting the glnA structural gene near the middle while leaving the glnG⁺ and glnL⁺ genes intact. This lysate was used to transduce MX927 recipient cells. All the Aut⁺ recombinants that were tested were Km^S (Table 4). Recombinants were expected to be wild type for all gln genes and to have regulated levels of glutamine synthetase unless they coinherited the gln-76 mutation. Since the only difference between cells carrying gln-76 (i.e., MX929, see below) and wild type cells (i.e., MX614) is a 2-fold derepression of glutamine synthetase by the former, after growth on high ammonium ion concentrations (Table 3), 14 individual transductants from the above cross were purified and tested for glutamine synthetase activity after growth on GHA medium. All of the isolates showed 2-fold derepressed levels of the enzyme, thus allowing the conclusion that the wild chromosomal region corresponding to the gln-76 mutation was deleted in MX852. Due to its tight linkage with glnA, gln-76, therefore, must lie very close to the NH₂-terminal end of glnA.

Regulation of glutamine synthetase in strains carrying the *gln-76* allele.

The most striking feature of the *gln-76* allele is that it mediated synthesis of glutamine synthetase at high levels in the absence of a functional *glnG* product. In fact, cells carrying the *gln-76* mutation made considerably more enzyme when the cells were devoid of a normal activating system than in its presence. When compared with wild type MX614, MX927 cells made more than double the activity if both strains were grown on media containing low ammonium ion concentrations, about 1.6-fold higher activity when glutamine was the nitrogen source and 7-fold higher activity when both strains were grown on high ammonium ion concentrations (Table 3).

Using the curing procedure outlined in Materials and Methods, we obtained *glnG*⁺ derivatives from MX927 which were Km^S due to precise excision of the Tn5 transposon. One of these Gln⁺ Km^S derivatives, termed MX929, was shown to be Aut⁺ MS^R and synthesized normal levels of glutamine synthetase, except when grown on GHA medium where the activity was 2-fold derepressed as compared to wild MX614 cells grown under similar conditions. This implied that the mutation conferring the MS^R phenotype to MX927, designated *gln-76*, was still present in the Tn5-cured strains, MX929. These results suggest that the putative *glnG-glnF* activator complex still bound and initiated transcription at the *glnA* operon control region of MX929 cells in spite of the fact that it can be totally dispensed with.

In order to learn what effects on glutamine synthetase expression *gln-76* had on cells also carrying a mutant *glnF* allele, we transduced the *glnF73::Tn5* mutation from MX848 into MX929 with bacteriophage

P1, selecting for Km^R transductants. One Km^R transductant was purified and termed MX931. The glnF73::Tn5 gln-76 genotype of this isolate was verified by cotransductibility with argG in the case of glnF73::Tn5 and with glnA in the case of gln-76. MX931 was glutamine independent due to its ability to synthesize sufficient amounts of glutamine synthetase to sustain growth (Table 3). The glutamine synthetase specific activities made by MX931 varied between 140 and 600 (Table 3). Surprisingly, they showed the inverse relationship of having higher levels of activity in cells grown on high ammonium and lower in those grown on low ammonium ion concentrations. MX931 was also Aut^- and MS^S ; the Aut^- phenotype being a clear indication of an absolute requirement of a functional glnF product for Aut^+ (Ntr^+) expression. The MS^S phenotype of MX931, however, could not be explained in terms of either the absence of a glnF product, the presence of a functional glnG product or to both.

MS^R derivatives of MX931. Plating of MX931 (glnF73::Tn5 gln-76) cells on minimal-glucose-15mM NH_4^+ -80uM MS medium in the presence of kanamycin, led to the isolation of MS^R spontaneous mutants at a frequency of 3×10^{-5} . Two classes of MS^R mutants were easily distinguished after the colonies were screened with the qualitative assay for glutamine transferase activity. One class (35%) synthesized high constitutive levels of the enzyme, similar to those made by MX927 (glnG74::Tn5 gln-76) and another class (66%) which synthesized intermediate constitutive levels practically identical to those made by the parental strain, MX931. As expected, representatives of the high level constitutive class, exemplified by MX982 (Table 3), apparently carried, in addition to glnF73::Tn5 and gln-76, glnG mutations which conferred to them the MS^R phenotype. This was

suggested by results of transduction tests in which P1 lysates made on three isolates of the high constitutive level class, including MX982, were used to transduce MX734 (glnA71::Tn5) to glutamine independence. Approximately 85% of the $\text{Gln}^+ [\text{Km}^S]$ progeny resulting from each of the three crosses were $\text{Aut}^- \text{MS}^R$ and high level constitutive for glutamine synthetase. These results suggest that MX931 cells spontaneously revert to glnG⁻ at a frequency of one third 3×10^{-5} (i.e., 1×10^{-5}) which is characteristic of the glnF73::Tn5 mutation. Thus, inability of the cells to synthesize glutamine does not seem to be a condition for the suppressors of glnF mutations to be borne, as they take place in MX931 capable of synthesizing sufficient amounts of the enzyme to support cellular growth.

The other class of MS^R mutants derived from MX931 was shown not to affect glnG. P1 propagated in three of the mutants including MX981, the prototype strain of this class, were used to transduce the MX734 recipient to $\text{Gln}^+ [\text{Km}^S]$. None of the 200 transductants from each cross that were tested was Aut^- . The nature and location of the mutations conferring the MS^R phenotype to these mutants has not been investigated further.

Finally, the pattern of adenylation of the glutamine synthetase made by wild type MX614 cells, which is a function of the quality and abundance of the nitrogen source in the medium, was similar to those shown by the different strains carrying gln-76 that were constructed (Table 3). This was true, regardless the amount of enzyme made by a particular strain was unusually high. Thus, the gln-76 mutation does not seem to affect the normal adenylation-deadenylation system of

glutamine synthetase in these cells.

cis-dominance of gln-76 in heterozygous merodiploids. We reasoned that if gln-76 lied in the glnA control region, it should behave as cis-dominant in +/- heterozygotes. In order to put this assumption to a test, we constructed two strains by conjugal transfer of F'14 merogenotes into MX927 (glnG74::Tn5 gln-76) recipients. One strain, MX936, received an F'14 merogenote carrying the entire wild glnA region, and the other, MX937, received a similar F-merogenote but carrying the glnA-71::Tn5 insertion (Table 3).

MX936 was weakly Aut^+ similar to MX932. In both strains the F'14 merogenote carrying the wild glnA region complemented the glnG74::Tn5 chromosomal mutation, albeit weakly. Apparently, some trans effects exerted by a chromosomal product (which most probably could not be the glnG product) had negative effects on glnG expression from the merogenote, since the wild F'14 merogenote expresses Aut^+ perfectly well in the haploid state (i.e., in AB1206, Table 3). MX937 was Aut^- as expected due to the glnG74::Tn5 mutation of its chromosome and the glnA71::Tn5 mutation of its merogenote which probably exerted polar effects on expression of the glnG⁺ gene positioned cis to it.

In the haploid state, as in AB1206, the wild F'14 merogenote directed synthesis of normally repressible glutamine synthetase (Table 3). Therefore, the high level constitutivity of glutamine synthetase in both MX936 and MX937 was ascribed to cis-dominance of gln-76 on expression of the chromosomal glnA gene; the higher maximum levels of constitutivity

observed in MX937 over those of MX936 being an additional indication of the negative effects of the limiting amounts of glnG⁺ product made from the F'14 merogenote of MX936, and the inability of the glnG⁺ gene in the F'14 glnA71::Tn5 merogenote to get expressed.

An independent MS^R mutation from MX902 was also isolated and termed gln-75. The behavior of gln-75 was similar to that of gln-76 in many respects. It was tightly linked to glnA in P1 transduction experiments. It also mediated cis-dominant constitutive synthesis of glutamine synthetase in the absence of the glnG-glnF activator system (data not shown).

Inhibition of glutamine synthetase activity by MS. All evidence presented here has allowed us to postulate the control region of the glnA operon as the site where the gln-76 mutation must lie. The possibility that gln-76 would lie within the glnA structural gene, thus conferring to the glutamine synthetase enzyme resistance to MS inhibition as with the mutants reported by Miller and Brenchley (1981) in S. typhimurium, was considered unlikely. Nonetheless, experiments to rule out this possibility were undertaken. As expected, cell-free extracts prepared from strains carrying gln-76 showed glutamine synthetase activities equally sensitive to MS as those prepared from wild type MX614 or MX902 (glnG74::Tn5) cells (Table 5).

Discussion

From MX902 cells of E. coli which are hypersensitive to MS

by virtue of their harboring the glnG74::Tn5 mutation, we isolated and characterized spontaneous MS^R variants. One of these, MX927, carried in addition to glnG74::Tn5, a secondary mutation, gln-76, which conferred to these cells the capacity to express its glutamine synthetase constitutively.

This constitutive behavior of gln-76 was shown to be cis-dominant when complemented with F'14-merogenotes carrying the entire wild type glnA region (Table 3). Mapping experiments using transduction with bacteriophage P1 demonstrated that the gln-76 allele was nearly 100% linked to the glnA structural gene. Moreover, all Aut⁺ transductants that were tested from a cross between MX852 $\Delta(\text{glnG}^+ \text{glnL}^+)$ $\Delta(\text{glnA-rha})$ as donor and MX927 (glnG74::Tn5 gln-76) as recipient still beared the gln-76 mutation (Table 4); therefore, gln-76 must lie on the glnA side opposite to glnL and glnG. By several additional criteria we have been able to show that the gln-76 allele does not affect the glnL gene. This was considered necessary since mutations in glnL are also known to lead to constitutivity for glutamine synthetase, i.e., the GlnC phenotype (Backman et al., 1981; Chen et al., 1982). Contrary to the cis-dominant constitutive behavior for glutamine synthetase expression mediated by gln-76, constitutivity of all the glnL mutations we have tested, as those reported by Chen et al., (1982), was trans recessive to the wild type allele in complementation experiments; in addition, the gln-76 allele did not suppress the Ntr⁻ phenotype conferred to E. coli cells by the gltB31 mutation (data not shown) as has been reported for certain glnL mutations (Pahel et al., 1978; Chen et al., 1982).

One of the most striking features of the gln-76 mutation is that it allows glnA expression in the absence of a functional glnG product, e.g., MX927. The later construction of strain MX982 (Table 3), presumably devoid of both the glnG and glnF products, further suggests that gln-76 promotes a highly efficient expression of glnA in the absence of both the glnG and glnF products. Bacterial mutants synthesizing high constitutive levels of glutamine synthetase in the absence of the glnG-glnF activator system had not been reported previously. The only precedent being some mutations known as nifT isolated in Klebsiella pneumoniae by Ausubel et al. (1976, 1977), one of which was shown to be cis-dominant. These mutations presumably affected the regulatory region of the nifLA operon since they allowed nif expression in the apparent absence of activation by the glnG product, i.e., in a GlnR background.

A cis-dominant mutation, gln-153 that affects the glnA control region of Klebsiella aerogenes has been previously reported (Rothstein and Magasanik, 1980). It was selected as a glutamine independent derivative of a strain carrying a glnF mutation and mero-diploid for the glnA⁺ region. Some properties inherent to our gln-76 mutation are shared by the gln-153 mutation. However, others such as the high constitutive level of expression of glutamine synthetase mediated by gln-76 in the absence of a glnG product has not been documented for cells carrying gln-153. Thus, whether or not gln-76 and gln-153 are alike remains an open question.

The molecular basis for glnA activation by the glnG and glnF products and for repression by the glnG and glnL products, remains

unveiled. Whatever the mechanisms turn to be, it is clear that the binding site for the activator remains largely unaltered in cells carrying gln-76 according to the following reasoning. It was noticed that the maximal level of glutamine synthetase expression in MX927, which occurred when these cells were grown under nitrogen limiting conditions, was increased by a factor of 2 when compared to that of wild type MX614 cells grown under similar conditions (Table 3). However, in strain MX929 which carries gln-76 and all the gln regulatory genes in the wild state, the maximal level of glutamine synthetase expression dropped back to that of wild type cells (Table 3). Thus, in MX929 cells activation of glnA expression by the glnG and glnF products is apparently preferred over that mediated by gln-76. It seems, therefore, as if the gln-76 mediated expression of glutamine synthetase takes place only in the absence of a functional glnG product, regardless a glnF product is or is not present (compare MX927 with MX981, Table 3).

Another important feature of the constitutive expression of glutamine synthetase in MX927 and in MX982 was its incompleteness; in other words, when these strains were grown on GHA, a normally repressing medium, the enzyme activity was derepressed but was still half of that found under derepressing conditions, as when the cells were grown with glutamine as only nitrogen source. Since neither normal activation nor repression of the glnA operon can take place in MX927 or MX982 cells due to their lack of a functional glnG product, this effect may represent a hitherto undefined type of negative control created by exposure of cells carrying gln-76 to an excess of ammonium ions. A similar inability to attain full derepression of glutamine synthetase in the presence of an

excess of ammonium ions, but not necessarily of the same origin, has been observed in E. coli strains of quite different genetic constitution, as those carrying glnL mutations nonpolar to glnG displaying the GlnC phenotype (Chen et al., 1982; Bastarrachea et al., unpublished data).

Introduction of the glnF73::Tn5 allele into MX929 lead to strain MX931 (glnF73::Tn5 gln-76), the behavior of which was peculiar in several aspects. In glnF cells carrying the site corresponding to the gln-76 mutation in the wild state, i.e. MX848 (Table 3), the glnF mutation causes glutamine auxotrophy. In these cells only repression takes place since no activator is present. In strain MX931, however, the gln-76 mutation prevented glnF73::Tn5 from causing glutamine auxotropy by allowing synthesis of glutamine synthetase in amounts sufficient to support growth under ammonium assimilating conditions. Curiously enough, the glutamine synthetase activity made by MX931 cells was consistently higher, by a factor of 2, when the cells were grown in ammonium excess than when they were grown at low ammonium ion concentrations. From these results we wish to conclude that rather than being repressed by the products of the glnG and glnL genes, gln-76 was only able to mediate a weak expression of glnA in these cells probably due to interference by binding of the glnG product to its normal activation site, as in the presence of the glnF product.

