

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y
HUMANIDADES

CARACTERIZACION DE MUTACIONES EN LA REGION REGULATORIA
DEL GENE DE GLUTAMINO SINTETASA EN Escherichia coli K12

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

PRESENTA

PATRICIA LEON MEJIA

1985

BIBLIOTECA
JOAN A. ESCOBAR
UNIDAD ACADÉMICA DE
LOS CICLOS PROFESIONALES
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE
CIENCIAS Y HUMANIDADES



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 Instituto de Investigaciones Biomédicas y en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección de la Dra. Alejandra Covarrubias Robles.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los miembros del jurado por la lectura critica de este trabajo, en particula a Carmen, Xavier y Fernando los cuales como miembros de mi comite tutorial contribuyeron fuertemente a mi formacion durante este periodo.

A Ale por su amistad y por todo el tiempo que dedico para mi formacion.

A Luis Servin por la lectura y critica de esta tesis aun sin formar parte del jurado.

A los miembros del Laboratorio III

A Lola Cuellar y Paty Vazquez por su desinteresada ayuda,

a Alejo Pichardo por la elaboracion del material fotografico y por su paciencia.

A todas aquellas personas que directa o indirectamente hayan contribuido a la realizacion de este trabajo.

A mis padres con el más profundo agradecimiento.

A mis hermanos.

A Mario.

A mi casa de Cuernavaca.

Al grupo; Ale, Rebeca, Martha, Irene, Juan, Julio,
Alejandro, Jaqueline y Mario Rocha.

A los miembros del Laboratorio III.

A todos mis amigos.

INTRODUCCION

Todos los organismos vivos requieren obtener elementos esenciales como son carbono y nitrógeno para sintetizar los compuestos orgánicos que necesitan para vivir. Algunos de ellos, los llamados auxótrofos, son capaces de llevar a cabo esta biosíntesis utilizando como sustrato moléculas inorgánicas simples como CO_2 a través del proceso fotosintético; no así los organismos heterótrofos los cuales necesitan incorporar moléculas orgánicas de las cuales extraen los esqueletos carbonados necesarios (1). Para el caso de la obtención de nitrógeno, una gran mayoría de los organismos conservan la capacidad de utilizar compuestos inorgánicos variados. A pesar de que el nitrógeno atmosférico es el elemento más abundante en la atmósfera terrestre (80%), pocos organismos son capaces de llevar a cabo una asimilación directa de este a través del proceso de fijación del nitrógeno (2), la mayoría utiliza compuestos tales como amonio, nitritos y nitratos. Para el caso de las enterobacterias que son los organismos a los que nos referiremos en este trabajo (en particular para Escherichia coli) la fuente de nitrógeno preferida es el ión NH_4^+ (3). Este ión es introducido eficazmente a la célula y posteriormente incorporado a compuestos orgánicos, en especial a glutamato y glutamina. Las enterobacterias son también capaces de utilizar compuestos orgánicos tales como histidina, prolina y arginina, los cuales son catabolizados enzimáticamente hasta dar amonio y glutamato. Glutamato y glutamina, son los compuestos primarios que funcionan como donadores del grupo amino y amido para la síntesis de todos los

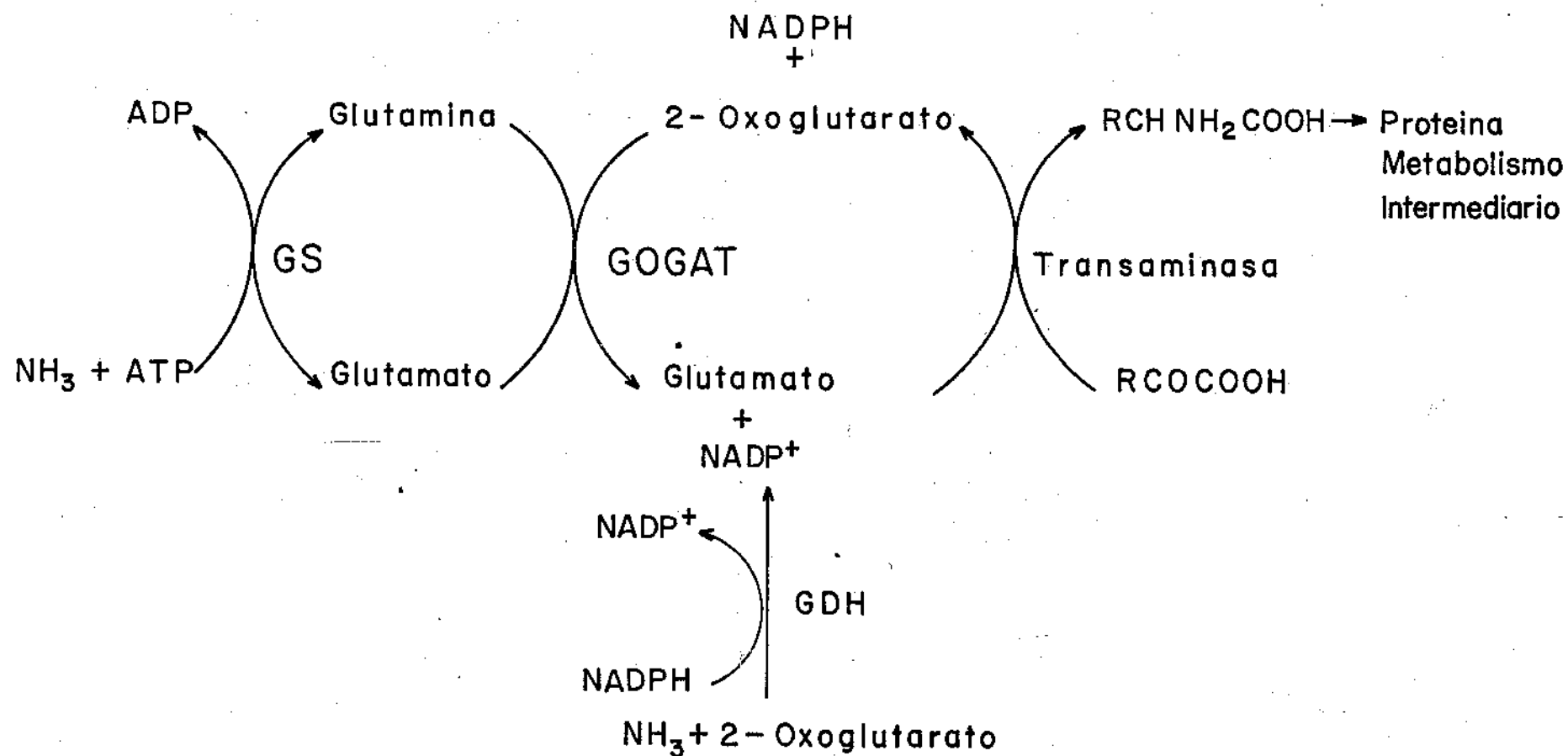


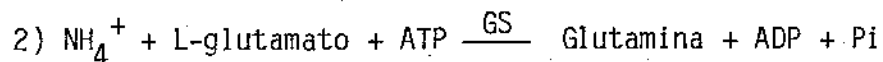
Figura 1. Rutas de asimilación de amonio para la síntesis de glutamina y glutamato, GS, Glutamina Sintetasa; GOGAT, Glutamina Sintetasa; GDH, Glutamina Deshidrogenasa.

aminoácidos (4).

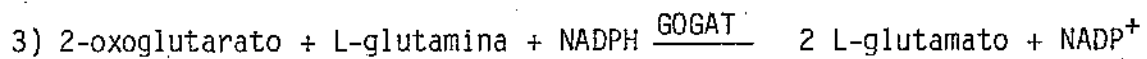
La síntesis de estos compuestos se lleva a cabo por las siguientes reacciones:



La enzima que cataliza esta reacción es la deshidrogenasa glutámica (L-glutamato:NADP⁺ oxidoreductasa, EC 1.4.1.4) o GDH la cual asimila el NH₄⁺ y lo incorpora a una molécula de 2-oxoglutarato con el gasto de una molécula de NADPH.



Esta reacción depende de la enzima glutamino sintetasa (L-glutamato: amonio ligasa, EC 6.3.1.2) o GS, el amonio es asimilado al incorporarse a una molécula de glutamina con el gasto de una molécula de ATP.



Otra enzima capaz de dar como producto final L-glutamato es la glutamato sintasa (L-glutamato:NADP⁺ oxido reductasa, EC 1.4.1.13) o GOGAT, la cual cataliza la transaminación de 2-oxoglutarato con una molécula de glutamina para formar dos moléculas de glutamato. Estas tres vías pueden observarse esquemáticamente en la Figura 1. La asimilación del nitrógeno a

través de la reacción catalizada por la enzima GDH solo es importante en condiciones en las que el amonio intracelular se encuentra en concentraciones altas, mayores de 0.1 mM (5,6). Esto se debe, a que la GDH tiene una baja afinidad tanto por el amonio como por el 2-oxoglutarato (con una Km del orden de 1 mM).

En condiciones en la que la concentración de amonio es menor a 0.1 mM, las reacciones catalizadas por las enzimas GS-GOGAT son las responsables de la obtención del nitrógeno necesario para la biosíntesis de un gran número de compuestos celulares. La GS en estas condiciones, al tener una afinidad mayor por el amonio, es capaz de asimilarlo eficientemente y aún a bajas concentraciones catalizar la reacción hacia la formación de glutamina. El grupo amido de la glutamina se utiliza para la síntesis de varios aminoácidos, como triptofano e histidina, así como para la síntesis de purinas y pirimidinas, glucosamina-6-P, carbamil-P, NADP. (Figura 2) (4).

En algunos organismos como en Bacillus subtilis (7) y Rhizobium (8) no existe la enzima GDH, por lo que la asimilación del nitrógeno en la célula se encuentra a cargo de las reacciones catalizadas por las enzimas GS-GOGAT. La actividad de GS varía dependiendo de la disponibilidad de nitrógeno en el medio. La presencia de altas concentraciones de nitrógeno provocan una disminución drástica de su actividad, mientras que en condiciones de limitación de éste, la enzima se encuentra totalmente activa (9).

La glutamino sintetasa (GS) es una enzima de 600 000 daltones de peso molecular, constituida de doce subunidades idénticas

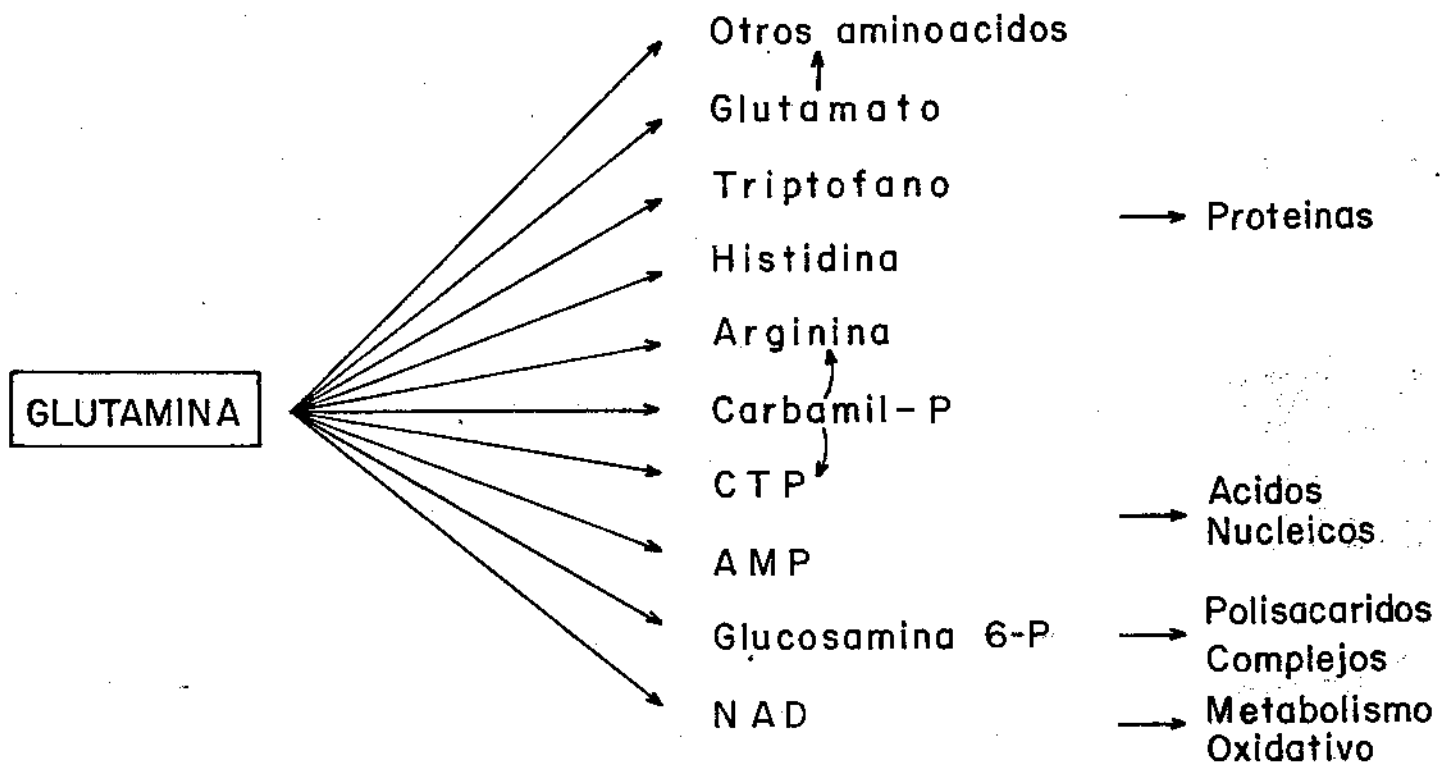


Figura 2. Compuestos que derivan de la glutamina.

En esta figura se muestra los compuestos en los que participa el nitrógeno del grupo amido de la glutamina.

arregladas en dos hexágonos. El dodecámero es muy estable en presencia de cationes divalentes. La actividad de esta enzima se regula por tres mecanismos diferentes que son:

a) Cambios conformacionales de la enzima por la presencia de diferentes iones divalentes que dan como resultado variaciones en su actividad. La remoción de iones tales como Mn^{2+} o Mg^{2+} provocan cambios conformacionales a una forma "relajada" que es inactiva, en la cual ciertos residuos de triptofano y tirosina son expuestos. Este fenómeno es completamente reversible y la adición de estos iones restaura la actividad enzimática. Por lo tanto, fluctuaciones medioambientales de estos iones pudieran ser fisiológicamente relevantes (10). Estudios de Segal y Stadman (11) han demostrado que cada subunidad tiene la capacidad de unir dos iones divalentes.