Ours design to isolate mutations such as gln-76 precluded selection of cells overproducing glutamine synthetase in the absence of the glnG product. It could be anticipated that at least some of the mutations that arose were affected in the glnA promoter. The high constitutive level of glnA expression mediated by gln-76 readily suggests

that a high efficiency promoter was probably created by this mutation. Even though gln-76 made glnA expression independent of its normal activator system, it did not affect either the binding to its specific recognition site(s) or its functionality when such a activator was present. Other results described above indicate that gln-76 altered or destroyed a site near glnA where the repressor binds. We may tentatively conclude, therefore, that the binding sites for the activator and the repressor are not the same which is tantamount to saying that they are independent of each other. The results also indicate that if a high efficiency promoter was created by the gln-76 mutation, it should overlap, at least in part, with the binding domains of the repressor. Experimental proof in support to our suggestions is still lacking. Our efforts to this end may prove more difficult after recognition that the glnA regulatory region contains more than one DNA sequence which could function as promoters (Covarrubias and Bastarrachea, 1983). These findings raise another possibility, that the glnA operator region may be overlapped with one of the promoters, thus making both coding sequences susceptible to a single mutational event, which could be the case for gln-76. Only the location of the gln-76 mutation by base sequence analysis and identification of the start of the mRNA transcripts made from wild type and glnG74::Tn5 gln-76 DNA's which are now in progress in our laboratory, may shed some light on the mechanisms that are operative.

From the results presented in Table 3 it is clear that neither the normal pattern of adenylation of glutamine synthetase nor the inability of the cells to express the Ntr^+ (Aut^+) phenotype in the absence of either one or both the glnG and glnF functional products were altered by

gln-76. The phenotypic response of the strains to the glutamine analog, MS, however, deserves further comments.

Based on the irreversible inhibition of glutamine synthetase activity by MS in the presence of ATP (Ronzio and Meister, 1968; Ronzio et al., 1969; Rowe et al., 1969; Manning et al., 1969) we postulated that cells making abnormally small amounts of glutamine synthetase were more sensitive to growth inhibition by MS than wild type cells. In fact all the glnG mutants we have tested were hypersensitive to MS. Previous evidence from Betteridge and Ayling (1975) suggests that MS penetrates into S. typhimurium cell via the high affinity glutamine transport system. It is also known that one of the manifestations of the Ntr^- phenotype of S. typhimurium glnG mutants is a reduced ability to transport a number of amino acids inside the cells, including glutamine (Kustu et al., 1979b; Wei and Kustu, 1981). If the internal MS concentration attained by glnG cells is indeed diminished, it should be sufficient to titrate most of the reduced number of glutamine synthetase molecules made by these cells, in order to leave too few active enzyme molecules incompatible with cellular growth.

In our laboratory, accumulation of enzymatically inactive glutamine synthetase-MS molecular complexes has been shown to occur during growth of E. coli wild type cells on GHA-80uM MS medium (data not shown). Although this result can be taken in support to the titration hypothesis, we have found too many examples of strains synthesizing high glutamine synthetase activities and being MS^S . MX931 (glnF73::Tn5 gln-76), for instance, synthesized twice the glutamine synthetase activity made by wild MX614 cells when both were grown on high ammonium ion concen-

trations. Yet, under this growth condition, MX931 is sensitive and MX614 is resistant to 80 μ M MS. We have examined the growth response to MS of a variety of E. coli strains of different genetic constitution with regard to the gln regulatory genes. The results, which cannot be described in detail here, allow us to conclude that neither the presence or absence of (i) gln-76, nor (ii) of the activator or the repressor of glutamine synthetase or their individual components, can explain the phenotypes towards MS of our variety of strains, MX931 included. We even ignore to what extent accumulation of glutamine synthetase-MS complexes is responsible for the MS^S phenotype of glnG mutants. . Most probably what we are observing are the additive effects of MS acting on more than one cellular target; the only one identified, thus far, being the glutamine synthetase molecule. Up to now, we have succeeded in the isolation of a class of mutations in the glnA regulatory region of E. coli thanks to manipulation of their phenotypic response towards MS. Further experimentation along this line will probably led to new insights into this complex problem of regulation of glutamine biosynthesis.

Acknowledgements. We are grateful to Barbara Bachmann for her supply of strains, to Myriam Ortiz for expert technical assistance and to Patricia Anzures and Esperanza Ruiz for typing the manuscript. This work was supported, in part, by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México) grants PCCBNAL-001364 and PCCBBNA-005216.

References

Ausubel FM, Margolskee RF, Maizels N (1976) Mutants of Klebsiella pneumoniae in which expression of nitrogenase is independent of glutamine synthetase control. In: Recent Developments in Nitrogen Fixation, Newton W. Postgate JR, Rodriguez-Barrueco C (eds.), Academic Press, London pp 347-356

Ausubel FM, Reidel G, Cannon F, Peskin A, Margolskee R, (1977) Cloning nitrogen fixation genes from Klebsiella pneumoniae in vitro and the isolation of nif promoter mutants affecting glutamine synthetase regulation. In: Genetic Engineering for Nitrogen Fixation, Hollaender A (ed.), Plenum Press, New York, pp. 111-128

Ayling PD, Bridgeland ES, (1972) Methionine transport in wild type and transport defective mutants of Salmonella typhimurium. J Gen Microbiol 73:127-141

Bachmann BJ, Low KB (1980). Linkage map of Escherichia coli K-12, edition 6. Microbiol Revs 44: 1-56

Backman K, Chen Y, Magasanik B (1981) Physical and genetic characterization of the glnA-glnG region of the Escherichia coli chromosome. chromosome. Proc Natl Acad Sci USA 78: 3743-3747.

Bastarrachea F, Willetts NS (1968) The elimination by acridine orange of F30 from recombination-deficient strains of Escherichia coli K12. Genetics 59: 153-166

- Bastarrachea F, Brom S, Covarrubias AA, Osorio A, Bolivar F (1980)
Genetic characterization of mutations affecting glutamine biosynthesis and its regulation in Escherichia coli K12.
In: Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation, Mora J, Palacios R (eds.) Academic Press, New York pp. 107-121
- Berg DE, Davies J, Allet B, Rochaix J (1975) Transposition of R factor genes to bacteriophage λ . Proc Natl Acad Sci USA 72: 3628-3632
- Betlach M, Hershfield V, Chow L, Brown W, Goodman HW, Boyer HW (1976)
A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the EcoRI restriction and modification of DNA.
Fed Proc 35: 2037-2043
- Betteridge PR, Ayling PD (1975) The role of methionine transport-defective mutations in resistance to methionine sulphoximine in Salmonella typhimurium. Mol Gen Genet 138: 41-52
- Chen Y, Backman K, Magasanik B (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
- Covarrubias AA, Sanchez-Pescador R, Osorio A, Bolivar F, Bastarrachea F (1980) Col E1 hybrid plasmids containing Escherichia coli genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine. Plasmid 3: 150-164

- Covarrubias AA, Bastarrachea F (1983) Nucleotide sequence of the glnA control region of Escherichia coli. Mol Gen Genet in press
- De Lucia P, Cairns J (1969) Isolation of an E. coli strain with a mutation affecting DNA polymerase. Nature 224: 1164-1166
- Garcia E, Bancroft S, Rhee SG, Kustu S (1977) The product of a newly identified gene, glnF, is required for synthesis of glutamine synthetase in Salmonella. Proc Natl Acad Sci USA 74: 1662-1666
- Goldie H, Magasanik B (1982) Effects of glnL and other regulatory loci on regulation of transcription of glnA-lacZ fusions in Klebsiella aerogenes. J Bacteriol 150: 231-238
- Greene PJ, Heyneker HL, Bolivar F, Rodriguez RL, Betlach MC, Covarrubias AA, Backman K, Russel DJ, Tait R, Boyer HW (1978) A general method for the purification of restriction enzymes. Nucleic Acids Res 5: 2373-2380
- Guterman SK, Roberts G, Tyler B (1982) Polarity in the glnA operon: suppression of the Reg⁻ phenotype by rho mutations. J Bacteriol 150: 1314-1321
- Kustu S, Burton D, Garcia E, McCarter L, MacFarland N (1979a) Nitrogen Control in Salmonella: regulation by the glnR and glnF gene products. Proc Natl Acad Sci USA 76: 4576-4580
- Kustu SG, McFarland NC, Hui SP, Esmon B, Ames GF (1979b) Nitrogen control in Salmonella typhimurium: co-regulation of synthesis of glutamine synthetase and amino acid transport systems. J. Bacteriol 138: 218-234

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
- MacNeil D (1981) General method, using Mu-MudI dilysogens, to determine the direction of transcription of and generate deletions in the glnA region of Escherichia coli. *J. Bacteriol* 146: 260-268
- MacNeil T, MacNeil D, Tyler B (1982) Fine-structure deletion map and complementation analysis of the glnA-glnL-glnG region of Escherichia coli. *J Bacteriol* 150: 1302-1313
- Magasanik B (1982) Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Annu Rev Genet* 16: 135-168
- Manning JM, Moore S, Rowe WB, Meister A (1969) Identification of L-methionine S-sulfoximine as the diastereoisomer of L-methionine SR-sulfoximine that inhibits glutamine synthetase. *Biochemistry* 8: 2681-2685
- Marmur J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J Mol Biol* 3: 208-218
- McFarland N, McCarter L, Artz S, Kustu S (1981) Nitrogen regulatory locus "glnR" of enteric bacteria is composed by cistrons ntrB and ntrC: identification of their protein products. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 2135-2139
- Miller ES, Brenchley JE (1981) L-methionine SR-sulfoximine-resistant glutamine synthetase from mutants of Salmonella typhimurium. *J Biol Chem* 256: 11307-11312

- Miller J (1972) Experiments in Molecular genetics. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Pahel G, Zelenetz AD, Tyler BM (1978) gltB gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in Escherichia coli. J Bacteriol 133: 139-148
- Pahel G, Tyler B (1979) A new glnA-linked regulatory gene for glutamine synthetase in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci USA 76: 4544-4548
- Pahel G, Rothstein DM, Magasanik B (1982) Complex glnA-glnL-glnG operon of Escherichia coli. J Bacteriol 150: 202-213
- Ronzio RA, Meister A (1968) Phosphorylation of methionine sulfoximine by glutamine synthetase. Proc Natl Acad Sci USA 59: 164-170
- Ronzio RA, Rowe WB, Meister A (1969) Studies on the mechanism of inhibition of glutamine synthetase by methionine sulfoximine. Biochemistry 8: 1066-1075
- Rothstein DM, Magasanik B (1980) Isolation of Klebsiella aerogenes mutants cis-dominant for glutamine synthetase expression. J Bacteriol 141: 671-679
- Rothstein DM, Pahel G, Tyler B, Magasanik B (1980) Regulation of expression from the glnA promoter of Escherichia coli in the absence of glutamine synthetase. Proc Natl Acad Sci USA 77: 7372-7376

Bacterial strains

Genotype	Source or derivation
Δ (pro-lac) <u>galE</u> <u>ilv-680</u> <u>thi-1</u>	Bastarrachea et al. (1980)
Δ (pro-lac) Δ (<u>gal</u> <u>attλ</u> <u>bio</u>) <u>ilv-680</u> <u>thi-1</u>	Bastarrachea et al. (1980)
<u>leu-6</u> <u>proA2</u> <u>lacY1</u> <u>galk2</u> <u>rpsL20</u> <u>glnA70</u> <u>thi-1</u> <u>hsdSx</u> <u>B^m</u>	Covarrubias et al. (1980)
Δ (pro-lac) Δ (<u>gal</u> <u>attλ</u> <u>bio</u>) <u>ilv-680</u> <u>glnA71::Tn5</u> <u>thi-1</u>	Bastarrachea et al. (1980)
Δ (pro-lac) <u>galE</u> <u>ilv-680</u> <u>glnA71::Tn5</u> <u>thi-1</u>	P1 (MX727) x MX614; Km ^R Gln ⁻ selection
Δ (pro-lac) Δ (<u>gal</u> <u>attλ</u> <u>bio</u>) <u>supF</u> <u>ilv-680</u> <u>zih::Tn5</u> Δ <u>Tn5</u> <u>thi-1</u> <u>lamB</u>	Bastarrachea et al. (1980)
<u>proA2</u> <u>tfr-3</u> <u>lacY1</u> <u>supE44</u> <u>galk2</u> <u>his-4</u> <u>rpsL8</u>	B. Bachmann
<u>ADE2</u> (<u>ilvE-argH</u>) <u>thi-1/F'14</u>	
<u>proA2</u> <u>tfr-3</u> <u>lacY1</u> <u>supE44</u> <u>galk2</u> <u>his-4</u> <u>rpsL8</u>	Ethyl metanesulphonate mutagenesis of ABI206
<u>ADE2</u> (<u>ilvE-argH</u>) <u>thi-1/F'14</u> <u>rha</u>	
<u>proA2</u> <u>tfr-3</u> <u>lacY1</u> <u>supE44</u> <u>galk2</u> <u>his-4</u> <u>rpsL8</u>	P1 (MX727) x MX818, Rh ⁺ [Km ^R Gln ⁻] selection
<u>ADE2</u> (<u>ilvE-argH</u>) <u>thi-1/F'14</u> <u>glnA71::Tn5</u>	
<u>proA2</u> <u>tfr-3</u> <u>lacY1</u> <u>supE44</u> <u>galk2</u> <u>his-4</u> <u>rpsL8</u>	P1 (MX705) x MX818; Rha ⁺ [Gln ⁻] selection
<u>ADE2</u> (<u>ilvE-argH</u>) <u>thi-1/F'14</u> <u>glnA70</u>	
Δ (pro-lac) <u>galE</u> <u>glnF73::Tn5</u> <u>ilv-680</u> <u>thi-1</u>	P1 (MX615, λ Kan2 infected) x MX614; Km ^R , 44% cotransductible with argG
Δ (pro-lac) Δ (<u>gal</u> <u>attλ</u> <u>bio</u>) <u>supF</u> <u>ilv-680</u> (<u>glnGLA-rha</u>)	Heat induction of MX752
<u>zih::Tn5</u> <u>thi-1</u> <u>lamB</u>	

Genotype	Sources or derivation
Δ (pro-lac) Δ (gal att λ bio) supF ilv-680 Δ (glnA-rha) zih::Tn5 thi-1 lamB	Heat induction of MX752
proA2 tfr3 lacY1 supE44 galk2 his-4 rpsL8	P1 (MX902) x ABL206; Km ^R [Aut ⁻] selection
Δ E2 (ilv-argH) thi-1/F'14 glnG74::Tn5	This paper
Δ (pro-lac) gale ilv-680 glnG74::Tn5 thi-1	Precise excision of Tn5 in MX850
Δ (pro-lac) (gal att λ bio) supF ilv-680 Δ (glnGLA-rha) thi-1 lamB	P1 (MX848) x MX914; Km ^R selection
Δ (glnGLA-rha) thi-1 lamB	MS ^R spontaneous mutant of MX902
Δ (pro-lac) gale ilv-680 glnG74::Tn5 gln-76 thi-1	Aut ⁺ [Km ^S] spontaneous derivative of MX927
Δ (pro-lac) gale ilv-680 gln-76 thi-1	P1 (MX848) x MX929; Km ^R [Aut ⁻] selection
Δ (pro-lac) gale glnF73::Tn5 ilv-680 gln-76 thi-1	Mating ABL206 x MX902; Ilv ⁺ [His ⁺] selection
Δ (pro-lac) gale ilv-680 glnG74::Tn5 thi-1/F'14	Mating MX821 x MX902; Ilv ⁺ [His ⁺] selection
Δ (pro-lac) gale ilv-680 glnG74::Tn5 thi-1/F'14 glnA71::Tn5	Mating ABL206 x MX927; Ilv ⁺ [His ⁺] selection
Δ (pro-lac) gale ilv-680 glnG74::Tn5 gln-76 thi-1/F'14	Mating MX821 x MX927; Ilv ⁺ [His ⁺] selection
Δ (pro-lac) gale ilv-680 glnG74::Tn5 gln-76 thi-1/F'14 glnA71::Tn5	MS ^R spontaneous mutant of MX931
Δ (pro-lac) gale glnF73::Tn5 ilv-680 gln-76 thi-1 msr-1	MS ^R spontaneous mutant OF MX931
Δ (pro-lac) gale glnF73::Tn5 ilv-680 glnG77 gln-76 thi-1	M.C. Gómez-Eichelman
nala thya polA1	

Table 2. Mapping of glnG74::Tn5 by transduction

Pl donor	Recipient	Marker		% Cotransduction
		Selected	Unselected	
W3110 (<u>polA1</u>)	MX902 (<u>glnG74::Tn5</u>)	Aut ⁺	MMS ^S	70 (284/406)
MX902	MX727	Gln ⁺	Aut ⁻ MS ^S	93 (340/365)

3. Phenotypic characterization of gln-76 in different genetic backgrounds

Strain	Relevant genotype	Gln	Aut	Ms	Glutamine synthetase		
					GLA	GHA	GglN
Wild type		+	+	Resistant	1990(4)	260(9)	1760(6)
Δ (<u>glnA-glnG</u>)/F'14		+	+	Resistant	1220	190	1470
<u>glnF73</u> ::Tn5		-	-				10
<u>glnG74</u> ::Tn5		+	-	Sensitive	20(8)	50(6)	50(9)
<u>glnG74</u> ::Tn5 <u>gln-76</u>		+	-	Resistant	4130(5)	1870(11)	2860(6)
<u>gln-76</u>		+	+	Resistant	1970(5)	530(10)	1400(5)
<u>glnF73</u> ::Tn5 <u>gln-76</u>		+	-	Sensitive	150(4)	600(9)	370(7)
<u>glnG74</u> ::Tn5/F'14		+	+/-	Resistant	n.d.	120	1960
<u>glnG74</u> ::Tn5/F'14 <u>glnA71</u> ::Tn5		+	-	Resistant	n.d.	810	2180
<u>glnG74</u> ::Tn5 <u>gln-76</u> /F'14		+	+/-	Resistant	n.d.	1190	1850
<u>glnG74</u> ::Tn5 <u>gln-76</u> /F'14 <u>glnA71</u> ::Tn5		+	-	Resistant	n.d.	1550	2140
<u>glnF73</u> ::Tn5 <u>gln-76</u> <u>msr-1</u>		+	-	Resistant	150(4)	540(8)	270(7)
<u>glnF73</u> ::Tn5 <u>gln-76</u> <u>glnG77</u>		+	-	Resistant	4180(5)	1390(11)	2670(6)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Table 4 Mapping of the gln-76 mutation by transduction

P1 donor	Recipient	Marker		% Cotransduction	GS activity ^a
		Selected	Unselected		
MX927 (<u>glnG74::Tn5 gln-76</u>)	MX727 (<u>glnA71::Tn5</u>)	Gln ⁺	R Km	82	Constitutive (40/40) ^b
MX927	MX822	Gln ⁺	R Km	96	Constitutive (40/40) ^b
MX852 Δ (<u>rha-glnA</u>)	MX927	Aut ⁺	S Km	100	Constitutive (14/14) ^c

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Table 5 Inhibition of Glutamine Synthetase activity by 80 μ M MS
in cell-free extracts of different E. coli strains

Strain	Without Mg ²⁺		With 60 mM Mg ²⁺	
	-MS	+MS % Inhibition	-MS	+MS % Inhibition
MX614	1320	170	1000	63
MX902	35	6	35	5
MX927	1900	160	1870	180
MX931	130	16	150	17
MX981	150	36	91	12
MX982	2160	108	2000	360

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Footnotes for Tables

Table 2. MMS, Methyl methanesulphonate; MS, L-methionine-DL-sulfoximine.

The superscripts indicate sensitivity to 0.04% MMS or to 80 μ M MS.

Table 3. In the cases where the γ glutamyl transferase assays were run with and without 60 mM Mg^{2+} , the average state of adenylation, \bar{n} , is indicated in parenthesis; n.d., not determined.

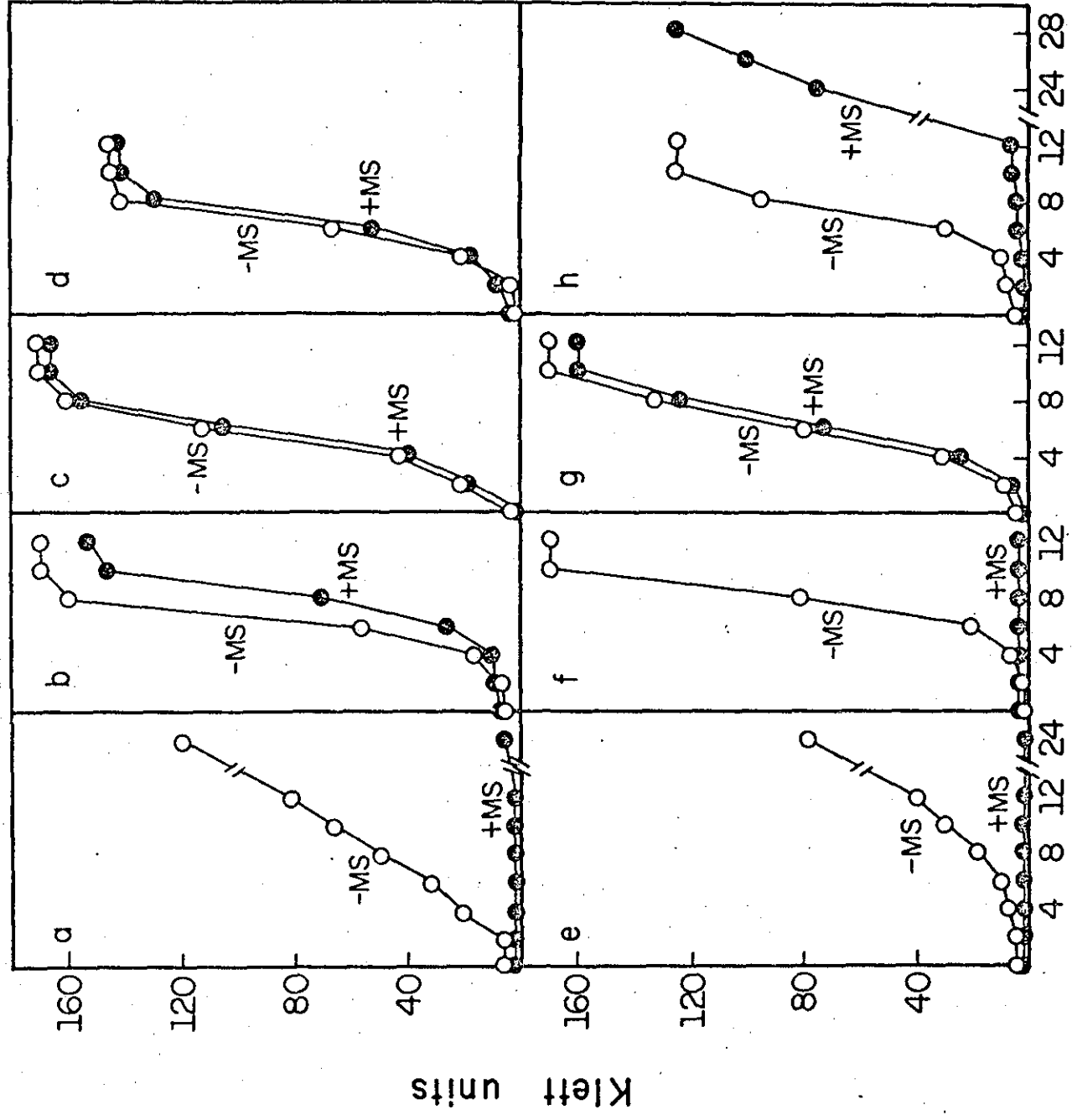
Table 4. ^aAfter growth of individual transductants in GHA medium
^bHigh level constitutivity (qualitative assay)
^c2-fold derepressed as compared to wild type (quantitative assay).

Table 5. Glutamine synthetase activities were determined in cell-free extracts prepared from strains grown on GLA medium. MS (final concentration of 80 μ M) was added 10 min. before the reactions were started by the addition of L-glutamine.

Legends for the Figures

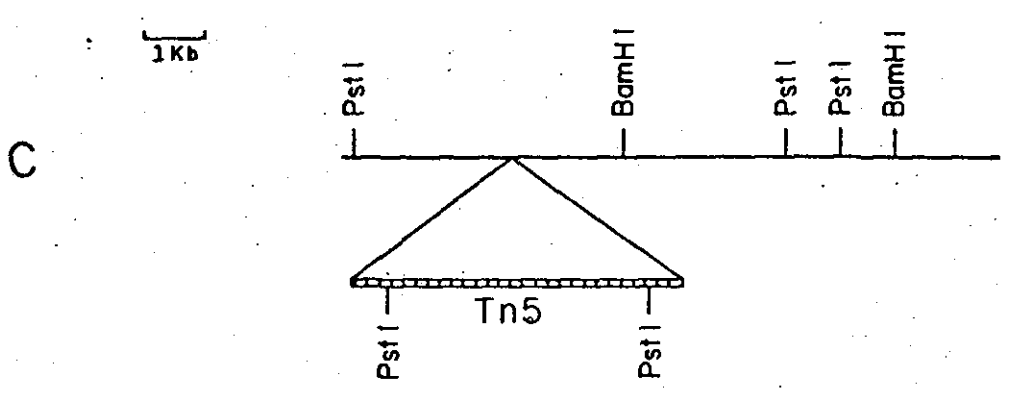
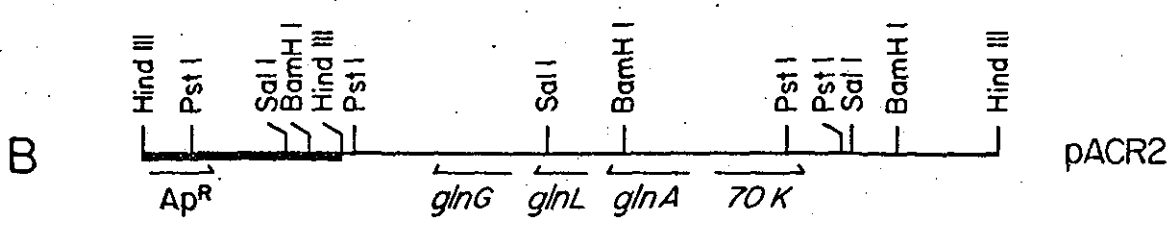
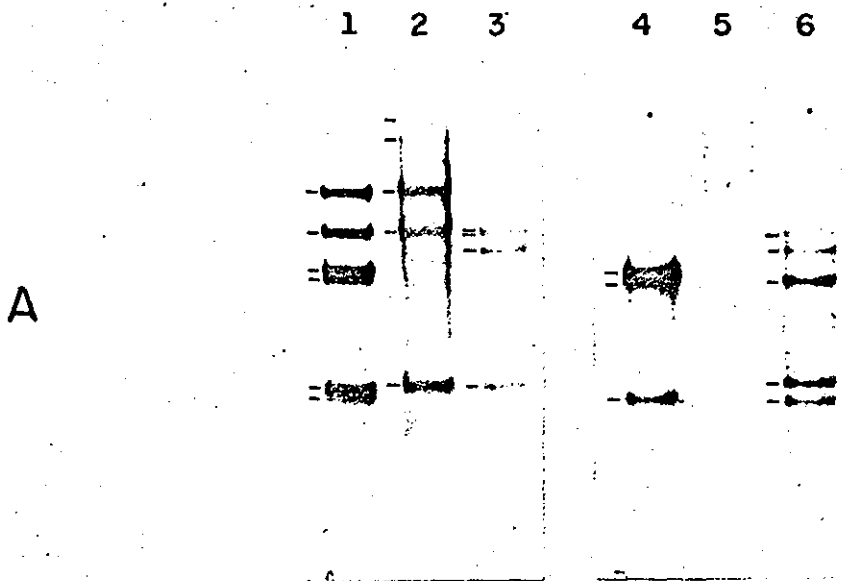
Fig. 1. Growth responses of strains MX614 (wild) and MX902 (glnG74::Tn5) in minimal medium at 37°C with (o) or without (o) 80 µM MS, as a function of the nitrogen source. a to d, MX614; e to h, MX902. a and e, GLA medium; b and f, GHA medium; c and g, Ggln medium; d and h, GHA medium plus 80 µM L-methionine.

Fig. 2A-C Blotting hybridization of BamHI + PstI digests of MX615 and MX902 E. coli chromosomal DNA's with ³²P-pACR2 (lanes 1-3) or ³²P-pACR10 (lanes 4-6) DNA's as probes for glnG and Tn5, respectively. A lane 1, pCR2 vs. pACR2; lane 2, MX615 vs pACR2; lane 3, MX902 vs. pACR2; lane 4, pACR2 vs. pACR10; lane 5, MX615 vs pACR10, lane 6, MX902 vs pACR10. B Diagram of plasmid pACR2. C Diagram of the Tn5 insertion in MX902; the BamHI sites of Tn5 are not shown since its orientation in MX902 is not known; very likely, in lane 6 bands 3 to 6 (from top to bottom) correspond to BamHI-Tn5 internal fragments while bands 1 and 2 (of 2.77 kb and 2.55 kb, respectively) are the fusions between Tn5 and chromosome. The black bars correspond to pBR327 DNA, the thin lines to chromosomal DNA and the cross-hatched bars to Tn5. The arrows indicate the direction of gene transcription.



TESIS CON

Hours of incubation



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS ADICIONALES

Construcción de un plásmido conteniendo el promotor para glnL.

Con el objetivo de probar si el fragmento de DNA que se une a RNAP que contiene la región entre glnA y glnL lleva un promotor funcional, el fragmento de Eco R1 - Eco R1 de 1.3 kb del plásmido pACR5 (Figura 3) se insertó en el sitio de Eco R1 del plásmido "probador de promotores" RW33. Este plásmido es un derivado de pBR327 que carece del promotor para el gene tet, pero conserva el sitio de unión a ribosomas necesario para la síntesis de la proteína que confiere resistencia a tetraciclina (Tc) (81); de tal manera que al insertar un fragmento que contenga un promotor, inmediatamente antes del gene tet, el plásmido resultante debería conferir resistencia a Tc. (Ver Figura 4).