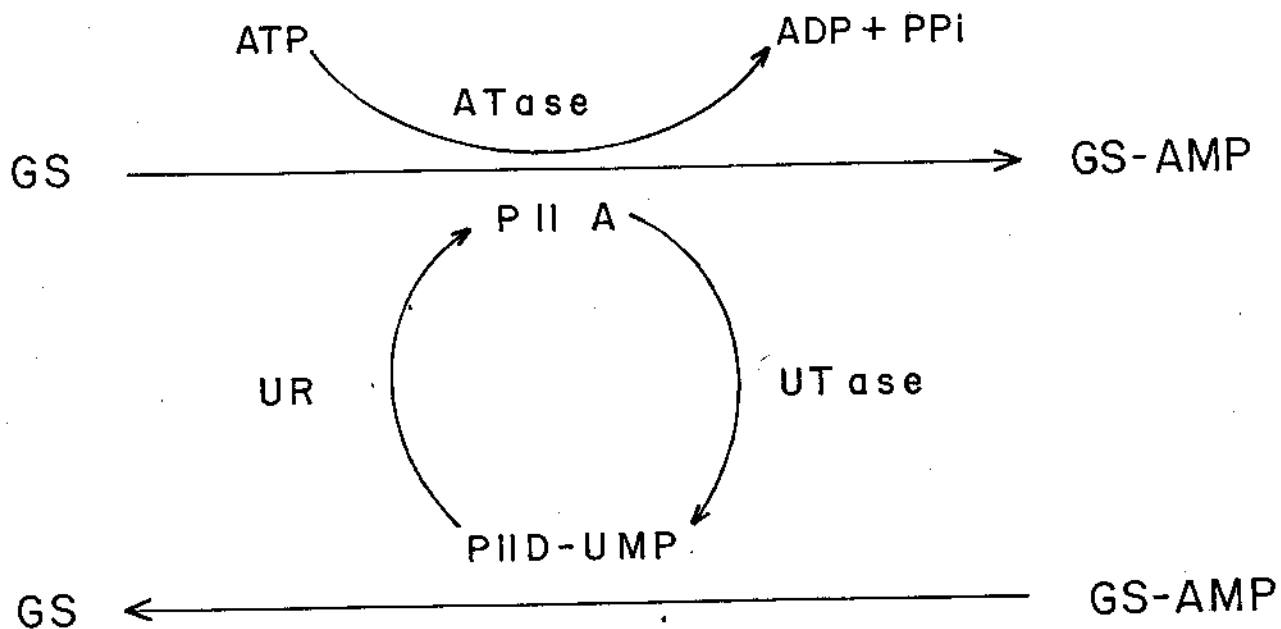
b) Inhibición por retroalimentación. La actividad de GS también puede ser regulada por un proceso de retroalimentación (12,13). Se ha descrito que una serie de compuestos como alanina, glicina, serina, histidina, triptofano, CTP, AMP, carbamilfosfato y glucosamina-6-P tienen una acción directa de inhibición sobre la actividad de GS; es importante aclarar que ninguno de ellos provoca una inhibición total de la GS sino que el efecto de éstos es acumulativo. Todos los compuestos antes mencionados son productos que poseen un grupo amino que deriva directamente de la glutamina, a excepción de alanina, glicina y serina que son productos que provienen directamente del glutamato. El glutamato no tiene efecto de inhibición sobre la GS, ya que a pesar de que su grupo amino deriva directamente de la glutamina, es sustrato

de esta enzima por lo que su regulación esta dada en forma indirecta a través de alanina, glicina y serina. Al parecer los sitios en los que los diferentes compuestos se unen para ejercer la inhibición sobre GS son diferentes (14).

c) Finalmente la actividad de GS se encuentra regulada por modificaciones covalentes, de manera que la GS modificada presenta una menor capacidad para sintetizar glutamina. Esta modificación se realiza a través de la adición reversible de un grupo AMP a un residuo tirosilo de cada una de las doce subunidades de la enzima (maxima adenilacion E_{12}) (15). Dado que la enzima adenilada aún es capaz de transferir el residuo glutamil de la glutamina a la hidroxilamina en presencia de Mg^{2+} y ADP, es posible determinar la cantidad total de GS existente en la célula.

En el proceso de adenilación-desadenilación de la GS, intervienen tres diferentes proteínas: la adenil-transferasa o ATasa, la cual cataliza directamente la reacción de adenilación-desadenilación de la GS. La actividad de la ATasa se encuentra modulada por una proteína llamada P_{II} , la cual en su estado uridilado ($P_{II}D$) estimula la desadenilación de GS. Los diferentes estados que puede presentar la proteína P_{II} dependen a su vez de la adición o remoción de un grupo uridilo dado por una tercera enzima denominada uridiltransferasa o UTasa. De tal manera, que la proteína P_{II} puede estar en dos estados: uno uridilado, denotado como $P_{II}A$, que estimula la adenilación de la GS y otro uridilado o $P_{II}D$ que estimula la desadenilación (16). Un esquema de este complejo sistema de cascada se muestra en la Figura 3.

ADENILACION



DESADENILACION

Figura 3. Mecanismo de Adenilación - Desadenilación de la GS.

ATase, GS Adenil transferasa.

PIIA, Proteína PII no uridilada; PIID, Prot PII uridilada.

UTase; PII Uridiltransferasa; UR enzima removedora de uridilos.

GS-AMP; Glutamino sintetasa adenilada.

GS; Glutamino sintetasa.

El hecho de que la GS pueda tener diversos estados de adenilación, da la posibilidad de generar una gama en la actividad de la enzima, que va desde una enzima completamente activa (no adenilada (E_0)), hasta una enzima totalmente inactiva (totalmente adenilada (E_{12})). En este último estado la GS presenta muy baja afinidad por los sustratos y una alta afinidad por los inhibidores. Las formas de GS parcialmente adeniladas tienen propiedades intermedias entre las anteriormente descritas (4). La modificación covalente de la GS se encuentra controlada por señales metabólicas generales como la concentración de glutamina, 2-oxoglutarato, ATP y Pi, estos metabolitos funcionan como efectores tanto de la ATasa como de la UTasa (4,17). La posibilidad de responder a estos metabolitos a través de este sistema de cascada es más fina que si estos actuaran como efectores sobre la GS directamente, esta conclusión esta basada en cálculos teóricos de Stadman y Chock (18).

Otra característica importante del sistema de adenilación es que la modificación covalente de la GS se lleva a cabo en un tiempo muy corto (30 seg) (19), cuando el organismo es pasado de un medio que contiene una fuente nitrogenada limitante a un medio conteniendo exceso de NH_4^+ .

Los tres mecanismos anteriormente descritos son los directamente responsables de regular la actividad de GS; sin embargo, no solo la actividad sino también la concentración intracelular de esta enzima se regula dependiendo de la disponibilidad de nitrógeno en la célula. Condiciones en que la fuente nitrogenada es limitante

correlacionan con una máxima concentración de la enzima, en cambio, cuando las células se encuentran en condiciones de exceso de nitrógeno intracelular, los niveles de GS son bajos. Este aumento o disminución de la concentración de GS esta directamente relacionado a la concentración de RNA mensajero de glnA, el gene estructural. Cabe mencionar que las células crecidas en glutamina como fuente de nitrógeno presentan altas concentraciones de GS; para explicar este fenómeno se ha propuesto que este aminoácido no es transportado eficientemente al interior de la célula; sin embargo esto no ha sido demostrado (5).

Se ha reportado que tanto en Klebsiella aerogenes como en E. coli, la síntesis de varias enzimas encargadas de la utilización de fuentes alternas de nitrógeno (arginina, prolina, lisina, ornitina e histidina) así como de las proteínas involucradas en el transporte específico de estos aminoácidos, se encuentran regulados por la disponibilidad de nitrógeno en el medio. A todos estos genes se les conoce como parte del sistema "Reg" (5) o más recientemente "Ntr" (20). La caracterización de estas mutantes ha permitido la identificación de al menos cuatro genes reguladores comunes. Dos de ellos, glnI y glnG, se encuentran altamente ligados a glnA en tanto que los restantes, glnF y glnB, mapean lejos del gene estructural para GS. A continuación, se hará una descripción mas detallada tanto del gene estructural como de cada uno de los reguladores.

glnA

Como se mencionó, este es el gene estructural para la GS, se localiza en el minuto 86 del cromosoma de E.coli y en posición correspondiente en los cromosomas de K.aerogenes, K.pneumoniae y S.thyphimurium. Este gene se encuentra ligado por transducción a los loci rha y polA tanto en E.coli como en K.pneumoniae (5,21). Las mutaciones que han sido aisladas en este gene producen un fenotipo Gln^- , es decir, requieren de la adición de glutamina exógena para crecer. Este fenotipo se observa, ya sea por la pérdida del producto dado por inserciones de Tn10 y Mu en glnA (22,23,24,25) o por la presencia de altos niveles de GS enzimáticamente inactiva (Gln^-) las cuales además confieren el fenotipo NtrC (5,20,26,27).

glnF

Con el descubrimiento de una mutación en S.thyphimurium que confería auxotrofia por glutamina (Gln^-) y que no mapeaba cerca del gene glnA, fué identificado el primer gene regulatorio para la GS. Este gene fué localizado en el minuto 68 del mapa de E.coli y se encuentra ligado tanto a los genes argG como gltB (28,29). Mutaciones semejantes a las descritas anteriormente fueron aisladas en K.aerogenes, aunque en este organismo el orden de los genes en esa región del cromosoma parece ser diferente al de E.coli ya que el primero se encuentra glnF - argG - gltB mientras que en el segundo, al igual que en S.thyphimurium, es argG - glnF - gltB (29). Todas las mutaciones que han sido

descritas en este gene, (puntuales (29,30) o por inserción (28), son incapaces de elevar la concentración de GS a un nivel suficiente que les permita crecer en ausencia de glutamina exógena, tampoco son capaces de incrementar las concentraciones intracelulares de las proteínas que responden al sistema Ntr, provocando un fenotipo Ntr^- (29). Las mutantes en glnF están afectadas en la transcripción de glnA, sin estar afectadas el sistema de adenilación - desadenilación de GS (30). Debido a los fenotipos que presentan las mutantes en este gene ($Gln^- Ntr^-$) se ha involucrado en el proceso de activación tanto de glnA como de los genes Ntr. Castaño et al. ha demostrado a través de fusiones del gene lacZ con el gene glnF, que este se expresa constitutivamente en la célula (31). Este gene ha sido clonado y su producto ha sido identificado como un polipéptido de 75 000 daltons aproximadamente.

glnG

Se encontró que el fenotipo Gln^- conferido por mutaciones en el gene glnF era frecuentemente suprimido por mutaciones altamente ligadas a glnA, tanto en K.aerogenes (29) como en S.thyphimurium (32) y en E.coli (22). Todas estas mutantes confieren la posibilidad de crecer sin la adición de glutamina exógena y presentan una concentración intermedia de GS, no importando la composición del medio. A este fenotipo se le ha denominado $GlnR$. Todas las mutantes $GlnR$ son Ntr^+ . Mutantes similares han sido aisladas por inserción de transposones (Tn10 y Tn5) (32,24). De esta manera se descubrió la existencia del segundo gene regulatorio de glnA, a este gene se le llamo glnG.

Otro tipo de mutaciones que se han descrito en glnG provocan un fenotipo Gln y las revertantes espontáneas Gln⁻ que se obtienen presentan un fenotipo GlnR y Ntr⁻ (33).

Debido a que las mutantes que carecen del producto de glnG funcional son incapaces de incrementar la concentración de GS en condiciones de nitrógeno limitante (GlnR), se sugirió que el producto de este gene fuera un activador, al igual que glnF, sin embargo el hecho de que algunas mutantes en glnG presentan concentraciones menores de GS que aquellas que carecen de producto indican que el producto de glnG reprime la expresión de glnA. Para la integración de estos resultados es necesario proponer que el producto del gene glnG tiene una función dual en la expresión de glnA participando en el proceso de activación, en conjunción con el producto de glnF, así como por si solo en el de represión, Tabla 1.

Actualmente este gene ha sido clonado y su producto ha sido identificado como una proteína de 50000 daltons (34,35,36), este producto ha sido sobreproducido y purificado y al parecer su forma activa es como dímero (37,38).

glnD

Este gene codifica para la enzima UTasa, mapea en el minuto 4 del mapa de E.coli y en posiciones equivalentes para S.thyphimurium y K.aerogenes (39), el producto del gene glnD interviene en el

sistema de adenilación para la GS, uridilando a la proteína P_{II}, de tal manera que mutaciones en este gene resultan en una GS altamente adenilada. Las mutaciones en glnD tanto espontáneas como por inserción de Tn10 presentan un fenotipo Gln⁻ y Ntr⁻, al parecer el fenotipo Gln⁻ no solo se debe a la alta adenilación de GS sino al hecho de que la concentración de la enzima en estas mutantes es muy baja (40).

glnB

Mutantes con un fenotipo muy similar a las anteriormente descritas fueron aisladas tanto en K.aerogenes (23), en S.thyphimurium (42) y en K.pneumoniae (42). Estas mutantes presentan también un fenotipo Gln⁻ Ntr⁻ pero se localizan en una posición diferente a las mutantes en glnD, en el minuto 55 del mapa de E.coli (43). El fenotipo de estas mutantes es frecuentemente suprimido por mutaciones por inserción de Tn5 que mapean muy cerca de la mutación original y que provocan la pérdida del producto del gene glnB (Proteína P_{II}) (20).

El estudio de una mutante en K. aerogenes reveló la existencia de una proteína P_{II} alterada incapaz de promover la desadenilación de GS debido a que no podía ser uridilada por la UTasa (44,45) la GS en esta mutante se encuentra altamente adenilada y además sus niveles son bajos. Como se mencionó, inserciones en glnB suprimen el fenotipo Gln⁻, la síntesis de la GS en estas supresoras es alta y constitutiva (GlnC) a pesar de que la GS en ellas sigue estando totalmente adenilada. Estos resultados

fenotipo GlnC NtrC, se observó que deleciones de este gene conservan una regulación casi normal de la síntesis de GS. A partir de estos datos se ha sugerido que el producto de glnL, por lo menos para E. coli, no es esencial para la regulación. Ya que mutantes en este gene pueden suprimir a mutaciones en glnB o glnD, se ha propuesto que el producto de glnL forme parte del complejo antiactivador junto con la proteína P_{II}. Actualmente este gene ha sido clonado y se sabe que codifica para un producto de 36000 daltones (34,42,35).

Operon glnALG

La clonación de la región cromosomal en la que se encuentran los genes glnA, glnL y glnG de E. coli permitió llevar a cabo un análisis fino de esta región a través del uso de endonucleasas de restricción (50,51,52) y de experimentos de complementación de diferentes mutantes. Así fue posible demostrar que los genes glnA, glnL y glnG se encuentran contiguos en una región de DNA de aproximadamente 4500 pb y que se transcriben en sentido contrario a las manecillas del reloj (53). Se han acumulado evidencias las cuales apoyan que la organización de estos genes constituyen un operón que se transcribe de glnA hacia glnG (25,52,54). Estas evidencias provienen de: primero, que inserciones tanto en glnA como en glnG son incapaces de activar los genes del sistema Ntr (24) y segundo, que fusiones del gene lacZ con glnG, en las cuales los niveles de β -galactocidasa reflejan la expresión de glnG, demuestran que este gene se regula en forma paralela a glnA (54). Sin embargo, el hecho de que células merodiploides conteniendo a glnA y a glnG en posición trans presentan una

sugieren que P_{II} esta involucrada en la regulación de la síntesis de GS independientemente de su función en el sistema de adenilación.