Así pues, se llevó a cabo la reacción de ligasa entre el fragmento Eco R1-Eco R1 (1.3 kb), previamente purificado, y el plásmido RW33 digerido con Eco R1, y se transformó la cepa RR1 (pro⁻, leu⁻, thi⁻, recA⁻, r_B⁺ m_B⁻). Las transformantes se seleccionaron en un medio con ampicilina (Ap) y se contraseleccionaron en un medio con Tc. Se purificó DNA de plásmido (en pequeña escala) de colonias con fenotipo tanto Ap^R Tc^R como Ap^R Tc^S y se analizó con enzimas de restricción. Aquellas que resultaron Ap^R Tc^R contenían un plásmido recombinante con el fragmento de Eco R1 - Eco R1 insertado en la orientación en la que se transcriben glnA y glnL (Figura 3), en tanto que las Ap^R Tc^S contenían plásmidos con el mismo fragmento pero

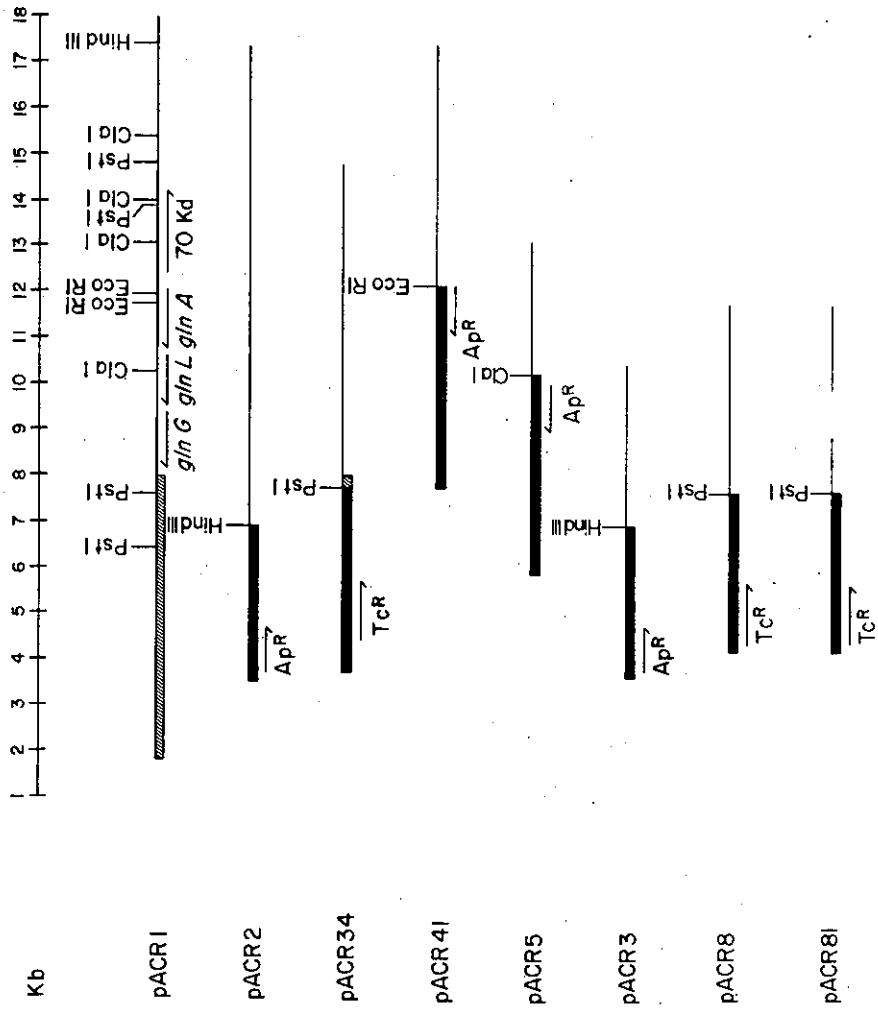


FIGURA 3

FIGURA 3. Mapas de restricción de diferentes plásmidos conteniendo diferentes fragmentos de la región glnA-glnG de E. coli.

La parte superior corresponde a la escala en kilobases (Kb). Las líneas continuas corresponden al DNA cromosomal clonado, las barras negras corresponden al vehículo molecular, ya sea pBR322 ó pBR327, en tanto que la barra rayada corresponde a ColE1. Las flechas indican la dirección de transcripción de los genes respectivos.

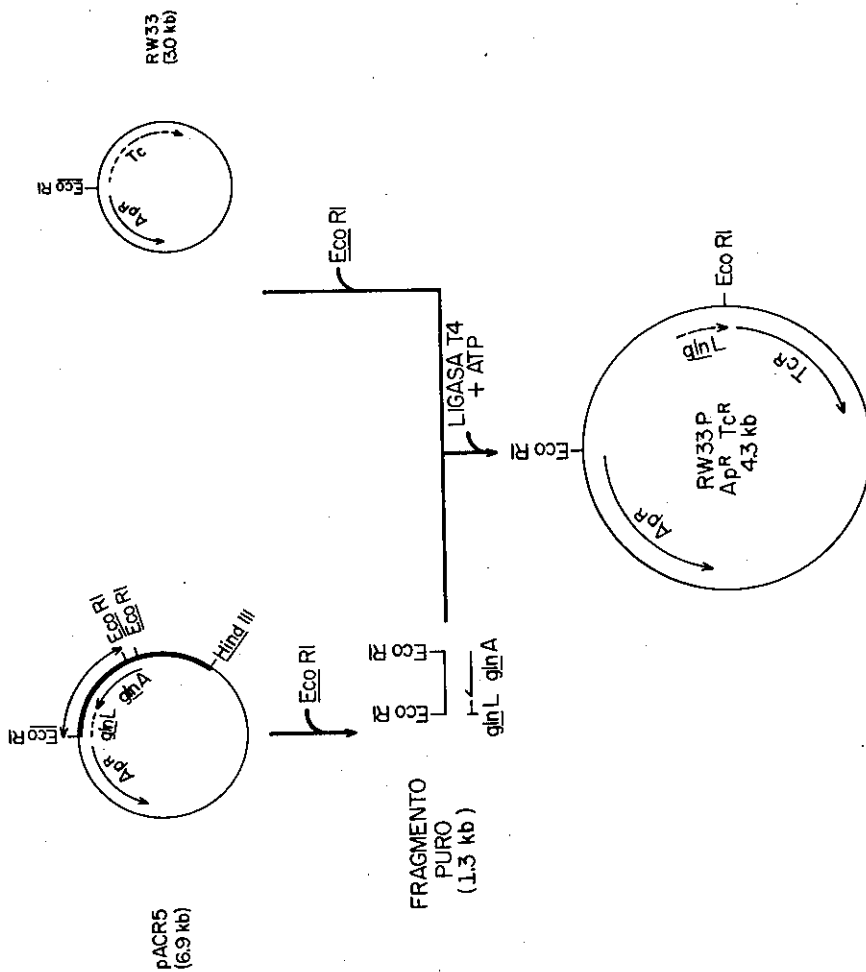


FIGURA 4

FIGURA 4. Construcción de un plásmido conteniendo el promotor de glnL.

En este esquema se muestra la estrategia seguida para la construcción del plásmido RW33P_L. Las flechas indican la dirección de transcripción de los genes respectivos. Las figuras no se encuentran a escala.

insertado en la orientación contraria, o bien, el mismo RW33 sin inserto.

Esto confirmaba la existencia de un promotor funcional entre glnA y glnL.

Transcripción in vitro de fragmentos conteniendo la región de control de glnA.

El sistema de transcripción in vitro se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por Majors (82), y por Russell y Bennett (83) con algunas modificaciones: Los nucleótidos fríos (ATP, GTP y CTP) se usaron a una concentración de 40mM; el nucleótido radioactivo (γ P³²-UTP) se utilizó a una concentración de 0.4mM. La concentración de KCl fue de 100mM y se usaron 2.5×10^{-7} μ mol de templado. Se utilizaron 1.5 μ g de RNAP por reacción.

El fragmento de SmaI-EcoRI de 731 pb (SR3) y el fragmento de HinfI-HinfI de ~464 pb (H4) se utilizaron como templados en la reacción de transcripción (Figura 5).

Una vez llevada a cabo la reacción, ésta se paro con una solución conteniendo acetato de amonio (2M), EDTA (2mM) y RNA_t (100 μ g), se extrajo con fenol y se precipitó con etanol (-20°C). La pastilla de RNA se resuspendió en una mezcla conteniendo formamida, azul de bromofenol (0.05%) y cianol de xileno (0.05%), y se sometió a electroforesis en gel de acrilamida (6%)-urea (7M).

Como se puede ver en la figura 5, para el caso del fragmento SR3 se observan tres bandas radioactivas (731pb, 340pb y 170pb). La primera y más intensa migra con un tamaño similar al fragmento original lo cual sugiere que existe iniciación inespecífica a

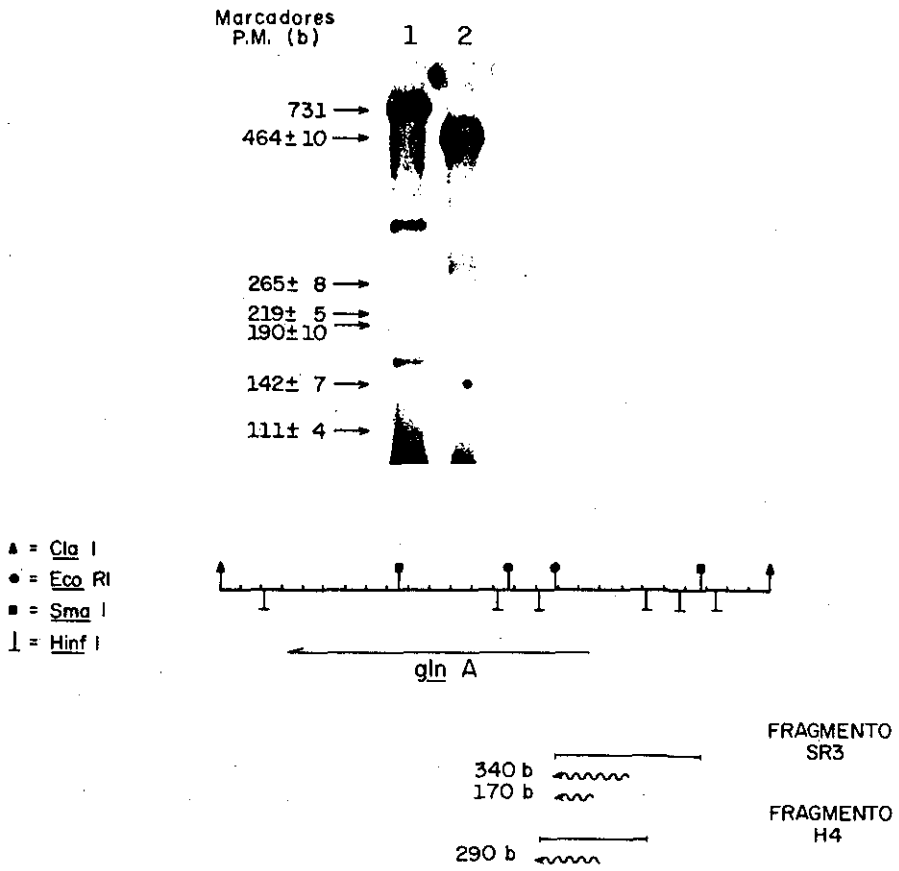


FIGURA 5

FIGURA 5. Transcripción in vitro de fragmentos de DNA provenientes de la región de control de glnA.

La transcripción in vitro se llevó a cabo como se describe en la sección de Resultados Adicionales. Los productos de la reacción fueron sometidos a una electroforesis en gel de acrilamida (5%)- urea(7M). La autorradiografía de este gel se muestra en la parte superior de la figura. El carril 1 corresponde a los productos de transcripción provenientes del fragmento SR3 (731 pb), en tanto que el carril 2 corresponde a aquéllos provenientes del fragmento H4 (\sim 464 pb). Los números y las flechas a la izquierda del gel indican los pesos moleculares y la migración, respectivamente, de RNA's provenientes de Trypanosoma cruzi (donados generosamente por R. Hernández y M. Castañeda), los cuales fueron usados como marcadores de peso molecular, ya que sus pesos moleculares han sido cuidadosamente calibrados. El esquema en la parte inferior muestra el fragmento de ClaI, contenido en pACR5, así como la localización de los fragmentos usados como templados, en donde se indica el inicio aproximado de los transcritos obtenidos (w).

partir de uno de los extremos. Las otras bandas parecen ser el resultado de iniciaciones en dos sitios específicos contenidos en este fragmento de DNA. En el caso del fragmento H4 resultan ✓ dos bandas (~ 464 pb y ~ 290 pb), de las cuales la primera corresponde, como en el caso anterior, a un transcrito cuya iniciación parece ocurrir en uno de los extremos del templado, en tanto que el sitio de iniciación para el RNA de menor peso molecular tiene una localización similar a la que se deduce para el RNA de 170b proveniente del fragmento SR3; ésto es, entre posiciones 620 y 660 (Ver figura 5, las posiciones se refieren a la secuencia nucleotídica reportada en el artículo "Nucleotide sequence of the glnA control region").

Es importante hacer notar que las condiciones en las que se llevaron a cabo este tipo de experimentos no son muy cercanas a las condiciones fisiológicas, ya que el sistema carece de las proteínas reguladoras; por lo tanto, es posible que los sitios de iniciación que se deducen no sean los que normalmente se utilizan para iniciar la transcripción de glnA.

DISCUSION

Como ya se ha mencionado la biosíntesis de GS responde a ciertas señales que reflejan la disponibilidad de nitrógeno en la célula bacteriana. Una de las características que hace que este sistema sea sumamente complejo e interesante es el número de señales a las que responde y el número de moléculas reguladoras involucradas en la transmisión de estas señales. Con la finalidad de entender la naturaleza molecular de este sistema así como los mecanismos por los cuales se regula la expresión de glnA nos propusimos construir un sistema definido que conservara estas características. El primer paso hacia esta meta fue la clonación de la región de glnA del cromosoma de E. coli y la localización de este gene en una región definida de DNA. Posteriormente, gracias al aislamiento en nuestro laboratorio de mutaciones cromosomales tanto en glnG como en glnL (25, L. Segovia, J:C. Urbina y F. Bastarrachea, datos no publicados), se identificaron y localizaron estos genes en el fragmento de DNA originalmente clonado (50, M. Rocha y A. Covarrubias, datos no publicados), y fue posible, utilizando el sistema de minicélulas, identificar ambos productos, cuyos pesos moleculares (51Kd y 36Kd, respectivamente) están de acuerdo a los obtenidos por McFarland et al (54) en un sistema in vitro de transcripción-traducción acoplados. Además de estos tres genes (glnA, glnL y glnG) el plásmido híbrido pACR1 contiene un gene que codifica para un polipéptido de aproximadamente 70Kd, el cual pareciera no tener ninguna función relevante en el metabolismo nitrogenado de la bacteria, ya que las actividades de GS ob

tenidas, en diferentes condiciones, de cepas de E. coli conteniendo plásmidos híbridos, en donde este gene se encuentra incompleto, no muestran una variación significativa.

Aún cuando algunos datos de los presentados aquí, así como resultados obtenidos para la misma región de DNA en S. typhimurium (55), sugerían que la transcripción de glnA se llevaba a cabo en el mismo sentido que aquéllas para el gene de la proteína de 70Kd; posteriormente, una vez demostrada por evidencia de tipo genético la existencia de glnG (26,36), datos de mapeo genético indicaron que glnA se transcribía en el mismo sentido que glnG y, por lo tanto, en sentido contrario al gene para la proteína de 70Kd. Estos resultados fueron confirmados por el análisis en minicélulas de polipéptidos codificados en plásmidos con deleciones, diferentes a las anteriores, en esta región, y por análisis de secuencia nucleotídica (49,50,56).

La localización de los genes glnL y glnG y la determinación de su dirección de transcripción (47,49,51, M. Rocha y A. Covarrubias, datos no publicados) con respecto a glnA, así como algunos otros datos que ya han sido tocados en la introducción, sugerían que estos tres genes se comportaban como un operón en condiciones de exceso de nitrógeno en donde la transcripción de glnG parece ser independiente del promotor de glnA (26,32). Para explicar esta última observación Pahel et al (51) postularon la existencia de un segundo promotor localizado entre glnA y glnG. Los experimentos de unión a RNAP mostrados aquí que indican la presencia de una región de DNA con afinidad a esta enzima localizada entre glnA y glnL, así como la resistencia a tetraciclina adquirida por células conteniendo el plásmido RW33p_L (Ver figura 4), demuestran la

existencia de un promotor funcional del cual se iniciaría la transcripción tanto de glnL como de glnG en condiciones de exceso de nitrógeno. Esto es congruente con la idea de que, tanto el producto de glnL como de glnG están involucrados en la represión de la síntesis de GS y, que en estas condiciones se requeriría de una síntesis acoplada de ambos productos. Sin embargo, entre los fragmentos que unen RNAP, además de los correspondientes a los promotores de glnA y glnL, es posible identificar otro fragmento de DNA el cual se encuentra localizado entre glnL y glnG. La idea de un promotor para glnG se ve reforzada por el hecho de que el plásmido pACR3, el cual contiene la región entre glnL y glnG, y este último gene intacto, es capaz de complementar mutaciones cromosomales en glnG. La posibilidad de que glnG se esté transcribiendo de un promotor del vehículo molecular resulta poco probable, ya que, primero, el promotor para el gene tet se ve interrumpido al ser introducido el fragmento de ClaI-HindIII conteniendo glnG, segundo, la orientación en la cual se encuentra clonado el fragmento evita que transcripción proveniente del promotor anti-tet entre hacia glnG, y tercero, la secuencia nucleotídica alrededor de la fusión entre el vehículo molecular y el fragmento no muestra ninguna posible caja de Pribnow capaz de generar un promotor artificial.

Aún cuando evidencia proveniente de estudios de la expresión de β -galactosidasa de inserciones de Mud1(lac) en glnA, glnL y glnG (51,57) y de la supresión del fenotipo Ntr⁻ de mutaciones puntuales en glnA por mutaciones en rho (58) sugieren que glnA, glnL y glnG constituyen un operón; existen otros resultados donde

mutaciones que cambian la fase de lectura, ya sea en glnL o en glnG sólo afectan la expresión de uno de los productos pero no la del otro (38,54), a pesar de que este tipo de mutaciones son altamente polares. De acuerdo con estas observaciones, Backmann et al (49) han descrito una delección dentro de glnL que no es polar sobre glnG; además, existen mutaciones por inserción en glnA (26, 57) o en glnL (J.C. Urbina y F. Bastarrachea, datos no publicados) en las cuales parece haber expresión de glnG. Por lo tanto, resulta factible pensar que glnG se transcriba de su propio promotor en condiciones tales que la célula requiera mayores niveles de este producto; por ejemplo, situaciones en las que ocurran cambios bruscos en las concentraciones intracelulares de amonio.

Una de las preguntas que surgen al considerar que glnA, glnL y glnG forman parte de la misma unidad transcripcional en condiciones de limitación de nitrógeno intracelular se refiere a los niveles del producto de glnL en estas condiciones. Si consideramos que el producto de glnL es una molécula que está involucrada en el control negativo de glnA resultaría lógico pensar que la síntesis de este producto ocurra en condiciones de exceso de nitrógeno y, que cuando la disponibilidad de nitrógeno esté limitada exista un mecanismo que prevenga una concentración relativamente alta del mismo. Las actividades de β -galactosidasa de cepas con inserciones de Mud1 (lac) en glnL reportadas por Gutterman et al (58) indican que hay una mayor expresión de este gene en condiciones de limitación de nitrógeno que en exceso. Sin embargo, la cantidad del producto de glnL siempre es menor en relación al producto de

glnG cuando se analizan los productos codificados por plásmidos conteniendo la región glnA-glnL--glnG (59, M. Rocha y A. Covarrubias, datos no publicados). Esto es más notorio cuando la expresión tanto de glnL como de glnG proviene de un promotor altamente eficiente, como sucede en el caso del plásmido pL-glnLG donde un fragmento de DNA conteniendo el extremo carboxilo de glnA, y glnL y glnG completos ha sido insertado inmediatamente después del promotor P_L del fago lambda. Células conteniendo este plásmido sobreproducen el producto de glnG de tal manera que constituye aproximadamente un 5% de la proteína total (M. Vázquez M. Rocha y A. Covarrubias, datos no publicados). Sin embargo, el producto de glnL no es detectable, aún en estas condiciones. Estos resultados sugieren que existe un mecanismo postranscripcional que regula los niveles del producto de glnL cuando éste gene se transcribe a partir del promotor de glnA. Así pues, es posible que exista una secuencia de DNA entre glnA y glnL que esté involucrada en este mecanismo, ya sea formando estructuras secundarias en el RNAm que oculten el sitio de unión a ribosomas necesario para la traducción de glnL, o bien, que sirva como sitio de reconocimiento para un represor (el producto de glnG, o el mismo producto de glnL) que haga menos eficiente su traducción. Otra posible explicación a la baja síntesis del producto de glnL sería la presencia de codones "poco usados" en glnL lo cual tendría como consecuencia una baja en la eficiencia de traducción como ya ha sido reportado para otros operones en E. coli (84).

La manera como se expresa este operón ha resultado bastante compleja. Es posible que cada gene del operón posea un promotor propio, de tal manera que puedan existir diferentes familias de transcritos de esta región dependiendo de la disponibilidad de nitrógeno. También, podría existir un mecanismo adicional que involucre secuencias dentro de esta misma región que se encargue de modular los niveles de las proteínas reguladoras.

Una de las regiones de éste operón que despierta gran interés es la región de control de glnA. Esta región debe contener sitios de reconocimiento tanto para el complejo-activador, como para el complejo-represor. Tan sólo desde el punto de vista interacción proteína-DNA-función parecería ser un sistema singular ya que, como se ha mencionado, tanto el activador como el represor parecen estar constituidos por más de una proteína.

Una vez localizada la región regulatoria de glnA en el fragmento de DNA clonado, decidimos obtener su secuencia de pares de bases, como primer paso en la identificación de aquellas regiones importantes para la promoción, activación y represión tanto de glnA como del resto del operón, lo cual formaría parte de la estrategia para llegar a tener un esquema más completo sobre los mecanismos moleculares para la regulación de los genes involucrados en la asimilación del nitrógeno.

Durante el análisis de la secuencia nucleotídica obtenida se observó lo siguiente:*

1) Un probable sitio de unión de ribosomas o secuencia de Shine-Dalgarno, AGGAGA, que presenta una homología de 83% con la

secuencia consenso (60), y que se encuentra localizada a 7pb del codón de iniciación.

2) Tres regiones que presentan cierta homología con la secuencia para un promotor consenso (Ver Figura 6). Ninguna de las probables "regiones -35" presentan una homología significativa con la consenso. De las secuencias consideradas como probables "cajas de Pribnow" o "regiones -10", aquellas correspondientes a los promotores P_{A-3} y P_{A-2} presentan un 86% de homología con el consenso, la primera (61), y un 100% de homología con la "región -10" del promotor para el operón lac la segunda (61). La "región -10" del promotor P_{A-1} presenta una homología de 71% con la consenso, sin embargo, carece de una de las T'_S más conservadas en los promotores procariotes analizados (61, 62). Por otro lado, el número de nucleótidos entre la "región -35" y la "región -10" de cada uno de los probables promotores se encuentra dentro de lo esperado para un promotor procariote (61, 63). También es interesante mencionar que el promotor denominado como P_{A-3} presenta un sitio para iniciación de transcripción muy conservado i.e CAT, a la distancia adecuada de acuerdo al análisis de Siepenlist y Gilbert (61). La posibilidad de que más de que más de un promotor sea funcional in vivo resulta interesante, pues es posible que uno responda a ciertas señales, y otro a otras diferentes; como sucede para el operón gal, donde la trans-

* Las posiciones aquí señaladas para los pares de bases se refieren a la secuencia nucleotídica reportada en el artículo "Nucleotide sequence of the glnA control region", el cual se encuentra incluido en esta tesis.

SITIO DE UNION DE RIBOSOMAS 672 UCC UCUCA
 16S RNA EXTREMO 3' AUUCCUCCACUAG
 SITIO DE INICIACION DE TRADUCCION 686 ATG

PROMOTOR IDEAL
 -35 TGTTGACAATT -12-14bp- TATPuATPu -5-6bp-
 -10
 SITIO DE INICIACION Pu

POSICION

PA-1 600 CGCTTTATCTTT 19 bp ATAATTG ----- AT
 PA-2 527 GTGCAGCCCTTT 15 bp CATGATA ----- CT
 PA-3 477 TGCTTAATGTTT 13 bp TATATTG ----- CA

P_{lac} GGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGA
P_{lacI} GACACCATCGAATGGCGCAAAACCCTTTCGGGTATGGCATGATAGGGCCC
P_{araBAD} AGGGATCCTACCTGACGCTTTTATGCAACTCTACTGTTCTCCATA
P_{1gal} ATTTATTCCATGTCACACTTTTCGCATCTTTGTTATGCTATGGTTATTCA
P_{dhuA} GTAGAATGCTTTGCTTTCGGCTGATTAATGGCAGCATAGTC
P_{his} TTGCTTTCTAACGTGAAAGTGGTTAGGTTAAAAGACA
P_{asnA} TTGATGATTCATCTATTTAGCCTTCTTTTAAATGAAATCAAAAG

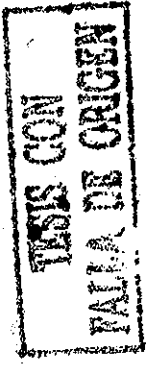


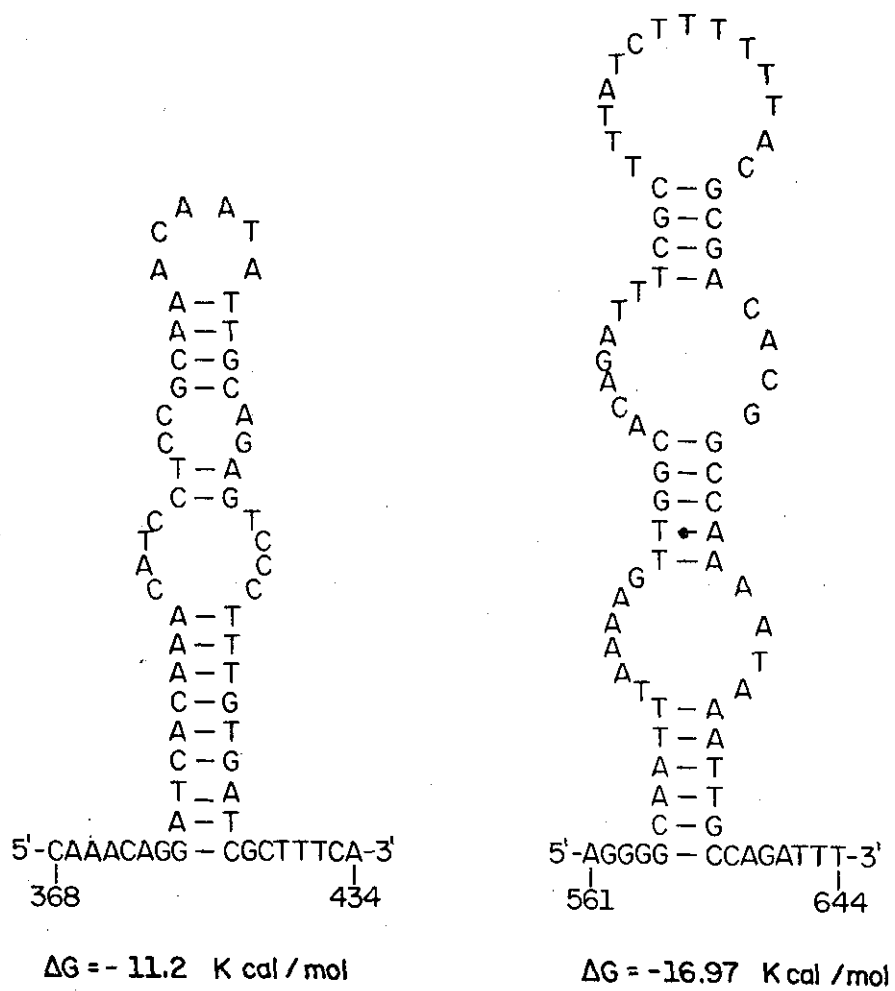
FIGURA 6. Probables promotores en la región de control de glnA. En la primera línea se muestra la secuencia considerada como el sitio de unión a ribosomas para glnA, así como la posición en la cual se encuentra localizada con respecto a la secuencia nucleotídica reportada en el artículo "Nucleotide sequence of the glnA control region" el cual está incluido en esta tesis. La segunda línea muestra la secuencia consenso para el sitio de unión a ribosomas, la cual corresponde al extremo 3' del RNA 16S. En la tercera línea se indica la localización del codón de iniciación (ATG). La secuencia del promotor ideal, mostrada en la cuarta línea, fue tomada de la referencia 61. Los números sobre las líneas punteadas indican el número de pares de bases entre las secuencias indicadas. Los posibles promotores para glnA fueron numerados arbitrariamente, siendo P_{A-1} el más cercano al extremo correspondiente al amino terminal de GS. Las secuencias nucleotídicas mostradas en la parte inferior de la figura corresponden a diferentes promotores procariotes con la finalidad de tener un punto de referencia con respecto a los promotores de glnA. Las bases subrayadas corresponden a las regiones "-35" y "-10". En todos los casos el extremo izquierdo de las secuencias mostradas corresponde al extremo 5', a menos que se indique de otra manera.

cripción del operón se inicia de dos promotores diferentes dependiendo de la presencia de AMP cíclico intracelular (64).