Debido a que la pérdida de P_{II} ocasiona un aumento en la concentración de GS se propuso que P_{II} antagoniza con la síntesis de glnA (23), pero ya que su efecto solo es observado en presencia del gene glnF, actualmente se propone que P_{II} funciona como un antiactivador de la síntesis de glnA (20).

Recientemente se ha demostrado que el fenotipo Gln^- causado por lesiones en el gene glnD puede sere suprimido con inserciones en glnB (46).

glnB ha sido localizado entre los genes nadB y guaA y mapea muy cerca del gene glyA (45). Actualmente ha sido clonado y se sabe que codifica para un péptido de 11000 daltones, este tamaño coincide con el peso de la subunidad de la proteína P_{II} (Godie H. et al. datos no publicados)

glnL

Se han aislado mutaciones supresoras del fenotipo $Gln^- Ntr^-$, producido por mutaciones en los genes glnB y glnF, que se encuentran altamente ligadas a glnA y que presentan un fenotipo $Gln^+ Ntr^+$ (23,47). El análisis de estas mutantés confirmo que tanto glnA como glnG eran funcionales, por lo tanto esta mutación se asigno a un nuevo gene que se le llamo glnL (48,49). A pesar de que las primeras mutaciones aisladas en glnL conferían el

Tabla 1.

Características de los genes del sistema gln.

Gene	Localización cromosomal	Tamaño del péptido	Fenotipo de mutantes en este gene.	Producto	Función probable
<u>glnA</u>	86	55,000	Gln ⁻ , Ntr ⁻ Gln ⁻ , NtrC	Glutamino Sintetasa	Gene estructural de GS.
<u>glnG</u>	86	50,000	GlnR, Ntr ⁻	NRI	Activador del operón <u>glnALG</u> y de los genes del sistema Ntr Represor del operón
<u>glnL</u>	86	36,000	GlnC, NtrC GlnR, Ntr Gln ⁺ /C, Ntr ⁺	<u>pglnL</u>	Antiactivador del complejo activador Activador en <u>Klebsiella</u> represor en <u>Salmonella</u>
<u>glnF</u>	68	70,000	Gln ⁻ , Ntr ⁻	<u>pglnF</u>	Activador del operón <u>glnALG</u> y de los genes Ntr, subunidad Sigma.
<u>glnB</u>	55	11,000	Gln ⁻ , Ntr ⁻ Gln ⁻ , Ntr ⁻	P _{II}	Estimula la adenilación ó desadenilación de GS. Antiactivador.
<u>glnD</u>	4	-	Gln ⁻ Ntr ⁻	UTasa	Uridila y desuridila a la proteína PII.
<u>glnE</u>	-	-	Gln ⁺ , Ntr ⁻	ATasa	Adenila a GS

regulación normal de GS (24,32), sugiere que glnG no es transcrito exclusivamente a partir del promotor de glnA (glnAp). Para explicar los resultados anteriormente descritos se propuso la existencia de un segundo promotor capaz de transcribir a glnG. Actualmente se sabe que este promotor secundario se encuentra en la región intercistronica de glnA y glnL (55), y se le ha denominado glnLp. Este promotor se reprime por NRI, que es el producto del gene glnG (Tabla 1).

El operón glnALG es un operón complejo, en el cual existen por lo menos dos diferentes sitios de iniciación de la transcripción. En condiciones limitantes de nitrógeno, la transcripción de los tres genes (glnA, glnL, glnG) proviene preferencialmente de glnAp, bajo estas condiciones los niveles de glnG son lo suficientemente altos para activar glnAp y reprimir glnLp. En condiciones de exceso de nitrógeno, la transcripción proveniente de glnAp disminuye. En estas condiciones glnG también se transcribe a partir de glnLp. Los niveles de este transcrito en estas condiciones son menores que cuando proviene de glnAp.

Al igual que glnG, glnL puede ser transcrito tanto de glnAp como de glnLp. Sin embargo, es interesante resaltar que no importando de donde provenga esta transcripción, los niveles del producto de este gene son menores que los de NRI, por lo que este gene debe tener una regulación post-transcripcional (37). El análisis de la secuencia nucleotídica de la región de glnL reveló la existencia de un posible promotor; de una secuencia que podría ser el sitio operador para NRI (37), así como una secuencia que podría funcionar como un terminador Rho-independiente, de la

transcripción proveniente de glnAp (56).

Para finalizar esta introducción, quiero describir los modelos que han sido propuestos en base a todos los datos genéticos y moleculares que han sido mencionados. S. Kustu propuso el primer modelo de regulación del operón glnALG (32,49). Este modelo supone que NRI es un producto bifuncional. En coordinación con el producto de glnL funciona como represor, en tanto que en conjunción con el producto de glnF se transforman en un activador. Este modelo se ha ido modificando con la acumulación de nuevos datos genéticos. Magasanik hizo algunas modificaciones al modelo original (20) que básicamente consisten en que el producto de glnG es capaz de existir en dos diferentes conformaciones, en forma libre funcionaría como represor (sin necesidad del producto de glnL) y cuando interacciona con el producto de glnF formaría parte del activador. El producto de glnL tendría una función de antiactivación al no permitir que los productos de glnF y glnG interaccionaran, esto dependería de la disponibilidad de nitrógeno en el medio. Por otro lado la proteína P_{II} estaría encargada de transmitir esta señal al producto de glnL, este modelo se ejemplifica en la Figura 4.

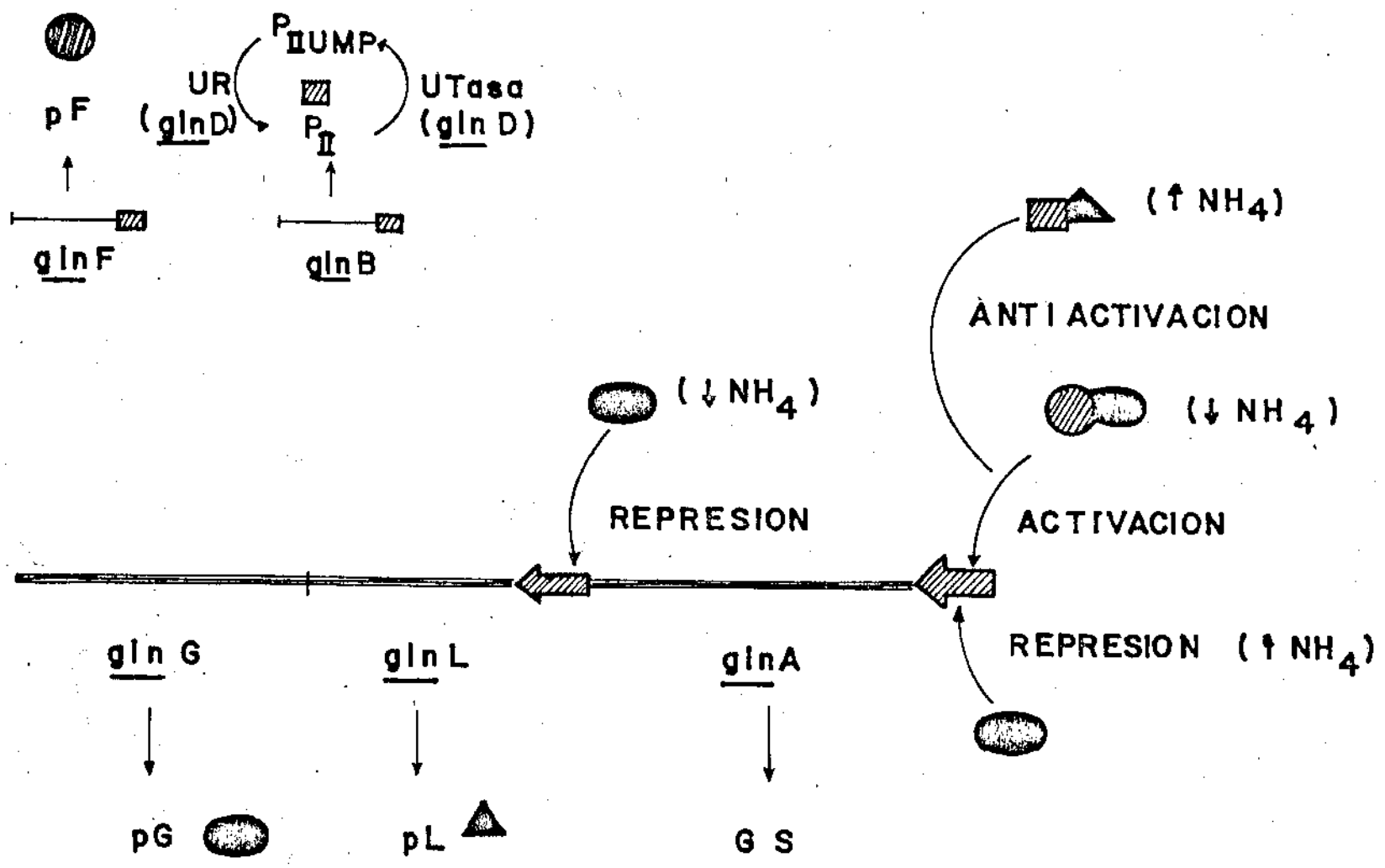


Figura 4. Modelo de regulación de la expresión del operón *glnA**L**G* propuesto por B. Magasanik (20).

ANTECEDENTES

En esta sección se enfatizarán algunos puntos importantes directamente relacionados con este trabajo, muchos de los cuales han sido ya tocados en la introducción.

La expresión del operón glnALG, al igual que la de otros genes involucrados en la asimilación de fuentes alternas de nitrógeno (Ntr), varía dependiendo de las condiciones de nitrógeno en el medio.

En condiciones en las cuales el nitrógeno se encuentra limitante, la transcripción de estos genes aumenta debido a la inactivación ~~dada por los productos de los genes glnG y glnF sobre glnAp~~. Al parecer el producto de glnF podría funcionar como una subunidad sigma para la RNA polimerasa. En estas condiciones glnLp estaría reprimido por el producto de glnG en su forma de represor.

En condiciones de exceso de nitrógeno, existe una disminución de la transcripción de glnALG a partir de glnAp ya que no es activado tan eficientemente como en las condiciones anteriores. La cantidad de NRI (en su forma de represor) disminuye a un nivel que es insuficiente para reprimir glnLp, por lo cual hay transcripción a partir de este promotor. La disponibilidad de nitrógeno en el medio es "sentida" probablemente por la UTasa a través de la relación 2-oxoglutarato/glutamina. De esta manera la UTasa, al modificar a la proteína P_{II} transmitiría la señal de la disponibilidad de nitrógeno en el medio a los sistemas

reguladores de GS.

El sistema de adenilación sirve al parecer, como un sistema de respuesta rápida que permitiría a la célula adaptarse a nuevas condiciones ; mientras que la regulación de GS a nivel de transcripción constituiría una respuesta más lenta. A pesar de que los modelos anteriormente descritos explican el papel de las diferentes moléculas reguladoras, no hablan acerca del sitio de unión de éstas al DNA. Datos importantes a este respecto han sido obtenidos a través del estudio de mutantes cis dominantes en la región regulatoria de glnA.

Rothstein y Magasanik (57), reportaron el aislamiento de una mutante cis-dominante que suprime el fenotipo Gln^- causado por una mutación en glnF. El análisis de esta mutante sugirió que la causa de la supresión se debía a que el sitio de unión de glnG como represor había sido mutado, por lo que este producto era incapaz de ejercer su efecto como represor. Cuando el gene glnF es restaurado la concentración de GS en estas mutantes, en condiciones de activación, es semejante a la cepa silvestre. Estos datos sugieren que el glnA se regula tanto positivamente como negativamente, y que los sitios de unión para ejercer ambos efectos son distintos.

McCarter et al. (58) describieron dos clases de mutaciones supresoras del fenotipo Gln^- . Estas mutantes fueron aisladas tanto a partir de las cepas glnF como de cepas en las cuales NRI actúa como super-represor (glnG(Rep)).

Una de estas mutantes (glnAp) es insensible a represión y presenta una activación silvestre. Estas mutantes son muy parecidas a la reportada por Rothstein y Magasanik (57). La otra mutante denominada glnAp (up); se ha explicado como una mutación que incrementa la fuerza del promotor de glnA en ausencia de activación.

Por último Osorio et al. (1983) caracterizaron una mutante que alteraba la expresión de glnA, y que se encuentra 100% ligada a glnA. Esta mutante se denominó gln-76. ya que mi trabajo está basado en gran parte en esta mutante, merece tener una descripción especial (59).

La mutante gln-76 se seleccionó como una resistente a metionina sulfoximina (MS), que es un análogo de glutamina, a partir de una cepa glnG (glnG74::Tn5).

En presencia de todos los reguladores, la mutación gln-76 presentaba una actividad normal de GS en condiciones de limitación de nitrógeno, lo que sugirió que el proceso de activación no se encontraba alterado. Bajo condiciones de exceso de amonio sin embargo, presentaba el doble de actividad que la observada en la cepa silvestre (Tabla 2).

En ausencia de glnG (gln-76, glnG74::Tn5) los niveles de GS son muy altos, lo cual podría explicar el que las cepas conteniendo la mutación gln-76 sean resistentes a MS. Una cepa gln-76, glnF presenta un fenotipo Gln^+ y una actividad detectable de GS, tanto en limitación como en exceso de nitrógeno aunque es más elevada

en la última condición. Estas actividades pueden observarse en la Tabla 2.

Debido a que el efecto de la mutación gln-76 es un aumento en las actividades de GS aún en ausencia de glnG, se concluyó que gln-76 provocaba un aumento en la fuerza del promotor de glnA. Al igual que la cepa silvestre, la cepa con la mutación gln-76 sigue siendo reprimida y activada, por lo que esta mutación parecía no afectar ningún sitio importante para la regulación.

El hecho de que el aumento de la transcripción por la mutación gln-76 solo sea observado en condiciones de exceso de nitrógeno, sugirió la posible existencia de dos promotores en esta región cada uno de los cuales funcionaría en diferentes condiciones. El promotor mutado en gln-76 sería funcional solo en exceso de nitrógeno. La existencia de dos promotores en la región regulatoria de glnA, era apoyada por los datos de la secuencia nucleotídica de esta región, ya que en ella se habían detectado más de una posible secuencia promotora (60).

Recientemente, Garcarrubio et al. (EMBO J. sometido a publicación) a través del análisis de los transcritos de la región, utilizando distintos fondos genéticos, identificó dos transcritos distintos provenientes de la región regulatoria de glnA que se regulan diferencialmente. El más pequeño de ellos, es detectado tanto en exceso como en limitación de nitrógeno, mientras que el transcrito mayor solo en exceso de nitrógeno y a concentraciones muy bajas. El promotor a partir del cual se inicia el transcrito mas pequeño (glnAp2), requiere ser activado

Tabla 2.

Caracterización fenotípica de la mutante gln-76

Cepa	Genotipo relevante	Gln	Fenotipo Ntr	MS	Actividad específica de GS		
					NH ₄ ⁺ bajo	NH ₄ ⁺ alto	gln
MX614	Silvestre	+	+	R	1.96	0.26	1.76
MX929	<u>gln-76</u>	+	+	R	1.97	0.53	1.4
MX902	<u>glnG74::Tn5</u>	+	-	S	0.02	0.05	0.05
MX927	<u>glnG74::Tn5 gln-76</u>	+	-	R	4.13	1.87	2.86
MX848	<u>glnF73::Tn5</u>	-	-	S	-	-	70.001
MX931	<u>glnF73::Tn5 gln-76</u>	+	-	S	0.15	0.50	0.37

Las actividades están dadas en μmol de γ -glutamihidroxamato formado por min, por mg de proteína a 37°C.

NH₄⁺ bajo: medio mínimo (NN), glucosa 0.2% y amonio 0.5 mM.

NH₄⁺ alto: medio mínimo (NN), glucosa 0.2% y amonio 15 mM.

gln : medio mínimo (NN), glucosa 0.2% y glutamina 1 mg/ml.

BIBLIOTECA
 DE LA ESCUELA NACIONAL
 DE QUÍMICA
 Y FARMACIA
 DE GUATEMALA

por los productos de glnF y glnG de tal manera que en ausencia de ellos no hay transcripción a partir de él. El requerimiento por el producto de glnF no es tan estricto, al parecer cepas carentes de éste pueden transcribir glnA a partir de glnAp2. Cabría hacer notar que en cepas glnF los niveles del transcrito de glnA son sumamente bajos y que la concentración de GS no es detectable (Gln^+).

El promotor distal (glnAp1) a partir del cual se inicia la transcripción del transcrito mayor está sujeto a represión por el producto de glnG, esta represión es mayor en condiciones de limitación de nitrógeno. En este sentido glnAp1 responde de manera similar a glnIp. Un fenómeno interesante es que en mutantes en glnI aumenta la transcripción de este promotor.

Estos resultados han sido corroborados por Reitzer y Magasanik para E.coli (62) y por R.Dixon en el caso de Klebsiella pneumoniae (63), los cuales han encontrado la existencia de los dos transcritos descritos anteriormente.

Para finalizar, quisiera mencionar que desde hace tiempo Prusiner et al. (64) observó que había una regulación de la expresión de GS con respecto a la fuente de carbono ejercida por CAP y AMPc.

El análisis de la secuencia nucleotídica de la región regulatoria de glnA reveló la presencia de un posible sitio de unión a CAP-AMPc que se encuentra a 60 pb del promotor distal (glnAp1). A este respecto, el análisis de los transcritos de la cepa silvestre crecida en un medio con una fuente limitante de carbono (lactato) reveló un aumento en la cantidad del transcrito

mayor (glnAp1) con respecto a lo observado en una cepa crecida en glucosa (61). Reitzer y Magasanik (62) por su parte tienen evidencias de que el promotor glnAp1 requiere ser activado por CAP-AMPC.

OBJETIVO

El objetivo general del grupo es comprender a nivel molecular el mecanismo de la regulación del operón glnALG y su integración a la regulación general del metabolismo celular.

Este interés se basa, tanto en el hecho de que la GS es una enzima central en el metabolismo nitrogenado, como en que, debido a su complejidad, este operón es sumamente atractivo como un modelo para estudiar la regulación genética en procariotes.

El objetivo particular de este trabajo, fué la caracterización física e identificación de regiones importantes para la regulación del operón en la zona de control de glnA a través del estudio de mutantes *cis*-dominante de la región de glnA.

La primera parte de este trabajo consistió en la caracterización a nivel molecular de la mutante gln-76 aislada en el laboratorio de Fernando Bastarrachea. La secuencia nucleotídica de esta mutante, reveló que la mutación gln-76 consistía en el cambio de una de las bases mas conservadas de la región de -10 de glnAp1, provocando un aumento en la fuerza de este promotor. La identificación de los sitios de iniciación de la transcripción demostró que este promotor es funcional en la cepa silvestre y que esta mutación provoca un aumento en la transcripción proveniente de glnAp1. Para estudiar la participación de glnAp1 bajo diferentes condiciones metabólicas, se decidió obtener mutantes en este promotor. La segunda parte de este trabajo

consiste en el aislamiento y caracterización preliminar de una mutante que anula la transcripción proveniente de glnAp1.

Es importante remarcar que es imposible desligar este trabajo del contexto general de el grupo y que constituye solo una estrategia particular hacia el objetivo general.

JB 469

RUNNING TITLE:

Characterization of a glnA promoter mutation.

A GLUTAMINE SYNTHETASE CONSTITUTIVE MUTATION AFFECTING THE
glnALG UP-STREAM PROMOTER OF Escherichia coli.

Patricia León¹, David Romero¹, Alejandro Garcíarrubio¹,
Fernando Bastarrachea² and Alejandra A. Covarrubias^{1*}.

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno,
Universidad Nacional Autónoma de México.
Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, México¹, and
Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional
Autónoma de México, Apartado Postal 70-600, México, D.F.,
México 04510 .

* Corresponding author.

Summary: The spontaneous gln-76 mutation of Escherichia coli (Osorio et al., 1984, Mol. Gen. Genet. 194: 114-123) was previously shown to be responsible for the cis-dominant constitutive expression of the glnA gene in the absence of a glnG-glnF activator system. Nucleotide sequence analysis has now revealed that gln-76 is a single transversion T/A to A/T, an up-promoter mutation affecting the -10 region of glnA_{p1}, the upstream promoter of the glnALG control region. Both, wild type and gln-76 DNA control regions were cloned into the promoter-probe plasmid pK01. Galactokinase activity determinations of cells carrying the fused plasmids showed ten-fold more effective expression mediated by gln-76 than by glnA wild type control region. Primer extension experiments using RNA from strains carrying the gln-76 control region indicated that the transcription initiation sites were the same in both the gln-76 mutant and the wild type.

INTRODUCTION

The structural gene for glutamine synthetase, glnA, is a part of the complex glnALG operon located at 86 min on the Escherichia coli chromosome. It is transcribed counterclockwise from glnA to glnG (13, 16, 19, 32, 37). The products of other genes of the operon, glnL and glnG, as well as the product of the unlinked gene, glnF, are regulatory proteins (21, 26). Genetic and physiological studies have shown that these proteins control the expression of the glnALG operon both positively and negatively (2, 12, 17, 20, 24, 31). Furthermore, these gene products are required to activate the expression of a number of genes or operons involved in the transport and/or utilization of various nitrogenous compounds, the Ntr phenotype (21).

Recently, it has been shown that the glnA gene of E. coli is transcribed from two tandem promoters (34, Garcarrubio et al., EMBO J. submitted for publication). Therefore, the glnALG operon can be transcribed from three promoters: two preceding glnA (glnAp1 and glnAp2) and a third one preceding glnL (glnLp) (32, 40). According to these results, the view of how the glnALG operon is regulated has been slightly modified. Under carbon excess and nitrogen limitation all transcription from the glnALG operon starts at the downstream promoter glnAp2. Expression from this promoter requires the glnG as well as the glnF products. Under these conditions, the upstream promoter, glnAp1, and glnLp are repressed by the glnG product (33). Under conditions of carbon limitation and nitrogen excess, the

activation of glnAp2 is reduced through the action of the glnL product, presumably in combination with the P_{II} protein (21), and the repression of glnAp1 and glnLp exerted by the glnG product is partially relieved. Compared with conditions of nitrogen limitation, this results in an increase of the glnA transcripts originated from glnAp1 and a decrease of those initiated at glnAp2

To better understand the function of the two glnA promoters, mutations in this region of the DNA are clearly needed. cis-dominant mutations for glutamine synthetase expression have been isolated in Klebsiella aerogenes (36) and Salmonella typhimurium (23). Osorio et al. (29) reported the genetic characterization of a cis-dominant mutation (gln-76) in E.coli which leads to high levels of expression of glutamine synthetase in the absence of a functional glnG product (under both nitrogen limitation or excess). When all regulatory molecules are present, the effect of this mutation becomes evident only under nitrogen excess conditions leading to an increase in the glutamine synthetase specific activity. A careful analysis of the phenotypic characteristics of the gln-76 allele in different genetic backgrounds, suggested the presence of an up-promoter mutation.

In this paper we report the molecular characterization of the gln-76 mutation. The alteration associated with this mutation is a single transversion T/A to A/T resulting in an up-promoter mutation affecting glnAp1. The glnA transcripts in this mutant

start at the same sites as those in the wild type strain.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and phage. All strains used were derivatives of E.coli K-12 (Table 1). P1 virA was used for transduction experiments.

Culture media. The NN minimal medium used has been described (8). Additions to this medium in final concentrations were: 0.2% glucose as carbon and energy source, 15 mM NH_4Cl for N-excess medium and either 0.5 mM NH_4Cl or 1 mg/ml L-glutamine as N-limiting medium. Tests for resistance to 80 μM L-methionine-DL-sulfoximine were made on N-excess medium (29). The presence of transposon Tn5 was scored by resistance to 30 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin. Concentrations for other nutritional requirements used ranged from 0.5 to 2 mM. The M56 minimal medium was used as described elsewhere (1). This medium was supplemented with 0.2% glucose as a carbon source, 15 mM NH_4Cl , 0.2% casaminoacids and 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin.

Plasmids. All plasmids used are shown in Table 1. Plasmid DNA was purified according to Betlach et al. (4). The constructed recombinant plasmids were derivatives of either pBR327 (39) or pACR1 (8). pK0glnA and pK0gln-76 were hybrid plasmids derived from pK01 (25); these plasmids contain a 524 base pair (bp) HaeIII-SmaI fragment carrying either the wild type glnA or the gln-76 regulatory region, respectively, just upstream the galK gene. DNA manipulations were according to Maniatis et al. (22)

Genetic procedures. Preparation of P1 lysates and the protocol for transductions were according to Miller (28). In order to construct recA strain derivatives, thyA mutants were obtained by trimethoprim selection (28). These were used as recipients in crosses with Hfr strain JC5088 (recA56) (Table 1). Rec⁻ derivatives among the Thy⁺ recombinants were recognized by their sensitivity to 2 µg/ml nitrofurantoin (15).

E. coli cells were prepared for transformations as described by Cohen et al. (7).

Enzyme activities. Glutamine synthetase activity was determined by the γ-glutamyl transferase assay as previously described (8). Specific activities are given as nanomoles of γ-glutamyl hydroxamate formed per min per mg protein at 37°C. Galactokinase activity was assayed as described by Duester et al. (11). Galactokinase specific activities are expressed as nanomoles of galactose phosphorylated per min per mg protein at 30°C. Protein was determined by the method of Lowry et al. (18) using bovine serum albumin as standard.

DNA sequence analysis. All DNA sequences were determined according to Sanger et al. (38), using deoxy (α-{³⁵S}thio) adenosine triphosphate (410 Ci/mmol) and a buffer-linear gradient polyacrylamide gel (5). The DNA fragments to be sequenced were previously cloned into M13mp8 (27) or pBR327 vehicles and the universal sequencing primer (17 mer) (27) or the EcoRI primer (16 mer) (41) were used for the polymerization reactions. The recombinant clones were screened by plaque and colony

hybridization as described by Maniatis et al. (22).

Primer extension procedure. A modification of a protocol kindly provided by John Rossi (Beckman Institute of the City of Hope, Duarte, CA), was followed using a synthetic oligonucleotide as primer for the synthesis of cDNA which is homologous to a sequence adjacent to the EcoRI site in pACR101 and pACR761 (41). A [^{32}P]-5'-end labelled primer (0.1 pmol) was mixed with 50 μg total RNA obtained from RR1 strain carrying either pACR101 or pACR761 plasmids and grown in N-excess medium. The mixture was denatured at 94°C for 5 min in 8.7 mM Tris-HCl pH 8.3, 0.35 mM EDTA and immediately chilled on dry ice. Primer-RNA hybridizations were incubated at 43°C for 3 hrs. The reverse transcription reaction was carried out in 52 mM Tris-HCl pH 8.3, 10.4 mM MgCl_2 , 4.2 mM dithiothreitol, 1 mM each dGTP, dATP, dCTP, dTTP and 54 units of reverse transcriptase in a final volume of 25 μl and incubated for 30 min at 43°C. The RNA was degraded using 2 μl of a 1 mg/ml RNase A solution for 1 hr at 37°C. After phenol extraction and ethanol precipitation, the cDNA was resuspended in 3 μl of water, mixed with 5 μl of stop dye (95% formamide, 0.02% xylene cyanol and 0.02% bromophenol blue) and electrophoresed in a 6% acrylamide-7 M urea gel.

Reagents. Enzyme and dideoxynucleotides were obtained from PL-Biochemicals; amino acids, vitamins, deoxyribonucleotides and L-methionine-DL-sulfoximine were from Sigma Chemical Co. Radiochemicals were from Amersham International. All other reagents used were of analytical grade.

Table 1. E.coli strains and plasmids

Strain	Description	Source or reference
RR1	<u>hsdS20</u> (<u>r_B⁻</u> <u>m_B⁻</u>) <u>recA13</u> <u>ara-14</u> <u>proA2</u> <u>leuB6</u> <u>lacY1</u> <u>galK2</u> <u>rpsL20</u> <u>xyl-5</u> <u>mtl-1</u> <u>supE44</u>	(8)
MX614	Δ (<u>pro-lac</u>) <u>galE</u> <u>ilv-680</u> <u>thi-1</u>	(3)
MX727	Δ (<u>pro-lac</u>) Δ (<u>gal attλ bio</u>) <u>ilv-680</u> <u>thi-1</u> <u>glnA71::Tn5</u>	(3)
MX794	RR1 <u>glnG74::Tn5</u>	Laboratory collection
MX914	Δ (<u>pro-lac</u>) Δ (<u>gal attλ bio</u>) <u>supF</u> <u>ilv-680</u> <u>thi-1</u> <u>lamB</u> Δ (<u>glnALG-rha</u>)	(29)
MX919	MX914 <u>recA56</u>	This work
MX922	MX919 (pACR1)	This work
MX924	MX914 (pACR1)	This work
MX929	MX614 <u>gln-76</u>	(29)
MX966	MX914 (pACR71)	This work
MX990	MX919 (pACR76)	This work
5088	Hfr <u>thr</u> <u>ilv</u> <u>thi</u> <u>rpsE</u> <u>recA56</u>	(6)
JM101	Δ (<u>pro-lac</u>) <u>supE</u> <u>thi-1/F'</u> <u>traD36</u> <u>proAB⁺</u> <u>lacI^qZΔM15</u>	(27)
Plasmids		
pBR327	Ap ^r Tc ^r	(39)
pACR1	ColE ^{imm} <u>glnA⁺</u> <u>glnL⁺</u> <u>glnG⁺</u>	(8)
pACR71	pACR1 <u>glnG74::Tn5</u>	This work
pACR76	pACR1 <u>gln-76</u>	This work
pK01	Ap ^r <u>galK^a</u>	(25)
pK01 Δ	Ap ^r <u>galK</u> , deletion of the 311 bp <u>EcoRI-SmaI</u> - fragment of pK01	This work

Table 1. E.coli strains and plasmids

(continue)

Strain	Description	source or reference
<u>pKO-glnA</u>	pK01-Δ containing the wild type <u>glnA</u> control region	This work
<u>pKO-gln-76</u>	pK01-Δ containing the <u>gln-76</u> control region	This work
<u>pACR101</u>	Ap ^r Tc ^S ; pBR327 derivative containing the wild type <u>glnA</u> control region	This work
<u>pACR761</u>	Ap ^r Tc ^S ; pBR327 derivative containing the <u>gln-76</u> control region	This work

^aThe galK gene in these plasmids is not expressed since it lacks a promoter region.