3) Regiones palindrómicas como:

$\Delta G = -11.1$ kcal/mol (345) 5'-TTGTA-T-CG---TA--CG-A-TACAA-3' (370)
 $\Delta G = -12.8$ kcal/mol (371) 5'-AA---GATCACAAA----CT--GCAA-----TTGC
 AG----TTTGTGATC---TT-3' (429)
 $\Delta G = -4.5$ kcal/mol (577) 5'-AA--TAAAAG-----C-G-----CTTTTA--TT
 TT-3' (610)
 $\Delta G = -16.9$ kcal/mol (575) 5'-GCAATT-----TTGGC-----TCGC-(12)-
 GCCA----GCCCAA----AATTGC-3' (637)

De estos palíndromes imperfectos los que se muestran en la Figura 7 son aquellos cuya probable estructura secundaria parece ser más estable de acuerdo a los valores calculados de energía libre (ΔG). Aún cuando no conocemos la función de estas secuencias es probable que pudieran tener un papel como operador y/o iniciador, o algún otro que no haya sido descrito en los sistemas ya conocidos en bacterias. Se ha observado que este tipo de secuencias palindrómicas forman parte de operadores para varios genes, por ejemplo: O_L y O_R en el fago lambda (65), el operador para el operón de lac (66) etc.; y se ha especulado que este arreglo simétrico e invertido en el DNA es reconocido por dos subunidades del represor que también se encuentran organizadas de manera simétrica (67). Es importante hacer notar que estas secuencias palindrómicas se encuentran localizadas en dos regiones, principalmente, i.e.: entre posiciones 344 y 430;



-FIGURA 7

FIGURA 7. Posibles estructuras secundarias en la región de control de glnA.

Se muestran dos de las posibles estructuras secundarias encontradas en la región de control de glnA las cuales de acuerdo a sus valores de energía libre (ΔG) resultaban ser las más estables (ésto es, con un $\Delta G > -7$ kcal/mol, 85). Los valores de ΔG se obtuvieron de acuerdo a Bores et al (85). La localización de estas secuencias se indica abajo con números que se refieren a las posiciones marcadas en la secuencia nucleotídica reportada en el artículo "Nucleotide sequence of the glnA control region" incluido en esta tesis.

y entre posiciones 575 y 611. Estas dos zonas se encuentran bastante alejadas entre sí, 145 pb, lo cual hace difícil la comparación de esta región de control con las ya descritas y, hace pensar en la existencia de mecanismos muy particulares para la regulación de la expresión de este operón. Otro punto referente a la localización de estos palíndromos es que aquéllos que se encuentran entre las posiciones 575 y 611 se sobreponen con la secuencia identificada como promotor P_{A-1} , como ha sido observado para varios operadores e iniciadores en otros genes en procariotes (65,68,69,70,71).

4) Secuencias repetidas directas:

(505) 5'-TGGTGCA-(12)-TGGTGCA-3' (532)

(592) 5'-CAGATTTCG-(36)-CAGATTTCG-3' (647)

Las primeras se encuentran sobrepuestas tanto con el promotor P_{A-1} como con el promotor P_{A-2} , y las segundas, esencialmente, con la región del promotor P_{A-1} . El significado de estas secuencias es aún desconocido.

5) Secuencias con imagen en el espejo, como han sido denominadas por Higgins y Ames (72), se encuentran en :

(595) 5'-TAAAG-GAAAT-3' (607)

(633) 5'-TAACG-----GCAAT-3' (650)

Ambas secuencias se localizan dentro de la región correspondiente al promotor P_{A-1} . Higgins y Ames (72) han propuesto que ciertas secuencias con imagen en el espejo pudieran funcionar como sitios simétricos de reconocimiento para algunas proteínas diméricas; sin embargo, su análisis no resulta ser lo suficiente

mente profundo como para considerarlo como una posibilidad seriã. También debe hacerse notar que las secuencias con imãgen en el espejo que se encontraron en esta regiãon de control son consideradamente mãs pequeñas y no presentan homología significativa con aquãellas reportadas por Higgins y Ames en las regiones de control de los genes argT y dhuA.

6) Entre posiciones 414 y 432 se encuentra la secuencia: 5'-CT-TGTGA--G----CA-3' , la cual presenta una cierta homología con la secuencia consenso de uniãon a CRP:

5'-AA~~T~~ TGTGA--T----CA-3' (79)

Prusiner et al (80) han reportado que tanto GS como GDH parecen estar sometidas a control positivo por AMPc; sin embargo, GS parece regularse normalmente en una cepa deficiente en adenilato ciclasa o en CRP. Por otro lado, cuando se adiciona AMPc a un cultivo de cãelulas deficientes en adenilato ciclasa sãolo se observa un aumento de aproximadamente dos veces en las actividades de GS. Hasta ahora no existe evidencia posterior que nos permita asignarle un papel importante al control positivo por AMPc-CRP en la sãntesis de GS.

7) La secuencia 5'-CTTT-3' se encuentra repetida siete veces en un fragmento de 380 pb. Esta secuencia se encuentra frecuentemente en las regiones de control de varios genes en procariotes, sin embargo, no se le ha atribuido ninguna funciãon (61).

8) El porcentaje de AT's en esta regiãon (de la posiciãon 301 a 685) es de 55%. En la regiãon que comprende los tres promotores el porcentaje de AT's es de 56%. Se ha dicho que, ya

que, las regiones ricas en AT's se funden más fácilmente que otras, la presencia de una región rica en A-T dentro de los dominios de contacto de la RNAP podría facilitar el proceso de iniciación. Además, existe evidencia que indica que ciertas regiones de DNA, dependiendo de su composición de bases, pueden variar su conformación (78).

9) Cuando esta región de control se comparó con las regiones de control de otros genes involucrados en el metabolismo nitrogenado como argT, dhuA, nifE y el mismo glnA pero de S. typhimurium (72,73, 74) se encontraron dos secuencias altamente conservadas (Ver Figura 8). Puesto que tanto el producto de nifA como el producto de glnG pueden activar la expresión a partir del promotor de nifL (59,74,75) era posible esperar homología entre el promotor de glnA y este promotor, así como entre los promotores para aquellos genes u operones sujetos a control nitrogenado (Ntr). No será hasta no obtener mutantes, donde la expresión de glnA sea independiente de glnG, que se podrá concluir si estas secuencias conservadas están relacionadas con la activación o con la represión mediada por glnG.

10) La posibilidad de que la transcripción de glnA iniciara en un sitio lejano, anterior a su sitio de iniciación de traducción, hacía suponer la existencia de una región líder en el RNAm y, a semejanza de los operones involucrados en la biosíntesis de algunos aminoácidos (76), era probable la existencia de un polipéptido pequeño codificado en esta región. Se exploró esta posibilidad y se encontró una secuencia de 138 pb que codifica

NITROGENADO

169 pb

dhuA CCGGGCTGGGAACTATCACGGTGCAAAATAGATGTTTTGCACCTTTTGGTGCAT-----TGTTGAGGATAGTTATG
SD met

103 pb

argTr AACCGTCATACCTGCTATCTTCAACATCAGGACAATATTGCAACGTTTTATTAAACA-----CTTGAGGGGTATGTATG
SD met

111 pb

glnA_{Ec} TATATTGGTGCAACATTCACATCGTGGTGCAGCCCTTTTGCACGGATGGTTGCCSA-----AATCCAGGAGAGTTAAAGTATG
SD met 556 667 688

124 pb

glnA_{St} TTTGGTGCAACATAGTCACCGTGGTGCAGCCCTTTTGCACCGATGGTTGCCA-----AATCCGGGAGAGTAGTTGTATG
met

+1

nifL_{Kp} ACATCACGCCGGATAAGGGCCACGGTTTGCAATGGTTATCACCCC

+1

nifH_{Kp} ATAAACAGGCACGGCTGGTATGTTCCCTGCACCTTCTCTGCTG

+1

nifH_{Rm} TTATTTAGACGGCTGGCAGGACTTTTGCACGATCAGCCCTG

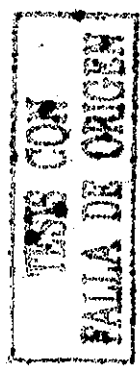


FIGURA 8. Comparación de las regiones de control de algunos genes relacionados con el metabolismo nitrogenado. Las secuencias nucleotídicas mostradas aquí corresponden a las regiones de control de diversos genes que están involucrados en metabolismo nitrogenado: dhuA (72), argTr (72), glnA_{Ec} (este trabajo), glnA_{St} (73), nifL (74), nifH_{Kp} (74,75) y nifH_{Rm} (74,75). Las secuencias que presentan cierta homología entre sí son aquéllas que se encuentran subrayadas con barras. Las secuencias sobre las barras negras son comparables entre sí, así como lo son aquéllas sobre las barras vacías. Los números sobre las rayas punteadas indican los pares de bases que se encuentran entre las secuencias escritas. El probable sitio de unión a ribosomas está indicado como SD (Shine-Dalgarno). El codón de iniciación ATG corresponde a la primera metionina (met) de la proteína. Los números abajo de la secuencia correspondiente a glnA_{Ec} indican su localización con respecto a la secuencia nucleotídica reportada en el artículo "Nucleotide sequence of the glnA control region" incluido en esta tesis. El sitio de iniciación de transcripción se indica con +1 en aquellos casos en los que se conoce.

K_p: Klebsiella pneumoniae; Rm: Rhizobium mellioli; St: Salmonella typhimurium; Ec: Escherichia coli.

para un polipéptido de 46 aminoácidos, con el primer ATG en la posición 546 y el primer codón de terminación, en fase (TGA), en la posición 694, ya dentro del gene estructural para GS. Sin embargo, no se encontraron características en esta región que hablaran de un posible mecanismo de regulación por atenuación, como por ejemplo, la formación alternativa de estructuras de "asa y tallo", o bien, la presencia de codones en tandem para glutamina o algún aminoácido relacionado. Por lo que respecta a la existencia del polipéptido teórico, a la fecha no sabemos si se traduce y, menos aún si tiene alguna función.

11) Una búsqueda de grupos donadores y aceptores de puentes de hidrógeno y un análisis de su distribución en el surco mayor del DNA nos demostró que existen grupos donadores expuestos en el surco mayor del DNA, en las regiones donde se localizan los probables promotores que podrían funcionar como sitios de interacción para la RNAP. También se encontró un buen arreglo de grupos donadores en aquella región donde se encuentran los palíndromes (344 a 430). Von Hippel y colaboradores (77) han enfatizado que estos grupos donadores expuestos y arreglados de una manera característica son importantes para el reconocimiento de los promotores por la RNAP, así como para que ésta tomé la decisión adecuada sobre el sentido de la transcripción. Esta interpretación parece estar apoyada por el aislamiento de mutaciones que modifican la fuerza de un promotor por ocasionar un cambio en el patrón de grupos donadores y aceptores. Este mismo modelo podría ser aplicable para el reconocimiento por una proteína reguladora

(represor o activador) del operador o iniciador. Sin embargo, hasta ahora esta idea resulta solo de interés potencial.

Con la finalidad de poder discernir a partir de que promotor se iniciaba la transcripción de glnA, y si existía más de un sitio de iniciación de la transcripción dependiendo de las condiciones de crecimiento, se sugirieron dos estrategias. Una consistía en analizar los transcritos que se obtuvieran en un sistema de transcripción in vitro, el cual presenta la limitación de que no simula las condiciones in vivo, ya que, por ejemplo, carece de activadores y represores. La presencia de dos bandas radioactivas (~ 340 b y ~ 170 b) cuando se usa como templado el fragmento de SmaI-Eco RI (SR3) (731 pb) indica el posible uso de dos regiones diferentes para iniciar la síntesis del RNAm de glnA. La banda que migra como un fragmento de 170 b coincide con el sitio de iniciación que se deduce del fragmento de 270 b resultante de la transcripción a partir del fragmento de HinfI-HinfI (H4) (464 pb) (Ver Figura 5). Ya que el tamaño calculado para los transcritos presenta cierto grado de error no se puede definir el sitio exacto de iniciación, pero es posible deducir que uno se localiza después del promotor P_{A-1} , y el otro entre las posiciones 440 y 460 inmediatamente abajo de la región de palíndromes. Este último no se esperaba ya que se encuentra muy alejado del sitio de unión a ribosomas de glnA. Haciendo una búsqueda para una secuencia homóloga con un promotor es posible encontrar algo que pudiera funcionar como tal, con la siguiente localización y secuencia nucleotídica:

(345) 5'-TTGTAATACGGA-(17)-CAGGAT-3' (379)

Sin embargo, estos datos deben tomarse con reserva por las limitaciones que presenta el sistema y, por lo tanto, requieren de ser confirmados por datos obtenidos en un sistema que refleje lo que sucede in vivo.

Una mejor herramienta parece ser el "mapeo con la nucleasa S1". Este método, presenta varias ventajas, ya que es posible obtener RNA de diferentes condiciones de crecimiento (glutamina 1 mg/ml ó NH₄Cl 15 mM como únicas fuentes de nitrógeno en el medio), el cual, previo al tratamiento con la nucleasa S1, se hibridiza contra un monitor radioactivo adecuado. Esta metodología nos permitirá identificar y localizar los diferentes sitios de iniciación de transcripción dentro del operón. Resultados preliminares sugieren que el fragmento H4, utilizado como detector, es capaz de hibridizar con un RNAm cuya síntesis parece ocurrir a partir del promotor P_{A-1} (datos no mostrados), lo cual parece estar de acuerdo con los resultados obtenidos in vitro. Cabe hacer notar que el RNA usado en este experimento sólo proviene de un cultivo obtenido en condiciones de limitación de nitrógeno (glutamina 1 mg/ml como única fuente de nitrógeno), por lo que hasta aquí no se puede descartar la idea de que en condiciones de exceso de nitrógeno el sitio de iniciación sea diferente. Experimentos tendientes a definir esta posibilidad se están llevando a cabo actualmente.

Aunque el análisis de secuencia de la región de control de glnA ha localizado sitios potenciales de interacción con la RNA polimerasa o con otras proteínas reguladoras, no nos ha proporcionado ninguna respuesta sobre cómo se regula este gene. Por lo tan-

to, también resulta necesario llevar a cabo la caracterización fina de mutaciones que afecten esta región con la finalidad de profundizar sobre los mecanismos moleculares de control que sobre ella se ejercen.

En el laboratorio se ha aislado una primera mutación regulatoria, localizada en la región de control de glnA, cuyo alelo se ha denominado gln-76. La descripción de esta mutación se encuentra en el trabajo anexo. Es importante hacer notar las diferencias que se observan en las actividades específicas de GS entre la cepa MX929 (gln-76) y la cepa MX927 (gln-76 glnG74::Tn5) (Tabla 3, en el trabajo "Cis-dominant, glutamine synthetase constitutive mutations of E. coli independent of activation by the glnG and glnF products")

Como se explica en la discusión de ese manuscrito, es probable que la mutación gln76 haya generado un promotor más eficiente y, por lo tanto, se observa una actividad elevada de GS, en todas las condiciones de crecimiento, en ausencia de un producto de glnG funcional, ya que no existe represión ni activación dependiente de glnG sino sólo aquella proveniente del promotor mutado. Las actividades de GS en células conteniendo esta mutación, pero ahora en presencia de un producto de glnG funcional, en condiciones de limitación de nitrógeno, presentan valores iguales que la cepa silvestre, sin embargo, en condiciones de exceso de nitrógeno, los valores son más altos que los que se obtienen para la cepa silvestre. Una posibilidad para explicar que la regulación en condiciones de represión donde ésta ya no ocurre de manera igualmente eficiente, sería el considerar la existencia de dos promotores, uno de donde se inicia

ra la transcripción dependiente de activación y el otro responsable de la transcripción dependiente de las condiciones de represión.

La visión actual sobre cómo se regula la expresión de glnA y la de otros genes involucrados en la asimilación del nitrógeno ha resultado bastante diferente de la que se tenía hace cuatro años. Magasanik y colaboradores habían propuesto un modelo en el cual GS era el único elemento regulador de este sistema. Ahora, sabemos que por lo menos cuatro productos están involucrados en los procesos de activación y represión. Aún cuando los mecanismos involucrados en estos procesos no han sido aclarados, algo se ha podido deducir sobre su función a través del análisis de las diferentes mutaciones en los genes para estos productos:

a) El hecho de que el fenotipo GlnR, que resulta de una mutación en glnG, sea dominante sobre el fenotipo Gln⁻ característico de una mutación en glnE (26,35,36, I. Castaño y F. Bastarrachea, datos no publicados), indica que el producto de glnG está involucrado en la represión de la expresión de glnA.

b) Sólo cepas glnF⁺ glnG⁺ poseen altas concentraciones de GS lo cual indica que los productos de ambos genes se requieren para la activación de glnA (26,35,36).

c) La pérdida del producto de glnF da lugar a un fenotipo Gln⁻ Ntr⁻, en tanto que el fenotipo debido a la pérdida del producto de glnG es GlnR Ntr⁻. Ambos fenotipos son dominantes sobre el fenotipo GlnC NtrC de una mutante en glnL. Esto indica que la activación de la expresión tanto de glnA como de los sistemas Ntr requiere del

producto de glnG, y ésta no ocurre cuando, debido a la ausencia del producto de glnF, el producto de glnG se encuentra en su forma de represor (35,57,28).

d) Mutaciones en glnB dan lugar a dos fenotipos, al fenotipo GlnC debido a la pérdida de P_{II} ó al fenotipo Gln^- debido a la incapacidad de convertir P_{II} en P_{IIUMP} (44), éste parecería indicar que P_{II} reprime la expresión de glnA. Sin embargo, el fenotipo Gln^- de una mutante glnF⁻ resulta ser dominante sobre el fenotipo GlnC resultante de la pérdida de P_{II} (3). Esto sugiere que el producto de glnG es capaz de reprimir en ausencia de P_{II} . Por lo tanto, parecería ser que P_{II} , más que reprimir, interfiere con la activación de glnA y, que el fenotipo GlnC de una glnB⁻ refleja la falta de esa interferencia puesto que P_{II} ya no está presente. Esta interpretación se ve apoyada por estudios hechos con la mutación gln-153 que se encuentra ligada a glnA y ejerce su efecto en cis. Como resultado de esta mutación, glnA ya no responde a represión mediada por glnG y, cuando se combina con un gene glnF mutado las actividades de GS son bajas en ambas condiciones como corresponde a un fenotipo GlnR (29); sin embargo, cuando glnF se encuentra en su estado silvestre, no se observa la represión esperada en un medio con histidina, amonio y glutamina, pero sí existe una activación óptima cuando se crecen en un medio con glucosa y glutamina. Estos datos condujeron a Rothstein y colaboradores (29) a pensar que la mutación gln-153 se encontraba alterando un sitio en la región de control de glnA que impedía el reconocimiento del producto de glnG como represor pero seguía respondiendo a activación por los produc

tos de glnG^F y glnF. Sin embargo, cuando se tiene una doble mutante gln-153 glnB3 entonces ya no ocurre activación de glnA, lo cual hace pensar en la interferencia por la proteína P_{II} , que se encuentra alterada en la mutación glnB3.

e) Este efecto inhibitorio de P_{II} parece estar mediado por el producto de glnL, ya que mutaciones en glnL suprimen el fenotipo Gln^- obtenido por mutaciones en glnB o en glnD (41,27). Por otro lado, ésta se ve apoyada por el hecho de que deleciones en glnL aún permitan a la célula sintetizar GS a pesar de la presencia de P_{II} (47).

f) La expresión de glnA en células que contienen los genes glnF y glnG funcionales pero que carecen de glnL se encuentra regulada normalmente (47). Por lo tanto, parece ser que se puede obtener cierta regulación de glnA, en respuesta a cambios en la calidad de la fuente de nitrógeno del medio, sólo mediada por los productos de glnG y glnF sin la participación de los productos de glnL, glnB y glnD.

g) Las cepas con una deleción en glnL también presentan una regulación esencialmente normal para las enzimas del metabolismo de nitrógeno (fenotipo Ntr^+) (3). Puesto que este fenotipo es dominante sobre el fenotipo Ntr^- de mutaciones en glnD se puede considerar como una evidencia más para pensar que P_{II} ejerce su efecto a través del producto de glnL, ya que la falta de $UtsA$ en mutantes glnD evitará la formación de P_{IIUMP} quedando sólo P_{II} como ocurre en la mutación glnB3.

h) Algunas mutaciones puntuales en glnL dan lugar a un fenotipo

tipo GlnC NtrC el cual resulta ser dominante sobre el fenotipo Gln⁻ Ntr⁻ de mutaciones en glnB y en glnD. Ya que cepas con deleciones en glnL se pueden comportar como una silvestre, ésto indica que sigue existiendo represión y, que por lo tanto en el caso arriba mencionado podría existir un producto de glnL, alterado que causara la activación de la expresión de glnA, o bien que impidiera su represión por el producto de glnG (47,57).

i) Como ya se había mencionado la ausencia de P_{II} resulta en un fenotipo GlnC, sin embargo ésto sólo ocurre en presencia de un gene glnL funcional. El fenotipo Gln⁺/C que resulta de una deleción en glnL es dominante sobre el fenotipo GlnC de mutaciones en glnB (3). Estas mismas mutaciones presentan un fenotipo Ntr⁺, pero el fenotipo NtrC de glnL⁻ es dominante sobre este fenotipo Ntr⁺, lo cual apoya que los efectos de P_{II} sobre la expresión de estos genes está mediado por el producto de glnL.

j) Por lo que se refiere a la función del producto de glnD (Utasa) sobre la expresión de glnA y los genes Ntr, existen datos que sugieren que los efectos de una mutación glnD⁻ sobre la expresión pudieran ser debidos solamente a la acumulación de P_{II} por la falta de Utasa. Este punto de vista se apoya en la observación de que el fenotipo GlnC debido a la pérdida de P_{II} es dominante sobre el fenotipo Gln⁻ de mutantes glnD⁻. Sin embargo, un dato sorprendente resulta ser que el fenotipo Ntr⁻ de mutaciones en glnD es dominante sobre el fenotipo Ntr⁺ de mutantes glnB⁻. Por otro lado, el fenotipo Ntr⁺ de una deleción en glnL y el fenotipo NtrC de una mutación puntual en glnL son dominantes sobre

el fenotipo Ntr^- de una mutación en glnD (3). Esto último sugiere que la *Utasa* tiene una función adicional sobre la regulación de la expresión de estos genes, la cual es independiente de P_{II} ; o bien, que estas mutaciones en glnD son polares sobre algún gene muy cercano a glnD cuyo producto tenga alguna función en la regulación de nitrógeno.

k) El hecho de que por un lado, mutaciones que se localizan en la región anterior de glnL supriman el fenotipo Gln^- de glnF y que derrepriman su GS un poco más que lo que ocurre en una cepa silvestre (38); y por otro, que mutaciones en la región posterior de glnL no tengan ningún efecto sobre la regulación de glnA pero resulten en un fenotipo Ntr^- , indica que el producto de glnL posee dos dominios funcionales, uno involucrado en el control negativo de glnA, y otro que no está involucrado en la regulación de la expresión de glnA pero, al parecer, sí en la correspondiente a los genes *Ntr*.

Es interesante hacer notar que una cepa *merodiploide* con una mutación de sentido equivocado en glnL (que da un fenotipo $GlnC$ debido presumiblemente a la presencia de un producto de glnL alterado) (47), y glnA::Tn5 en el episoma, y una fusión glnA-lacZ con los genes glnL y glnG normales en el cromosoma presentan un fenotipo que no se puede considerar ni Gln^+ , ni $GlnC$, es decir que ambos fenotipos son codominantes. Sin embargo, el fenotipo Ntr^+ , característico de un gene glnL normal, sí es dominante sobre el fenotipo $NtrC$, característico de un gene glnL mutado. Estos datos parecerían indicar que el producto de glnL está involucrado en el control

negativo de Ntr, sin embargo, también podrían ser explicados por los niveles del producto de glnG.

Otra característica interesante de estas mutaciones sin sentido en glnL se refiere a los altos niveles de adenilación de GS en estas células crecidas en un medio con glucosa y glutamina. Esto no ocurre en mutantes con deleciones en glnL o en la cepa silvestre (28).

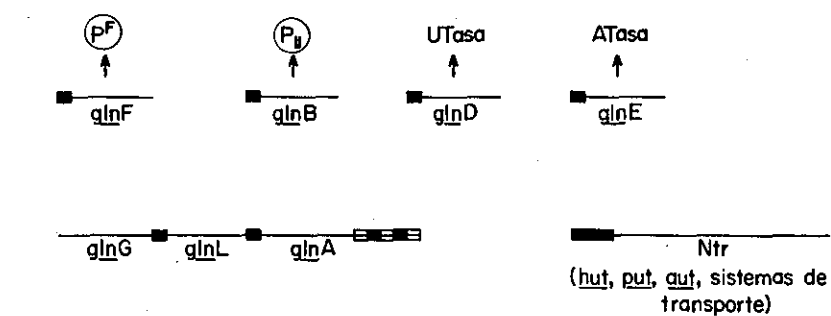
Aunque pareciera que el producto de glnL se requiere para que P_{II} inhiba la activación de glnA, aún no está claro si funciona de la misma manera para Ntr, o si tiene alguna función adicional, como pareciera indicar el efecto de la mutante sobre la adenilación de GS.

Aún cuando MacNeil y colaboradores (38) han reportado el aislamiento de aproximadamente 400 mutantes con alteraciones en la región glnA, se requiere de una mejor caracterización de las mismas así como estudios de los fenotipos de diferentes dobles mutantes que permitan confirmar el análisis que hasta ahora se tiene de este sistema. Sin embargo, es posible tener un esquema general de cuales pudieran ser algunos de los mecanismos de regulación de la síntesis de GS. Por un lado, se ha podido establecer que tanto el producto de glnG como de glnF se requieren para activar, aún cuando se desconoce el tipo de interacción entre estos productos. Esto funcionaría óptimamente en condiciones de limitación de nitrógeno. Por otro lado, en condiciones de represión parecería que existen dos mecanismos de control negativo; uno mediado por el producto de glnG, y otro mediado por los productos

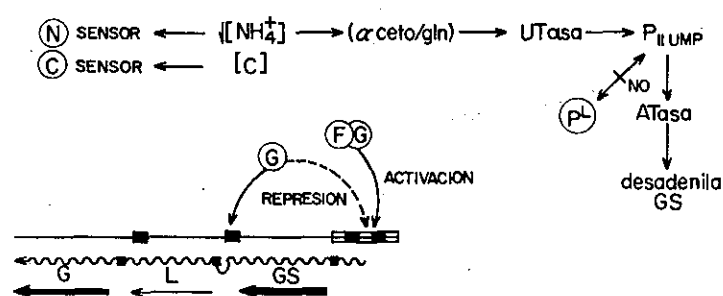
de glnB (P_{II}) y de glnL, los cuales inhiben la activación por los productos de glnG y glnF.

En condiciones de máxima represión el primero de estos mecanismos parecería ser el más importante, ya que es independiente de la presencia de P_{II} . Por lo tanto el mediado por P_{II} y el producto de glnL es funcional en condiciones donde se observa una represión intermedia. El hecho de que un producto de glnL alterado de lugar a un fenotipo glnC dominante sobre el fenotipo Gln^+ de una mutante glnF sugiere que este producto modificado de glnL está impidiendo la represión mediada por glnG que se observa en condiciones normales. Por lo tanto, es posible pensar que el efecto mediador del producto de glnL en la inhibición de la activación por P_{II} esté dado por una interacción entre el producto de glnG y el producto de glnL. También resulta interesante hacer notar que la capacidad de P_{II} y/o *Utasa* para sentir la calidad de las fuentes de carbono y nitrógeno resulta importante sólo en condiciones de crecimiento en glucosa-amonio-glutamina (GNGln), pero no en condiciones extremas como glucosa-glutamina (GGln) o histidina-amonio-glutamina (HNGln). Esto proviene del hecho de que en mutantes que carecen del producto de glnL las actividades de GS son idénticas a las de una cepa silvestre en condiciones de GGln ó HNGln, pero no así en condiciones de GNGln. Así pues es posible que exista otro "sensor" además de P_{II} y/o *Utasa* que funcione en estas condiciones y que pudiera ser el producto de glnF. En la Figura 9 se muestra esquematizado un modelo de regulación que reúne los datos arriba mencionados.

Nuestro conocimiento sobre el sistema aún es rudimentario;



LIMITACION DE NITROGENO.