Table 2. Glutamine synthetase levels in extracts of wild-type and gln-76 strains.

Strain	Relevant genotype	Glutamine synthetase sp act ^a :	
		N-limiting medium	N-excess medium
MX614	Wild type	1990	240
MX929	<u>gln-76</u>	1970	530
MX922	$\Delta(\text{glnA-glnG})$ (pACR1)	3000	250
MX990	$\Delta(\text{glnA-glnG})$ (pACR76)	3120	898
MX966	$\Delta(\text{glnA-glnG})$ (pACR71)	10 ^b	ND ^c

^aNanomoles of γ -glutamyl hydroxamate formed per min per mg protein at 37°C. Cultures were grown in minimal medium containing 0.2% glucose and 0.5 mM NH₄Cl (N-limiting medium) or 0.2% glucose and 15 mM NH₄Cl (N-excess medium).

^bIn the case of MX966 the N-limiting medium contained 0.2% glucose and 1 mg/ml glutamine.

^cNot determined.

Table 3. Galactokinase activities originating from the glnA regulatory region fused to pK01 - promoter probe.

Plasmid	Galactokinase ^a	
	Strain RR1	Strain MX794
(pK01-Δ)	0.8	0.8
(pK0- <u>glnA</u>)	3.4	2.4
(pK0- <u>gln-76</u>)	22.6	25.2

^a Nanomoles of ¹⁴C-galactose phosphorylated per min per mg protein at 30°C. Galactokinase activity directed by plasmid pK01-Δ alone could be explained by readthrough from a pBR322 promoter. The cultures were grown at 37°C in M56 minimal media supplemented with 0.2% glucose, 0.2% casamino acids, 15 mM NH₄Cl and 100 μg/ml ampicillin.

Table 4. Sequence of glnA promoters^a.

	-35 region	-10 region	Reference
<u>E. coli</u> consensus promoter	T T G A C A	T A T A A T	(14)
<u>E. coli</u> <u>glnAp1</u>	T T G C A C	T T C C A T	Garciarrubio et al. submitted for publication
<u>E. coli</u> <u>gln-76p1</u>	T T G C A C	T A C C A T	This paper
<u>E. coli</u> <u>glnAp2</u>	T T A A A A	T A T C T T	Garciarrubio et al. submitted for publication

^aComparison of the glnA and gln-76 promoter sequences with the consensus.

Location of glnAp2 is assumed on the basis of the transcriptional start site and by homology with the consensus sequence of a typical E.coli promoter.

It has been suggested that the glnF product functions as a sigma-like factor (10); implying that glnAp2 belongs to a family of promoters which are recognized by a different RNA polymerase.

LEGENDS FOR THE FIGURES

FIG. 1. Schematic representation of the construction of the pACR761 and M13mp8 gln-76. Plasmid pACR76 was digested with SmaI, and BamHI linkers were added. After cleavage by EcoRI and electrophoresis, the 731 bp fragment was eluted from a low-melting point agarose gel and ligated with pBR327 digested with BamHI and EcoRI to obtain pACR761. To clone in M13mp8, pACR76 was digested with HaeIII and the 625 bp fragment was purified from a low-melting point agarose gel and ligated with the M13mp8 (RF) digested with SmaI. A similar strategy was followed to construct equivalent plasmids carrying the glnA wild type control region (pACR101 and M13mp8-glnA, respectively). The restriction enzyme sites relevant in these constructions are shown as B (BamHI), E (EcoRI), H (HaeIII), P (PstI), and S (SmaI). The dashed bar indicates the chromosomal DNA and the open bar ColE1 DNA. The arrows inside the circles show the direction of transcription.

FIG. 2. Autoradiograph showing the nucleotide sequence of the glnA(gln-76) promoter-control region using M13 vector. The complete nucleotide sequence of a 814 bp fragment containing the wild-type and the gln-76 promoter-control region was obtained. A difference in only one nucleotide was detected. This figure shows the region where this alteration was found. Lanes G,A,T,C correspond to the gln-76 mutant sequence, while lanes G°,A°,T°,C° correspond to the wild type strain. The single transversion found is indicated at the right of the figure, where wt indicates the wild type sequence.

FIG. 3. Nucleotide sequence of the promoter-regulatory region of the glnA gene. The sequence of the wild type promoter-regulatory region of the glnA gene presented here is the one previously reported by Covarrubias and Bastarrachea (9) with some corrections: the GC at positions -150 and -149 was a CG; between the C and A at positions -125 and -14 a G has been eliminated. The wavy line denotes the presumed ribosomal binding site. The location of the two transcription initiation sites are shown by the circled numbers. The presumptive -10 and -35 regions for the glnA promoters (glnAp1 and glnAp2) are squared. Dashed bars show DNA regions with high homology with the one present in the glnL control region and which is protected from DNase digestion by the glnG product (35, 40). A HaeIII site between coordinates +9 and +14 is underlined. The sequence overlined with a black bar corresponds to the sequences proposed by Ow et al. (30) as a possible glnG product binding site. The T/A to A/T transversion, found in the strain carrying gln-76 is indicated at position -127.

FIG. 4. Localization of the transcription initiations sites in the glnA(gln-76) promoter-control region. The primer extension experiments were carried out as described in Materials and Methods. The upper part of the figure shows a schematic representation of this experiment. The primer used hybridizes with a region adjacent to the EcoRI site corresponding sequence in the fused transcripts (discontinuous arrows) coming from either glnAp1 or glnAp2. The small open bars indicate the 5'-end

labeled EcoRI primer from which the cDNA's were extended up to the 5'-end of the transcripts (continuous arrows). The large open bar indicates the DNA region corresponding to the cloning vector pBR327. p1 and p2 indicate the glnAp1 and glnAp2 promoters, respectively. Some relevant restriction sites are shown as B(BamHI), E(EcoRI) and P(PstI). The lower part of the figures shows the autoradiograph of the extended primers. Two main bands are seen with sizes of 340 b(t1) and 224 b(t2). The experiment was carried out using total RNA purified from RR1 strain bearing pACR761 (lanes 2, 4, and 5) or pACR101 (lane 3). Lanes 2 and 5 correspond to 1:3 and 1:2 dilutions, respectively, from the sample in lane 4. The fainter bands could be due to pauses during reverse transcription. The molecular weight markers used are ϕ X174 (RF)-DNA digested with HincII enzyme (lane 1) and G, A, T, and C ladders of a known dideoxy-sequencing reaction. The sizes of the ϕ X174 (RF)-HincII fragments are indicated in bases at the left part of the figure.

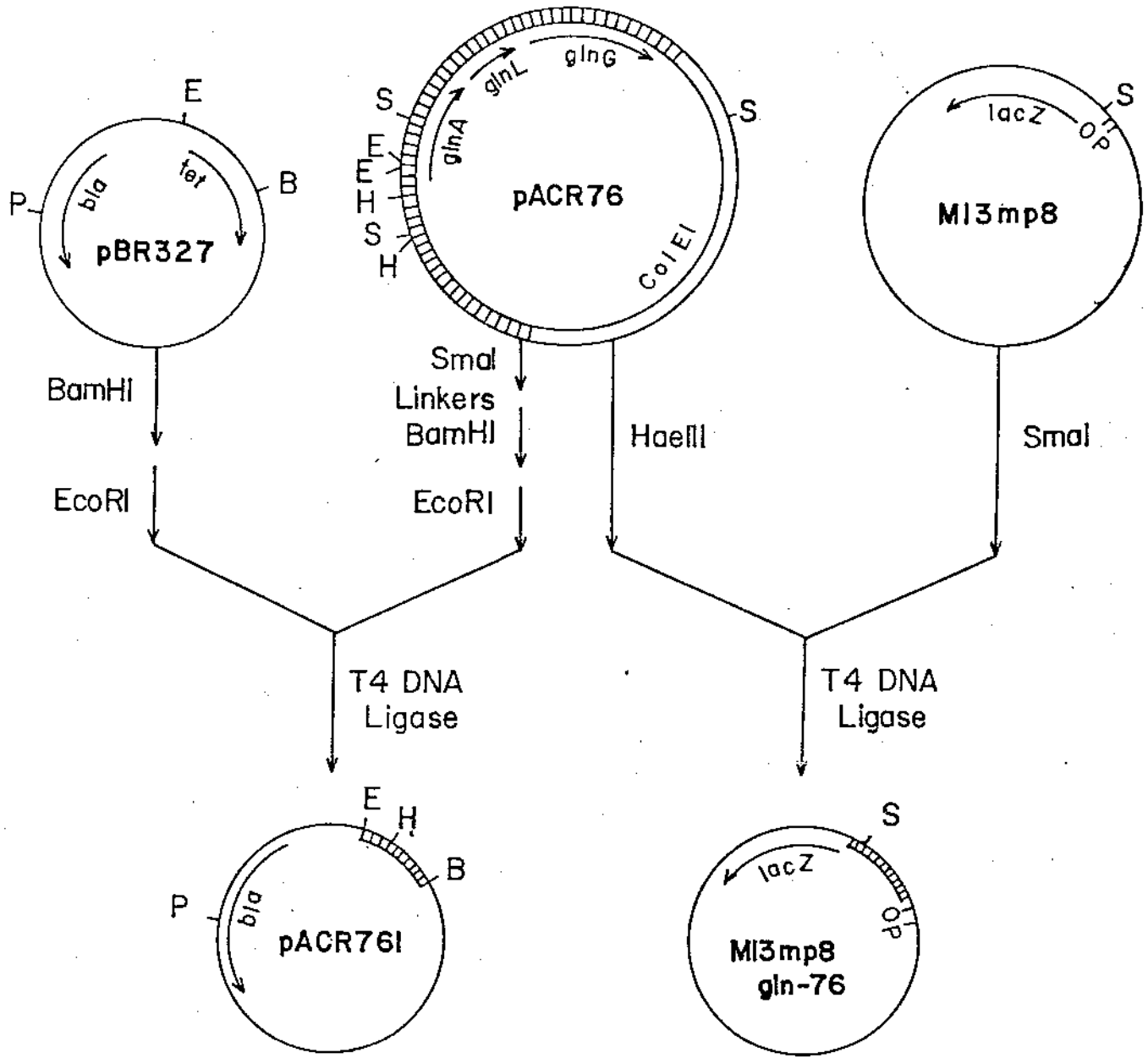


Figure 1.

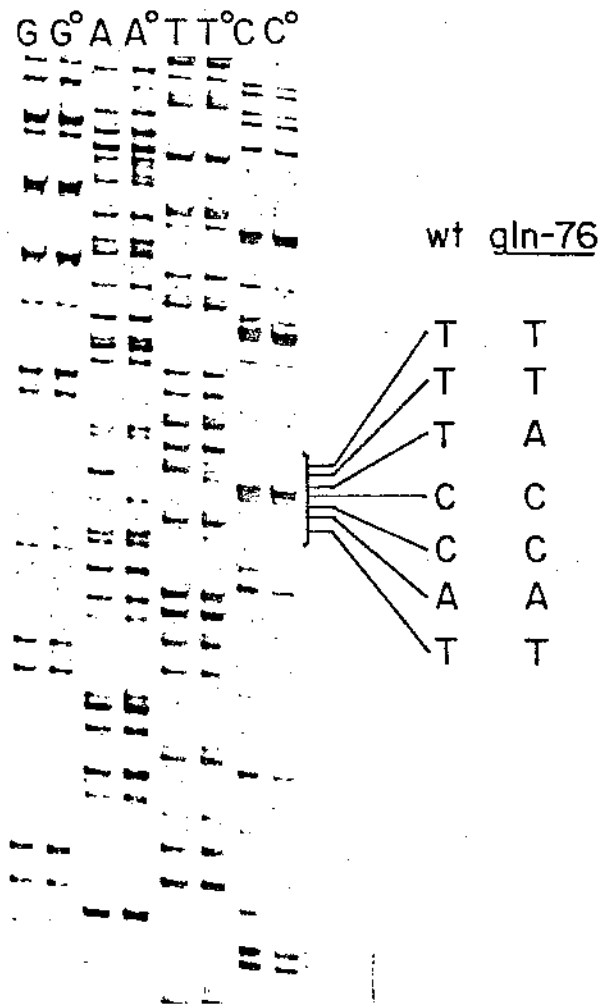
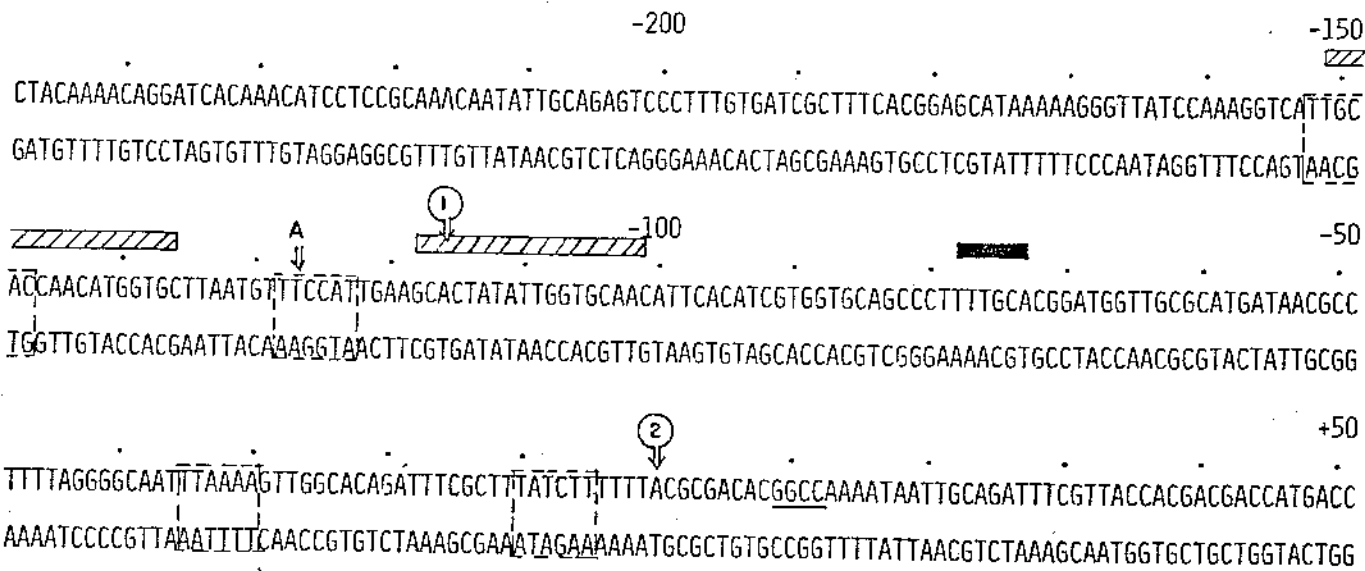


Figure 2.



AATCCAGGAGAGTTAAAGT ^{met ser ala glu} ATG TCC GCT GAA
 TTAGGTCCTCTCAATTCA TAC AGG CGA CTT

Figure 3.

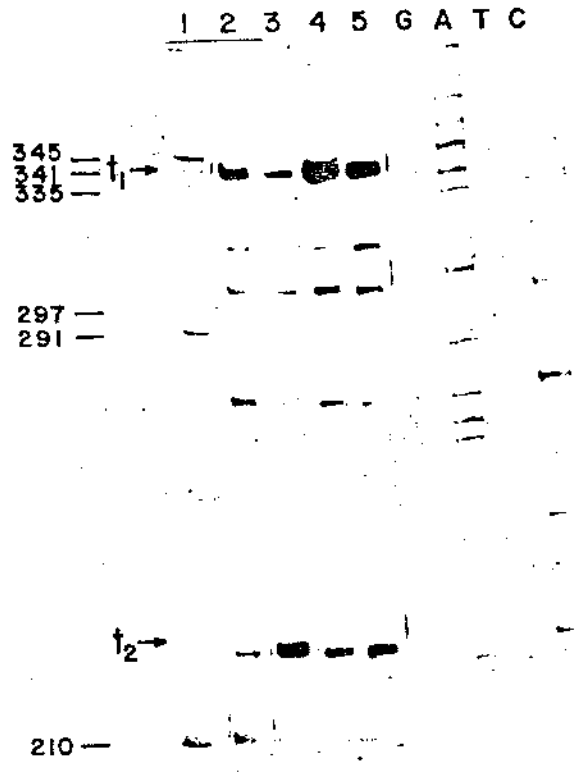
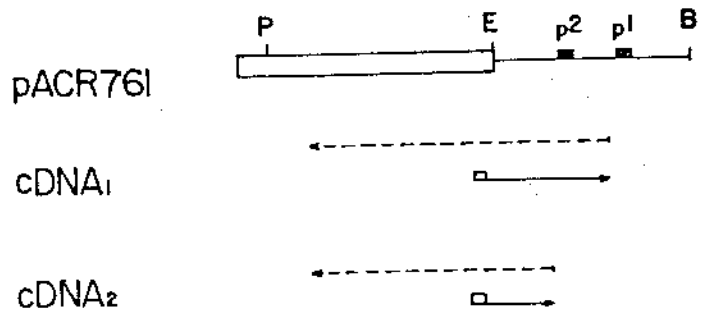


Figure 4.

RESULTADOS ADICIONALES

El estudio de la mutante gln-76 contribuyó de manera importante a la identificación y localización precisa del promotor lejano de glnA, glnAp1. El estudio de los transcritos había revelado que la transcripción a partir de este promotor aumentaba a medida que la relación C/N disminuía, inversamente a la transcripción proveniente de glnAp2. La posibilidad de estudiar de manera más detallada la regulación de ambos promotores y de disectar la participación de cada uno de ellos durante el crecimiento de la bacteria era muy tentadora. Existen varias estrategias que nos permiten llevar a cabo este estudio: una de ellas consistía en el análisis de cepas con mutaciones en los diferentes efectores. Sin embargo, la interpretación de estos resultados sería difícil ya que la regulación de todo el sistema se vería afectada; otra estrategia sería el aislamiento y caracterización de mutaciones puntuales en la zona de control de glnA, que permitiría un análisis más fino ya que la regulación general del sistema no se vería alterado y por otro lado, tendríamos la posibilidad de obtener una mayor gama de efectos. La estrategia que se llevó a cabo consistió básicamente en el hecho de que en cepas carentes de NRI, la transcripción de glnA proviene únicamente de glnAp1, como había sido observado en el estudio de los transcritos de la región (61), por lo tanto toda aquella mutación que anulara la transcripción de este promotor provocaría que las bacterias fueran incapaces de crecer en ausencia de glutamina (Gln^+).

AISLAMIENTO DE LA MUTACION gln-77

Con el propósito de obtener una mutación que anulara la transcripción del promotor lejano de glnA (glnAp1) se hizo una mutagénesis generalizada de la cepa MX902, utilizando el mutágeno etilmetanosulfonato (EMS), en esta cepa la falta de NRI provoca que la transcripción de glnA sea baja y no regulada, y que provenga exclusivamente a partir del promotor glnAp1 (ver Introducción).

A las células mutagenizadas se les dieron dos ciclos de enriquecimiento con penicilina para el fenotipo Gln^- y fueron recuperadas en medio mínimo suplementado con glucosa 0.2% como fuente de carbono y glutamina como fuente nitrogenada seleccionándose aquellas que fueran Gln^- .

CARACTERIZACION POR COMPLEMENTACION DE LA MUTACION gln-77

Con el propósito de descartar todas aquellas mutantes cuyo fenotipo Gln^- se debiera a mutaciones en el gene estructural de GS y no en glnAp1. A todas las mutantes obtenidas se les restituyó el gene glnG silvestre por transformación con el plásmido pACR3 (35). Como se mencionó anteriormente la presencia de glnG permitiría el funcionamiento de glnAp2 y, por lo tanto todas aquellas mutantes cuyo único defecto fuera la imposibilidad de iniciar la transcripción a partir de glnAp1 recobrarían el

fenotipo Gln^+ . Aproximadamente el 50% de las células transformadas recuperaron el fenotipo Gln^+ .

MAPEO DE LAS MUTACIONES

Como se mencionó anteriormente la selección de esta mutante se llevó a cabo en presencia de $\text{glnG}::\text{Tn5}$, por lo tanto este alelo se utilizó para mapear las mutantes que conferían el fenotipo Gln^- . Con este objetivo fue propagado el fago P1 en cuatro diferentes colonias provenientes de la transformación con pACR3 y, posteriormente cruzado por la cepa MX614. Se seleccionó para la presencia del transposon Tn5 que se encuentra en el gen glnG . A las colonias resultantes se les probó si eran capaces de utilizar amonio como fuente de nitrógeno. La frecuencia de cotransducción encontrada puede verse en la Tabla 3.

El hecho de que dos de las colonias tengan 0% de cotransducción podría ser explicado por una mutación en algunos de los genes implicados en el sistema de adenilación de la GS. Ya que el fenotipo Gln^- podría deberse a los bajos niveles de una GS altamente adenilada, este fenotipo también podría ser suprimido por la presencia de pACR3, pues en este caso los niveles de GS serían mas altos.

Tabla 3

Frecuencia de cotransducción con respecto
al gene glnG de las colonias Gln^- .

Colonia	Marcadores		% cotransducción
1	Km^r	Gln^-	0%
2	Km^r	Gln^-	83%
3	Km^r	Gln^-	84%
4	Km^r		0%

La frecuencia reportada entre los genes glnG y
glnA es de 85%. (59).

SEGREGACION DE LA MUTACION

Con el propósito de segregar la mutación que anula a glnAp1 del gene glnG::Tn5 se realizó un transducción en la cual P1 proveniente de la cepa MX1200 (Tabla 4) fue cruzado por la cepa MX734 (glnA::Tn5). Las colonias resultantes se seleccionaron por su capacidad de crecer en amonio como fuente de nitrógeno, contraseleccionando para Km^S . De esta manera se garantizaba que la región estructural de GS había sido substituída en la cepa receptora por aquella conteniendo la mutación en glnAp1 pero conservando un glnG silvestre. A esta cepa se le llamó MX1201. Aunque el 99% de las veces que se transfiera el gene estructural de GS debería de incluir la región regulatoria en la cual se encuentra la mutación que anula glnAp1, ningún fenotipo seguible existía en estas cepas segregantes. Para corroborar la presencia de la mutación en la cepa MX1201 le fue introducido nuevamente el alelo glnG74::Tn5 (Osorio et al. 1984), ~~seleccionando en este caso~~ para la presencia de transposón Tn5 y posteriormente se cuantificó la frecuencia en que las transductantes adquirirían el fenotipo Gln^- . Como era de esperarse aproximadamente el 14% de las cepas Km^r adquirieron el fenotipo Gln^- , lo cual ratifica la presencia de la mutación gln-77 en la cepa MX1201, ya que la frecuencia de contransducción reportada entre glnA y glnG es del 85% (59).

Tabla 4. Cepas bacterianas

Cepa	Genotipo	Fuente
MX614	$\Delta(\text{pro-lac})$ <u>galE</u> <u>ilv-680</u> <u>thi-1</u>	59
MX902	$\Delta(\text{pro-lac})$ <u>galE</u> <u>ilv-680</u> <u>glnG74::Tn5</u> <u>thi-1</u>	59
MX734	$\Delta(\text{pro-lac})$ <u>galE</u> <u>ilv-680</u> <u>glnA71::Tn5</u> <u>thi-1</u>	59
MX1200	$\Delta(\text{pro-lac})$ <u>galE</u> <u>ilv-680</u> <u>glnG74::Tn5</u> <u>glnA77</u> <u>thi-1</u>	este trabajo
MX1201	$\Delta(\text{pro-lac})$ <u>galE</u> <u>ilv-680</u> <u>glnA77</u> <u>thi-1</u>	este trabajo

CARACTERIZACION DE LAS CEPAS MX1200 Y MX1201

Se decidió caracterizar tanto la cepa MX1200 como la cepa MX1201 en diferentes condiciones de crecimiento con respecto a sus actividades de GS. La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos. Fueron analizadas condiciones de exceso y limitación de nitrógeno; en condiciones de exceso de nitrógeno, no se observó ninguna alteración detectable con respecto a la cepa silvestre, en cambio en condiciones de limitación de nitrógeno las actividades de GS que presenta la mutante son aproximadamente la mitad que la obtenida para la cepa silvestre.

También se analizaron las actividades de GS utilizando medio rico (Luria) y Luria suplementado con glutamina, ya que se ha reportado que bajo estas condiciones glnAp1 funciona preferencialmente. De acuerdo con esto, las actividades de GS encontradas son muy bajas y no detectables para el caso de Luria y Luria-glutamina respectivamente, en las cepas conteniendo la mutación gln-77.

Finalmente, dado que pareciera ser que glnAp1 requiere de CAP-AMPC para su funcionamiento (62), se probó una condición de crecimiento que anula la represión catabólica como es el uso de glicerol como única fuente de carbono. Mas adelante discutiremos estos resultados.

Tabla 5.

Actividades específicas de glutamino sintetasa a las cepas
MX1200 y MX1201.

CEPA	Condición de crecimiento					
	NN ALTO NH ₄ ⁺	NN BAJO NH ₄ ⁺	NN-gln	L01	L01-gln	NN ALTO NH ₄ ⁺ -glicerol ^b
MX614	0.14	2.04	1.15	0.098	0.022	0.06
MX1200	-	-	0	-	0	-
MX1201 (1)	0.13	1.12	0.72	0.021	0	0.05
MX1201 (2)	0.12	1.3	0.82	0.020	0	ND
MX1201 (3)	0.18	1.2	0.84	0.025	0	0.08

^aActividades expresadas en γ -glutamil-hidroxamato formado /min/mg proteína. L01, Luria; NN, Medio mínimo; 1; ^bEn este caso la fuente de carbono 0.2%, en todos los demás en glucosa.; Alto NH₄⁺: Amonio 15 mM; Bajo NH₄⁺: Amonio 0.5 mM; gln: glutamina 1 mg/ml; ND: no determinado.

RESULTS

Cloning of gln-76 by P1 transduction. The glnA71::Tn5 insertion was first cloned in the ColE1 hybrid plasmid pACR1 (8). P1 phage propagated on MX727 was used to transduce strain MX924; selection was done for Km^R , scoring for glutamine auxotrophy. One selected transductant, MX966, carried pACR1 plasmid harboring the glnA71::Tn5 insertion (which was termed pACR71).

Plasmid pACR76 was then constructed by transducing strain MX966 with P1 propagated on MX929. Transductants were selected for Gln^+ , MS^R , $ColE1^{imm}$ and counterselection was done for kanamycin sensitivity. Plasmid DNA was purified and used to transform MX919 in order to obtain strains carrying plasmids in recA56 backgrounds. The glutamine synthetase specific activities of the strains thus obtained are given in Table 2.

DNA sequence of the gln-76 control region. To obtain the complete nucleotide sequence of the glnA control region carrying the gln-76 mutation, two different strategies were used (Fig. 1). First, a 625 bp HaeIII fragment from pACR76 was subcloned into the SmaI site of M13mp8 phage and sequenced; since this HaeIII fragment does not contain the entire glnA control region, the remainder was obtained by sequencing an EcoRI-HaeIII fragment from the pACR761 plasmid (Fig. 1). In every sequencing gel, a parallel lane with an equivalent clone

containing the wild type control region was run as an internal control. As shown in Fig. 2, the only difference observed in the nucleotide sequence of the promoter-control region carrying the gln-76 mutation as compared to that of the glnA wild type control region was a transversion from T/A to A/T localized at position -127 bp. This change is located in the proposed -10 region of the upstream glnA promoter, glnAp1 (Fig. 3).

Transcription initiation sites in the glnA-76 control region. In order to explore if the transcription initiation sites of the glnA gene were the same in a strain carrying the gln-76 mutation and in the wild type strain, we carried out primer extension experiments. Total RNA was prepared from the RR1 strain carrying either pACR761, or pACR101 grown in N-excess medium since the effect of the gln-76 mutation, in an otherwise wild type background, is best observed under these conditions (see lines corresponding to MX614 and MX929 in Table 2). As primer we used the synthetic oligonucleotide employed in sequencing plasmids with EcoRI inserts (41); it hybridized specifically with the glnA-pBR327 fusion transcripts synthesized from either pACR761 or pACR101 as diagrammed in Fig. 4. Two main extended primers can be seen from each RNA preparation. Extended primers detected from RNA isolated from the strain containing pACR761 were identical in length to those obtained when RNA was purified from the strain carrying pACR101 (Fig. 4). The transcription initiation sites were determined following the sizes for the extended primers.

The fact that the larger transcript was more intense in the RNA prepared from RR1 (pACR761) than that from RR1 (pACR101), suggests that glnAp1 bearing the gln-76 mutation is more active than glnAp1 wild type. No apparent effect was observed on the synthesis of the smaller transcript.

Galactokinase synthesis from fused plasmids. To determine the transcription efficiency of glnAp1 (gln-76) we fused this promoter to the galactokinase structural gene (galK). The galK system used is that of McKenny et al. (25). The transcriptional-probing plasmid vector pK01 was constructed in such a way that galK expression reflects transcriptional signals inserted upstream. HaeIII-BamHI 524 bp fragments from either pACR101 or pACR761, containing either the wild type or the mutated glnAp1 promoters, were inserted into plasmid pK01 to construct plasmids pK0glnA and pK0gln-76, respectively. The ligation mixtures were used to transform strain RR1 (Table 1), selecting Gal⁺ transformants on McQuay-galactose medium. The galactokinase activity of these strains is presented in Table 3 where it can be seen that the strain carrying pK0glnA produced 3.4 units of galactokinase whereas the strain carrying pK0gln-76 produced 22.6 units. It appears that, under these conditions, transcription initiated from pK0gln-76 is about six to seven times more efficient than that originating from the pK0glnA plasmid. It should be noted, however, that the cloned HaeIII-BamHI fragment contains the two regulated promoter sequences involved in the transcription of the glnA gene. Thus, the galactokinase activities

measured under these conditions must be the result of transcription initiated at promoter glnAp1 plus that arising from glnAp2. In order to measure more precisely the strength of the glnAp1 promoter, we determined galactokinase activities in glnG::Tn5 strains harboring pK0glnA or pK0gln-76. In the absence of the glnG product, no activation at glnAp2 nor repression at glnAp1 was expected (10, 31, 34, Garciarrubio et al., EMBO. J. submitted for publication). As shown in Table 3, galK expression from MX794 (pK0gln-76) was about ten-fold higher than that from MX794 (pK0glnA).