EXCESO DE NITROGENO

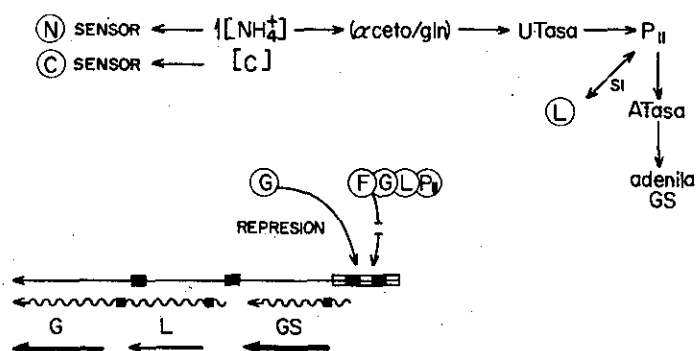


FIGURA 9

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

FIGURA 9. Modelo para la regulación de la expresión de glnA. De acuerdo a los datos descritos en la discusión de esta tesis se pretende esquematizar en esta figura algunos de los eventos que podrían estar involucrados en la regulación de la expresión de glnA. La parte superior muestra los diferentes genes involucrados en este sistema. Se esquematizan dos condiciones de crecimiento, una en limitación de nitrógeno y otra en exceso de nitrógeno. En ambas condiciones se supone la existencia de un sensor (sensor N) para la fuente de nitrógeno ($[\text{NH}_4]$), y uno (sensor C) para la fuente de carbono ($[\text{C}]$). Se considera que la relación entre la concentración de α -cetoglutarato y la concentración de glutamina (α -ceto/gln) como un indicador de la calidad de la fuente de nitrógeno y/o de carbono. En el caso de limitación de nitrógeno, la flecha punteada indica baja represión por pG. Los rectángulos negros indican los promotores respectivos. La región de control de glnA está indicada por un rectángulo vacío conteniendo dos rectángulos negros, éstos últimos representan la existencia de, por lo menos, dos promotores funcionales. La línea ondulada representa los transcritos de esa región, y los cuadros negros sobre ella representan los sitios de unión a ribosomas. Las flechas representan los productos de traducción y, el grosor de las mismas pretende dar una idea de la proporción relativa entre ellas. hut: operón para la utilización de histidina; put: operón para la utilización de prolina; aut: operón para la utilización de arginina.

existen un gran número de preguntas que aún no tienen una respuesta clara como: Si aparentemente glnL no es indispensable ¿cuál es su función? ¿El producto de glnF actúa directamente o a través de un producto resultante de su actividad? ¿Son glutamina, glutamato ó 2-cetoglutarato correpresores del sistema? ¿Cuál es la señal que percibe P_{II} o la *Utasa*? ¿Existe una señal diferente para cada fuente de nitrógeno, o realmente la relación 2-cetoglutarato-glutamina refleja los niveles intracelulares de amonio? ¿Por qué una cepa con una mutación en gltB ($GOGAT^-$) tiene un fenotipo Ntr^+ ? ¿Existe alguna relación entre los productos reguladores de glnA y Ntr^+ y la síntesis de $GOGAT$, o sólo es que mutantes gltB⁻ ya no son capaces de disminuir los niveles intracelulares de glutamina lo suficiente como para activar la transcripción de glnA? ¿Los mecanismos de activación y represión para el sistema Ntr funcionan de manera similar que para glnA, a pesar de que algunos de estos sistemas responden a represión catabólica y a un represor propio? ¿Existe algún mecanismo que acople la regulación por la fuente de nitrógeno con la regulación por la fuente de carbono? Sin embargo, ahora se cuentan con herramientas que ayudarán a tener una idea más clara de algunos de los mecanismos involucrados en la asimilación del nitrógeno, por lo menos, en bacterias.

CONCLUSIONES

- * Los genes glnA, glnL y glnG se encuentran contiguos y se transcriben en la misma dirección (glnA → glnG) lo cual apoya la hipótesis de que estos tres genes constituyen un operón.
- * Este operón no resulta ser tradicional ya que nuestros datos sugieren que los tres genes poseen un promotor propio.
- * El análisis de la secuencia nucleotídica de la región de control de glnA sugiere la presencia de más de un promotor, así como la localización de regiones singulares que no ha sido descrita para otras regiones regulatorias de genes en procariotes.
- * Los niveles de los productos de glnL y glnG en diferentes plásmidos sugieren la existencia de un mecanismo de regulación adicional para la síntesis del producto de glnL.
- * En esta región de control existe una secuencia que se conserva en diferentes genes involucrados en metabolismo nitrogenado.
- * La posibilidad de más de un promotor funcional para glnA se ve, en cierta forma apoyado, por los resultados obtenidos con la mutación regulatoria gln76:

Agradezco a Maru y, especialmente, a Irene y a Martha por haberme ayudado durante la transcripción de esta tesis.

BIBLIOGRAFIA

1. Stadtman, E. R. y Ginsburg, A. (1974). En "The Enzyme", ed. Paul Boyer Vol. X pp. 755, Academic Press.
2. ^{Tempest} Tempest, D. W., Meers, J. L. y Brown, C. M. (1973). En "The Enzymes of Glutamine Metabolism", eds. Stanley Prusiner y Earl R. Stadtman, pp. 167, Academic Press.
3. Magasanik, B. (1982). Ann. Rev. Genet. 16: 135.
4. Desphande, K. L. y Kane, J. F. (1980). Biochem. Biophys. Res. Commun. 93: 308.
5. Tyler, B. (1978). Ann. Rev. Biochem. 47: 1127.
6. Brenchley, J. E., Prival, M. J. y Magasanik, B. (1973). J. Biol. Chem. 248: 6122.
7. Gelfand, D. H. y Steinberg, R. A. (1977). J. Bacteriol. 130: 420.
8. Bender, R. A. y Magasanik, B. (1977). J. Bacteriol. 132: 100.
9. Ginsburg, A. y Stadtman, E. R. (1973). En "The Enzymes of Glutamine Metabolism", eds. S. Prusiner y E. R. Stadtman, pp. 9, New York, Academic Press.
10. Wohlhueter, R. M., Schutt, H. y Holzer, H. (1973). En "The Enzymes of Glutamine Metabolism", eds. S. Prusiner y E. R. Stadtman, pp. 45, New York, Academic Press.
11. Stadtman, E. R., Mura, U., Chock, P. B. y Rhee, S. G. (1980). En "Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation", eds. J. Mora y R. Palacios, pp. 41, New York, Academic Press.
12. Rhee, S. G., Park, R., Chock, P. B., y Stadtman, E. R. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: 3138.
- 13a Woolfolk, C. A. y Stadtman, E. R. (1964). BBRC, 17: 313.
- 13b Woolfolk, C. A. y Stadtman, E. R. (1967). ABB, 118: 736.
14. Woolfolk, C. A., Shapiro, B. y Stadtman, E. R. (1966). ABB, 116: 177.
15. Brenchley, J. E., Baker, C. A., Patil, L. G. (1975). J. Bacteriol. 124: 182.

16. Shanmugan, K. T. y Morandi, C. (1976). BBA. 437: 322.
17. Senior, P. J. J. Bacteriol. 123: 407
18. Stadman, E. R. Ginsburg, A., Ciardi, J. E., Yeh, J., Henning, S. B. y Shapiro, B. M. (1970). Adv. Enzyme Regul. 8: 99.
19. De Leo, A. B. y Magasanik, B. (1975). J. Bacteriol. 121: 313.
20. Pahel, G., Zelenetz, A. D. y Tyler, B. (1978) J. Bacteriol 133: 139.
21. Streicher, S. L., Bender, R. A. y Magasanik, B. (1975) J. Bacteriol. 121: 320.
22. Kuštu, S. G., Mckereghan, K. (1975). J. Bacteriol. 122: 1006.
23. Covarrubias, A. A., Sánchez-Pescador, R., Osorio, A., Bolívar, F. y Bastarrachea, F. (1980). Plasmid. 3: 150.
24. Rothstein, D. M., y Magasanik, B. (1980). J. Bacteriol. 141: 671.
25. Osorio, A. V., Servín-González, L.; Rocha, M., Covarrubias, A. A., y Bastarrachea, F. (1983). Manuscrito en preparación.
26. Pahel, G., y Tyler, B. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 76: 4544.
27. Prival, M. J., Brenchley, J. E., y Magasanik, B. (1978). J. Biol. Chem. 248: 4334.
28. Rothman, R., Rothstein, D. M. Foor, F. y Magasanik, B. (1982). J. Bacteriol. 150: 221.
29. Rothstein, D. M., Pahel, G. Tyler, B., y Magasanik, B. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 7372.
30. Bastarrachea, F. Brom, S., Covarrubias, A. A., Osorio, A. y Bolívar F. (1980). En "Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation", eds. J. Mora y R. Palacios, pp. 107, New York, Academic Press.
31. García, E., Bancroft, S., Rhee, S. G. y Kustu, S. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 1662.
32. Friedrich, B., y Magasanik, B. (1979). J. Bacteriol. 137: 1127.
33. Fuchs, R. L., Madonna, M. J. y Brenchley, J. E. (1982). J. Bacteriol. 149: 906.

34. Funanage, V. L., Ayling, P. D., Dendinger, S. M. y Brenchley, J. E., (1978). *J. Bacteriol.* 136: 588.
35. Gailardin, C. M. y Magasanik, B. (1979). *J. Bacteriol.* 133: 1329.
36. Kustu, S., Burton, D., García, E., McCarter, L. y McFarland, N. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 4576.
37. Wei, G. R. y Kustu, S. (1981). *Mol. Gen. Genet.* 183: 392.
38. MacNeil, T., Roberts, G. P., MacNeil, D. y Tyler, B. (1982). *Molec. Gen. Genet.* 188: 525.
39. Bancroft, S., Rhee, S. G., Neumann, C., y Kustu, S. (1978). *J. Bacteriol.* 134: 1046.
40. Bloom, F. R., Levin, M. S., Foord, F. y Tyler, B. (1978). *J. Bacteriol.* 134: 569.
41. Foor, F., Cederaren, R. J., Stericher, S. L., Rhee, S. G. y Magasanik, B. (1978). *J. Bacteriol.* 134: 562.
42. Leonardo, J. M. y Goldber, R. B. (1980). *J. Bacteriol.* 142: 99.
43. Funanage, V. L. y Brenchley, J. E. (1977). *Genetics.* 86: 513.
44. Foor, F., Reuveny, Z., y Magasanik, B. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 2636.
45. Foor, F., Janssen, K. A., y Magasanik, B. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 4844.
46. Reuveny, Z., Foor, F. y Magasanik, B. (1981). *J. Bacteriol.* 146: 740.
47. Chen, Y. M., Backman, K., y Magasanik, B. (1982). *J. Bacteriol.* 150: 214.
48. Covarrubias, A. A., Rocha, M., Bolivar, F. y Bastarrachea, F. (1980). *Gene* 11: 239.
49. Backman, K., Che, Y. M., y Magasanik, B. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 3743.
50. Rocha, M., Bastarrachea, F., y Covarrubias, A. A. (1982) *Bol Est. Med. Biol.*
51. Pahel, G., Rothstein, D. M. y Magasanik, B. (1982). *J. Bacteriol.* 150: 202.

52. Magasanik, B. y Rothstein, D. M. (1980). En "Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation, eds. J. Mora y R. Palacios, pp. 61. New York, Academic Press.
53. Magasanik, B. (1976). Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol. 17: 99.
54. McFarland, N., McCarter, L., Artz, S., y Kustu, S. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2135.
55. Koduri, R. K. y Bedwell, D. M. y Brenchley, J. E. (1980). Gene 11: 227.
56. Covarrubias A. A., y Bastarrachea, F. (1983). Mol. Gen. Genet. en Prensa.
57. Goldie, H., y Magasanik, B. (1982). J. Bacteriol. 150: 231.
58. Gutterman, S. K., Roberts, G. y Tyler, B. (1982). J. Bacteriol. 150: 1314.
59. Espin, G., Alvarez-Morales, A., Cannon, F., Dixon, R. y Merrick, M. (1981). Molec. Gen. Genet. 189: 213.
60. Shine, J., y Delgarno, L. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 71: 1342.
61. Siebenlist, U., Simpson, R. B., y Gilbert, W. (1980). Cell 20: 269.
62. Rosenberg, M. y Court, D. (1979). Ann. Rev. Genet. 13: 319.
63. Stefano, J. E. y Gralla, J. D. (1982). EN "Promoters: Structure and Function" eds. R. L. Rodríguez y M. J. Chamberlain. pp 69, New York, Praeger Publishers.
64. Aiba, H., Adya, S., y Crombrugghe, B. (1981) J. Biol. Chem. 256: 11905.
65. Ptashne, M. (1978). En "The Operon", eds. J. H. Miller y W. S. Reznikoff, pp. 325. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
66. Barkley, M. D., y Bourgeois, S. (1978). En "The Operon" eds. J. H. Miller, y W. S. Reznikoff, pp. 177, New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
67. Beyreuther, K. (1978), En "The Operon", eds. J. H. Miller y W. S. Reznikoff, pp. 123, New York, Cold Spring Harbor Laboratory.

68. Reznikoff, W. S. y Abelson, J. M., (1978). En "The Operon" eds. J. H. Miller, W. S. Reznikoff, pp. 221, New York. Cold Spring Harbor Laboratory.
69. Otuka, A. y Abelson, J. (1978). Nature 276: 689.
70. Ogden, S., Haggerty, D., Stoner, C. M., Kolodrubetz, D., Shley, R. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 3346.
71. Lee, N. L., Gielow, W. O. y Wallace, R. G. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 752.
72. Higgins, C. F., y Ames, G. F.-L. (1982). Proc. Natl. Acadm. Sci. USA. 78: 752.
73. Koduri, R. K. Ho, N., y BrenchKey, J. E. (1983). J. Bacteriol. En Prensa.
74. Drumond, M., Clements, J., Merrick, M., y Dixon, R. (1983). Nature 301: 728.
75. Sundaresan, V., Jones, D. G. J., Ow, D. N. y Ausubel, F. M. (1983). Nature 301: 728.
76. Yanofsky, Ch. (1981). Nature 289: 751.
77. Von Hippel, P. H., Bear, D. G., Winter, R. B., y Berg, O. G. (1982). En "Promoters: Structure and Function", eds. R1 L. Rodriguez y M. J. Chamberlain, pp. 3, New York, Praeger Publishers.
78. Von Hippel, P. H. y McGhee, J. D. (1972) Ann. Rev. Biochem. 41: 231.
79. Adhya, S. y Garges, S. (1982). Cell, 29: 287.
80. Prusiner, S., Millers, R. E. y Valentine, R. C. (1972), Proc. Natl. Acadm. Sci. USA. 69: 2922.
81. West, R. W. y Rodriguez, R. L. (1982)s Gene 20: 291.
82. Majors, J. (1975). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72: 4785.
83. Russell, D. R. y Benett, G. N. (1981). Nucl. Ac. Res. 9: 2517
84. Konigsberg, N. y Godson, N. (1983). Proc. Natl. Acadm. Sci. USA. 80: 687.
85. Borer, P. N., Dengler, B., Tinoco Jr., I., y Uhlenbeck, O. C. (1974), J. Mol. Biol. 86: 843.