DISCUSSION

The gln-76 mutation is thus far, the only E.coli cis-dominant mutation, linked to glnA, that promotes high levels of glutamine synthetase in the absence of the glnG-glnF activator system (29). From the genetic and biochemical characterization of strains carrying this mutation it was proposed that the gln-76 mutation increases the strength of an existing glnA promoter because glnA transcription in strains carrying this mutation remains sensitive to repression. It has been recently found that the glnA gene of E.coli as well as that of Klebsiella pneumoniae are transcribed from two promoters (10, 34, Garciarrubio et al., EMBO J. submitted for publication). In E.coli, expression from the downstream promoter, glnAp2, requires the glnG and glnF products. According to Reitzer and Magasanik (34), transcription from the upstream promoter glnAp1, requires the catabolite activating protein (CAP). This promoter is also subject to repression by the glnG product.

The molecular characterization of the gln-76 mutation presented in this work shows that the only alteration associated with gln-76 is a transversion T/A to A/T localized in the -10 region of the upstream glnA promoter, glnAp1 (Fig. 2). As shown in Table 4, the gln-76 mutation increase the homology of this region to the consensus promoter sequence (14) by introducing one of the most conserved bases in the -10 region. Studies by different groups (reviewed by Hawley and McClure, 14), have suggested that the most highly conserved base pairs in the promoter are the main

determinants of promoter strength. According to this proposal, the gln-76 mutation should behave as an up-promoter mutation. This possibility is supported by the fact that the most characteristic phenotype of a strain carrying the gln-76 allele is an increase in the synthesis of glutamine synthetase under ammonium excess conditions when this promoter is preferentially used (29 and Table 2). Galactokinase activity synthesized by glnG strains carrying plasmid pK0gln-76 was about 10-fold higher than that synthesized from the wild type glnAp1 promoter in pK0glnA (Table 3). Even though the fragments fused to galK contained both glnA promoters, the activity of galactokinase must reflect the strength of gln-76p1, since MX794 cells carrying the pK0gln-76 plasmid were devoid of functional glnG product. In the absence of the glnG product both activation of transcription originating from glnAp2 and repression of glnAp1 are impaired (34, Garcarrubio et al.; EMBO J. submitted for publication). As shown also in Table 3, no difference in the galactokinase activities was observed between the wild type (RR1) and the glnG (MX794) strains containing the promoter-probe with, either the wild-type or the gln-76 control region. A plausible explanation for this is that the glnG product is being titrated by the high copy number of the plasmids.

The higher transcription efficiency from the gln-76 promoter is also supported by the results from the primer extension experiment shown in Fig. 4 where the larger transcript is synthesized in higher amount from the mutated promoter than from the wild type promoter. Apart from gln-76 no other mutation which results in an up-promoter has been reported where a change

from T/A to A/T has occurred at the -12 position (14).

Location of gln-76 mutation at the -10 region of the upstream promoter proposed agrees well with the location of one of the glnA transcription initiation sites at position -116 (Garciarrubio et al. EMBO J., submitted for publication); this, together with the fact that this mutation generates a stronger promoter supports the conclusion that the glnAp1 promoter, indicated in Fig. 3, is physiologically functional. Recently, McCarter et al. (23) have reported the characterization of a mutation that lies in the promoter-regulatory region of the glnA gene of S. typhimurium. Some of these mutations present characteristics similar to gln-76, since they appear to increase the glnAp1 efficiency without eliminating the repression control by the glnG product. The authors suggest that these mutations lie in the glnA upstream promoter.

Whether the regulation of glnAp1 by the glnG product in gln-76 cells is exactly the same as in wild type cells cannot be concluded at present. It has been proposed that a sequence that is conserved in the glnA as well as in the glnL control regions corresponds to the recognition site for the glnG product (34, 35 Garciarrubio et al. EMBO J. submitted for publication). In the E.coli glnA control region this 19 bp sequence has been found twice as a palindromic sequence and overlapped with the upstream promoter (see Fig. 3). The gln-76 mutation does not lie within either of the two presumptive recognition sites for the glnG product; rather, the mutation occurred in between these two (Fig. 3). Even if the definition of the operator at

glnAp1 deserves further attention, several data indicate that the repression at glnAp1 by the glnG product in a strain carrying the gln-76 mutation is qualitatively normal. Osorio et al. (29) have shown that the glnG product in gln-76 cells is still able to exert its positive as well as its negative effects on glnA expression. This is in agreement with data from Northern analysis which shows that in gln-76 cells, as in wild type cells, transcription from glnAp1 is strongerly repressed under nitrogen limitation than under nitrogen excess. Furthermore from this analysis it can be concluded that the repression by the glnG product on gln-76p1 is still very efficient. (Garcarrubio et al. EMBO J.; submitted for publication).

Acknowledgements

We are grateful to Xavier Soberón and Mario A. Cuevas for the gift of the EcoRI (16 mer) primer. We also thank Xavier Soberón, Mario Rocha and Irene Castaño for their critical review of this manuscript and María Dolores Cuéllar for typing it. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México) grants to AAC (PCCBBNA - 020413 and to FB (PCCBBNA - 0052161).

LITERATURE CITED

1. Adelberg, E.A., and S. Burns. 1960. Genetic variation in the sex factor of Escherichia coli. J. Bacteriol. 79:321-330.
2. Alvarez-Morales, A., R. Dixon, and M. Merrick. 1984. Positive and negative control for the glnA-ntrBC regulon in Klebsiella pneumoniae. EMBO J. 3:501-507.
3. Bastarrachea, F., S. Brom, A.A. Covarrubias, A. Osorio, and F. Bolivar. 1980. Genetic characterization of mutations affecting glutamine biosynthesis and its regulations in Escherichia coli K-12, p.107-121. In J. Mora and R. Palacios (ed.), Glutamine: metabolism, enzymology and regulation. Academic Press, New York.
4. Betlach, M., V. Hershfield, L. Chow, W. Brown, H.M. Goodman, and H.W. Boyer. 1976. A restriction endonuclease analysis of bacterial plasmids controlling the EcoRI restriction and modification of DNA. Fed. Proc. 35:2037-2043.
5. Biggin, M.D., T.J. Gibson, and G.F. Hong. 1983. Buffer gradient gels and ³⁵S label as an aid to rapid DNA sequence determination. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:3963-3965.
6. Clark, A.J. 1967. The beginning of a genetic analysis of recombination proficiency. J. Cell. Physiol. 70:sup 1, 165-180.

7. Cohen, S.N., A.C.Y. Chang, and L.Hsu. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69:2110-2114.
8. Covarrubias, A.A., R. Sanchez-Pescador, A. Osorio, F. Bolivar, and F. Bastarrachea. 1980. ColE1 hybrid plasmids containing Escherichia coli genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine. Plasmid 3:150-164.
9. Covarrubias, A.A., and F. Bastarrachea. 1983. Nucleotide sequence of the glnA control region of Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 190:171-175.
10. Dixon, R. 1984. Tandem promoters determine regulation of the Klebsiella pneumoniae glutamine synthetase (glnA) gene. Nucleic Acids Res. 12:7811.
11. Duester, G., M.R. Elford, and M.W. Holmes. 1982. Fusion of the Escherichia coli tRNA promoter to the galk gene: analysis of the sequences necessary for growth-rate dependent regulation. Cell 30:855-864.
12. Garcia, E., S. Bancroft, S.G. Rhee, and S. Kustu. 1977. The product of a newly identified gene, glnF, is required for the synthesis of glutamine synthetase in Salmonella. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74:1662-1666.
13. Guterman, S.K., G. Roberts, and B. Tyler. 1982. Polarity in the glnA operon: suppression of the Reg phenotype by rho mutations. J. Bacteriol. 150: 1314-1321.

14. Hawley, D.K., and W.R. McClure. 1983. Copilation and analysis of Escherichia coli promoter DNA sequences. Nucleic Acid Res. 11:2237-2255.
15. Jenkins, J.M., and H. Bennett. 1976. Effect of mutations in deoxyribonucleic acid repair pathways on the sensitivity of Escherichia coli strains to nitrofurantoin. J. Bacteriol. 125:1214-1216.
16. Krajewska-Grynkiewicz, K., and S. Kustu. 1984. Evidence that nitrogen regulatory gene ntnC of Salmonella typhimurium is transcribed from the glnA promoter as well as from a separate ntn promoter. Mol. Gen. Genet. 193:135-142.
17. Kustu, S., D. Burton, E. Garcia, L. McCarter, and N. McFarland. 1979. Nitrogen control in Salmonella: regulation by the glnR and glnF gene products. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:4576-4580.
18. Lowry, O.H., N.K. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
19. MacNeil, T., D. MacNeil, and B. Tyler. 1982. Fine-structure deletion map and complementation analysis of the glnA-glnL-glnG region of Escherichia coli. J. Bacteriol. 150:1302-1313.

BIBLIOTECA
JUAN A. ESCALANTE H.
UNIDAD ACADEMICA DE
LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO / CCH

20. MacNeil, T., G.P. Roberts, D. MacNeil, and B. Tyler. 1982. The products of glnL and glnG are bifunctional regulatory proteins. *Mol. Gen. Genet.* 188:325-333.
21. Magasanik, B. 1982. Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 16:135-168.
22. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
23. McCarter, L., K. Krajewska-Grynkiewicz, D. Trinh, G. Wei, and S. Kustu. 1984. Characterization of mutations that lie in the promoter-regulatory region for glnA, the structural gene encoding glutamine synthetase. *Mol. Gen. Genet.* 197:150-160.
24. McFarland, N., L. McCarter, S. Artz, and Kustu. 1981. Nitrogen regulatory locus "glnR" of enteric bacteria is composed of cistrons ntxB and ntxC: identification of their protein products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:2135-2139.
25. McKenney, K., H. Shimatake, D. Court, U. Schemeissner, C. Brady, and M. Rosenberg. 1981. A system to study promoter and termination signals recognized by Escherichia coli RNA polymerase. p. 383-415. In J.G. Chirikjian and T.S. Papas (eds.) *Gene amplification and analysis*, vol. 2. Elsevier-North Holland, New York.

26. Merrick, M.J. 1982. A new model for nitrogen control. *Nature*. 297:362-363.
27. Messing, J. 1983. New M13 vectors for cloning, *Methods in Enzymology*. 101 C:20-78.
28. Miller, J.H. 1972. Experiments in molecular genetics, p. 190-268 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
29. Osorio, A.V., L. Servin-González, M. Rocha, A.A. Covarrubias and F. Bastarrachea. 1984. cis-dominant, glutamine synthetase constitutive mutations of Escherichia coli independent of activation by the glnG and glnF products. *Mol. Gen. Genet.* 194:114-123.
30. Ow, D.W., V. Sundaresan, D. Rothstein, S.E. Brown, and F.M. Ausubel. 1983. Promoters regulated by the glnG (ntrC) and nifA gene products share a heptameric consensus sequence in the -15 region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 76:2866-2870.
31. Pahel, G., and B. Tyler. 1979. A new glnA-linked regulatory gene for glutamine synthetase in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:4544-4548.
32. Pahel, G., D.M. Rothstein, and B. Magasanik. 1982. Complex glnA-glnL-glnG operon of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 150:1314-1321.

33. Reitzer, L.J., and B. Magasanik. 1983. Isolation of a nitrogen assimilation regulator, NR₁, the product of the glnG gene of Escherichia coli. J. Bacteriol. 133:139-148.
34. Reitzer, L.J., and B. Magasanik. 1985. Expression of glnA in Escherichia coli is regulated at tandem promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:1979-1983.
35. Rocha, M., M. Vázquez, A. Garcíarrubio, and A.A. Covarrubias. 1985. Nucleotide sequence of the glnA-glnL intercistronic region of Escherichia coli. Gene, 36, in press.
36. Rothstein, D.M., and B. Magasanik. 1980. Isolation of Klebsiella aerogenes mutants cis-dominant for glutamine synthetase expression. J. Bacteriol. 141:671-679.
37. Rothstein, D.M., G. Pahel, B. Tyler, and B. Magasanik. 1980. Regulation of the expression from the glnA promoter of Escherichia coli in the absence of glutamine synthetase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:7372-7376.
38. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74:5463-5467.
39. Soberón, X., L. Covarrubias, and F. Bolívar. 1980. Construction and characterization of new cloning vehicles. IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325. Gene 9:287-305.

40. Ueno-Nishio, S., K.C. Backman, and B. Magasanik. 1983. Regulation of the glnL-operator-promoter of the complex glnALG operon of Escherichia coli. J. Bacteriol. 153:1247-1251.
41. Wallace, B.R., M.J. Johnson, S.V. Suggs, K. Miyoshi, R. Bhatt, and K. Itakura. 1981. A set of synthetic oligodeoxyribonucleotide primers for DNA sequencing in the plasmid pBR322. Gene 16:21-26.

DISCUSION

En esta sección, me gustaría abordar algunos aspectos importantes directamente relacionados con este trabajo para finalizar con la integración de estos resultados con los obtenidos tanto por nuestro grupo como por otros.

Los datos obtenidos a partir de la secuencia nucleotídica de la región de glnA, así como por la caracterización genética de la mutante gln-76, sugerían la existencia de más de un promotor. Esto fué corroborado con la identificación de los sitios de iniciación de la transcripción en la cepa silvestre. El análisis molecular de la región de glnA conteniendo la mutación gln-76, reveló que esta mutante contenía un solo cambio que se encontraba -150 pb arriba del inicio de la traducción de glnA. La secuencia al rededor de esta mutación semejaba a la secuencia consenso para promotores (65) y el cambio ocurrido en esta mutante en una de las bases más conservadas en la region de -10, la acercaba aún más. Es cada vez más claro que la fuerza intrínseca de un promotor se encuentra determinada por las bases más conservadas. Sin tomar en cuenta la intervención de moléculas reguladoras (activadores y represores), es indudable que las bases más conservadas intervienen en la fuerza de un promotor (66). Utilizando una fusión del gene de galactocinasa con la región de control de glnA proveniente de la cepa silvestre y de la cepa conteniendo la mutación gln-76, se encontró un aumento de 10 veces en las actividades de galactocinasa en la cepa que contenía a la mutación gln-76 en ausencia de represión (ver Tabla 3 en artículo anexo). Este experimento apoya fuertemente la idea de que esta mutante contiene una mutación "up" en el promotor.

Existe sin embargo una discrepancia entre las actividades de galactocinasa de las cepas conteniendo la región de control silvestre y mutada con las actividades de GS de las mismas, ya que en el primer caso la diferencia es de aproximadamente 10 veces en tanto que en el segundo es de 40 veces. Esto puede ser explicado debido a que la medición de galactocinasa se llevó a cabo en cepas conteniendo las regiones de control en un plásmido multicopia por lo que algunos reguladores del sistema, que se encuentran en monocopia, podrían ser titulados. Sin embargo estos datos si hablan sobre el aumento en la fuerza de un promotor de glnA (glnAp1) en la cepa MX929.

El hecho de que este promotor esté regulado, sugiere fuertemente que es fisiológicamente funcional en la cepa silvestre y que no es un promotor generado durante el aislamiento de la mutante. La identificación de los sitios de iniciación de esta mutante corrobora este hecho, ya que estos sitios son los mismos que los encontrados para la cepa silvestre. No podemos descartar por completo que esta mutante, además de aumentar la fuerza del promotor afecte la regulación de glnA. El efecto que pudiera tener, sin embargo es mínimo, ya que su regulación es prácticamente normal con respecto a la disponibilidad de nitrógeno. Esto es, que el grado de represión en esta mutante es igual al observado para las cepas silvestres. La caracterización de esta mutante ha contribuido en la identificación del promotor lejano de glnA y, además, al análisis de los transcritos de esta región debido a la elevada transcripción a partir del promotor conteniendo la mutación gln-76 (59).

Recientemente, tanto para la cianobacteria Anabaena (67) como como para K.pneumoniae (63), se demostró que glnA también puede ser transcrito de diferentes promotores (dos para Klebsiella y cuatro para Anabaena). Algunos aspectos tanto de su regulación como de las características físicas de los tres sistemas son semejantes. Así por ejemplo, uno de los promotores de glnA, en los tres organismos, presenta homología con un promotor típico de E.coli.

Existen una serie de aspectos importantes que me gustaría discutir sobre cada uno de los promotores de glnA en E. coli y hacer algunas comparaciones de ellos con los datos obtenidos para Klebsiella y Anabaena.

glnAp1

El análisis de los transcritos en diferentes fondos genéticos demostró que la transcripción de glnAp1 es reprimida por NRI. Estudios de nuestro grupo basados en la comparación de la secuencia nucleotídica de la región de glnA y la de glnL, revelaron la existencia de una secuencia común de 19 pb. Ya que tanto glnAp1 como glnLp son promotores reprimidos por NRI, se ha propuesto que esta sea la secuencia reconocida por NRI para reprimir (operador). Cabe mencionar que para el caso de glnA esta secuencia se encuentra repetida en forma palindrómica, sobrepuesta a glnAp1, y que la mutación gln-76 no modifica ninguna de ellas, sino que se localiza entre ambas. Este resultado junto con los datos fisiológicos provenientes tanto del análisis, tanto de los transcritos como de las actividades de GS de esta mutante nos hacen suponer que la regulación de la expresión de glnA en ella es muy semejante a la de la silvestre.

Como se mencionó anteriormente, glnAp1 es un promotor que se asemeja a la secuencia de un promotor consenso en E.coli, y sabemos que aumenta su fuerza a medida que se acerca a esta secuencia, como lo demuestra la mutante gln-76. Basados en datos teóricos (Mc Clure et al. 66) sobre la semejanza de este promotor con el promotor consenso. Y por extrapolación a partir de las actividades de GS, como de las actividades de galactocinasa glnAp1 puede ser catalogado como un promotor muy débil, el cual probablemente requiera de un activador para promover transcripción. Para poder tener este dato sería necesario hacer estudios de transcripción in vitro (68).

Aunque por el momento no sabemos con exactitud cual o cuales son las condiciones metabólicas en las que este promotor adquiere importancia, si sabemos que la transcripción proveniente de glnAp1 es suficiente para que una cepa pueda crecer en ausencia de glutamina, aunque no para elevar la síntesis de los genes del sistema Ntr, este sería el caso de una cepa glnG. A este respecto algo se puede especular. Parece no ser fortuito que glnAp1 sea reprimido por NRI, por lo que pensamos que este promotor debe ser importante para obtener una regulación balanceada del operón glnALG en ciertas condiciones de crecimiento.

A este respecto, es interesante hacer notar que al comparar la secuencia alrededor de glnAp1 de E. coli con la de Klebsiella (63), no se encuentra homología entre los dos promotores, a pesar de que como mencioné los dos promotores propuestos se asemejan a

la secuencia consenso para los promotores de E. coli. También el sitio de iniciación encontrado para ambos promotores es diferente. Si bien lo anterior parece indicar que este promotor no se encuentra conservado evolutivamente, por lo menos para estas dos bacterias, ambos promotores guardan una regulación semejante, ya que son reprimidos por NRI en las mismas condiciones metabólicas (limitación de amonio). En Klebsiella a diferencia de E.coli, solamente se encuentra una secuencia de 19 pb (aquella propuesta como el sitio de operador para NRI) sobrepuesta a glnAp1. Este hecho podría sugerir que el mecanismo de represión para ambos casos pudiera ser diferente aunque por el momento no tenemos ninguna evidencia de ello. Se ha reportado que NRI purificado se encuentra como dímero, esto está de acuerdo con el hecho de que existe una secuencia simétrica contenida en el sitio operador de glnAp1 y glnLp. Quizás en el caso de glnA de E.coli NRI funcione como tetramero en su forma represora.

Existe una secuencia homóloga al sitio de unión de CAP-AMPC hacia arriba de glnAp1. Datos de Reitzer et al. (62) sugieren que este promotor para funcionar necesita de ser activado por este complejo. Por otro lado, datos de nuestro laboratorio demuestran que la transcripción a partir de este promotor aumenta a medida que la relación carbono/nitrógeno disminuye, sin embargo, la regulación en este sistema requiere de un estudio más detallado. En ausencia de represor (cepa glnG) glnA es transcrito únicamente a partir de glnAp1 a pesar de que la fuente carbonada sea glucosa y que por lo tanto exista represión catabólica; esto parece indicar que en presencia de esta fuente, existe la cantidad suficiente de CAP-AMPC para activar a glnAp1 y

transcribir a glnA en cantidades suficientes para no requerir glutamina exógena. La única condición descrita hasta el momento en que la transcripción de glnA proviene de glnAp1 es crecimiento en medio Luria suplementado con glutamina. En estas condiciones la cantidad de GS es sumamente baja (Tabla 5), semejante a la encontrada en cepas glnG crecidas en medio mínimo -NH₄-glucosa. Debido a que éste es un medio complejo es muy difícil de concluir sobre los posibles efectores que regulan glnAp1. Esto hace necesario el encontrar alguna otra condición en la que solo se exprese glnAp1. La caracterización de mutantes puntuales en este promotor podría dar luz a este respecto.

Es interesante, el hecho de que glnAp1 responda a un regulador del metabolismo de carbono, ya que esto indica que la síntesis de GS es capaz de responder a este tipo de metabolismo como se había sugerido a partir de los datos fisiológicos y bioquímicos (17).

glnAp2

Es claro que este promotor responde a la disponibilidad de nitrógeno en la célula, a través de los productos de glnG y glnF, proporcionando el mayor porcentaje de transcripción del operón en las condiciones tanto de exceso como de limitación de nitrógeno hasta ahora probadas. La falta de NRI provoca que la transcripción a partir de glnAp2 se anule, no así por la ausencia del producto de glnF, ya que en este caso existe transcripción aunque mínima (61).

A partir de la determinación del sitio de iniciación de la transcripción (T2), fue localizado un posible promotor por semejanza con la secuencia consenso para promotores de E. coli (Tabla 3, artículo anexo). Sin embargo el análisis de un mayor número de genes regulados positivamente por los productos de glnG y glnF (en Klebsiella y Anabaena) ha revelado la existencia de una secuencia altamente conservada entre ellos, que se encuentra cercana al inicio de la transcripción y diferente a la mostrada en la Figura 3 del artículo anexo. A partir de estos resultados se propuso que esta secuencia se encontrara involucrada en el reconocimiento de la RNA polimerasa, aunque no se asemeja a la secuencia consenso de E. coli. Dado estos resultados se ha llegado a proponer un promotor consenso para todos aquellos genes regulados por los productos de glnF y glnG, así como de aquellos regulados por los productos de glnF y NifA. Mutaciones en esta secuencia, provocan un decremento substancial en la actividad de estos promotores (69). Aunque los promotores conteniendo esta secuencia consenso han sido llamados promotores tipo "Nif", lo considero inadecuado, ya que esto es extensivo a otros genes no involucrados en el sistema Nif; por esta razón propongo que, si de alguna manera hay que llamarlos, denominarlos tipo Ntr. Una secuencia parecida se encuentra cerca del sitio de inicio de T2 en E.coli como se puede ver en la Figura 3, artículo anexo. Esta secuencia es 100% homóloga a la reportada para Klebsiella, también el sitio de iniciación en ambos casos es semejante. A diferencia de glnAp1, glnAp2 parece estar altamente conservado en estas dos bacterias.

También por homología con genes activados por NRI o nifA y el producto del glnF, se encontró una secuencia heptamérica que ha sido propuesta como el sitio de unión de NRI en su forma de activador. Esta secuencia se encuentra en E.coli alrededor de 70 pb. arriba del sitio de inicio de la transcripción de T2 y en una posición equivalente para Klebsiella. Es posible que NRI pueda interaccionar con dos diferentes lugares en la región de control de glnA, dependiendo de su conformación (activador o represor), ya sea con esta secuencia o bien con el 19 mero propuesto por Rocha et al. Existen datos contradictorios a este respecto; en Klebsiella, delecciones que dejan solo 35 pb arriba del sitio de inicio de T2 son capaces de promover transcripción, estos datos sugieren que la presencia de este heptámero no es esencial para activar glnAp2 aunque podría incrementar su transcripción.

Es necesario decir, que aunque este dato es muy interesante, no es fácilmente extrapolable en E.coli, pues la activación de glnAp2 requiere, a diferencia de E.coli, del producto de glnL. Esto indica que existen diferencias en la regulación de ambos sistemas. Así mismo, datos de nuestro grupo demuestran que en la región regulatoria de glnA de E. coli, solo un fragmento de restricción es capaz de unir a NRI. Este fragmento contiene únicamente el 19 mero propuesto como represor.

La poca homología de los promotores tipo "Ntr" con la secuencia de un promotor consenso de E.coli, junto con la posibilidad de que el producto de glnF funcione como un factor sigma (70, Merrick et al.) sugiere la posibilidad de que estos promotores

sean reconocidos por una RNA polimerasa diferente a la descrita para E. coli. La substitución de este factor sigma permitiría que esta enzima reconociera otro tipo de secuencias como promotor.

Apegándonos a la definición clásica de activador, glnF al ser parte de la RNA polimerasa dejaría de serlo y podría definirse como un modulador de la especificidad de esta enzima. La posibilidad de reconocer diferentes señales regulatorias por modificar a la RNA polimerasa es un aspecto que aunque había sido propuesto, es nuevo para genes involucrados en el metabolismo de E. coli. La existencia de subunidades δ diferentes como un mecanismo par responder a diferentes condiciones del medio ha sido descrito para el caso de genes que responden a calor en E. coli (71), y para genes involucrados en la diferenciación de Basillus subtilis (72).

Es curioso que si el producto de glnF interacciona con la RNA polimerasa promoviendo la transcripción de genes específicos bajo condiciones metabólicas características (disponibilidad de nitrógeno en el medio), sea transcrito constitutivamente en la célula (31). Esto sugiere que existe algun modulador que trasmita la "señal" de transcripción para estos genes. Al parecer NRI es un modulador indispensable de la activación sobre glnAp2.

MAS DATOS EN LA DISCUSION; UNA MUTANTE MAS.

Quisiera discutir algunos datos interesantes obtenidos a partir de la segunda mutante reportada en este trabajo. Como se mencionó esta mutante parece anular la transcripción a partir de glnAp1, todos los resultados obtenidos hasta ahora lo apoyan fuertemente. Como el hecho de que en condiciones de alta represión de GS, en las que se ha descrito que glnA se transcribe a partir de glnAp1, como es el caso de Luria-glutamina, no se detectan actividades de GS en la cepa que contiene esta mutación, y, que en condiciones de exceso de nitrógeno, las actividades de GS encontradas en la cepa mutante sean semejantes a la cepa silvestre

Sin embargo existen varias posibilidades para anular la transcripción de glnAp1:

- a) Una mutación que anule el promotor al alejarlo del consenso.
- b) Si es que CAP-AMPC realmente es indispensable para que glnAp1 funcione, mutaciones en esta secuencia también anularían la transcripción.
- c) Una última opción es que se hubiera formado un terminador que impidiera que la transcripción de glnAp1 continuara. Esta última posibilidad la concidero remota ya, que con un solo cambio de bases resulta difícil crear una estructura como un terminador en la secuencia de la región de control de glnA. Para discernir entre las dos primeras posibilidades, será necesario la secuenciación de esta mutante.

Un dato que me gustaría discutir más ampliamente, es el hecho de que en esta mutante, los niveles de GS en condiciones de activación, son menores que los de la cepa silvestre, como lo

muestra la Tabla 5. Sabemos que en limitación de nitrógeno (condiciones de activación) la transcripción de glnA proviene únicamente de glnAp2 por lo que el anular glnAp1 no debiera de afectar las actividades de GS en esta condición. Este resultado podría ser explicado si pensamos que el sitio de unión de NRI, tanto para reprimir como para activar glnA, fuera el mismo. Dado que el sitio de reconocimiento de NRI esta sobrepuesto a glnAp1, sería posible afectar con una sola mutación, tanto glnAp1 como la activación sobre glnAp2. Esto se ve apoyado por el aislamiento de mutantes afectadas en la activación, en donde la alteración ocurre hasta -136 pb arriba del inicio de la transcripción; en el caso de genes activados por los productos de glnF y NifA. Sin embargo, existen mutantes reportadas en las cuales el sitio operador de NRI es mutado y la activación de GS es normal, indicando que los sitios de represión y activación son diferentes (58).

Por último, quisiera enunciar el modelo más reciente propuesto por nuestro grupo de la regulación de la expresión de los tres genes del operón (Figura 6) que pretende integrar los datos hasta ahora obtenidos.

Como ha sido mencionado ya en la introducción en condiciones de limitación de nitrógeno los niveles de glutamina serían bajos. Ya que la glutamina, junto con el 2-oxoglutarato son efectores del sistema (17), con la disminución de este metabolito los productos de glnF y glnG activarían la transcripción proveniente de glnAp2. La mayor parte de esta transcripción termina en el terminador localizado al final de glnA (aproximadamente 90%); el

resto procedería hasta el final del operón, el gene glnG es transcrito en estas condiciones en niveles suficientes para mantener la activación sobre glnAp2 y de los genes del sistema Ntr. El producto de glnF interaccionaría con la RNA polimerasa permitiendo el reconocimiento de glnAp2. El producto del gene glnI no ejerce su efecto de antiactivación, probablemente por encontrarse en un estado incapaz de realizar esta función al no recibir la "señal" de exceso de nitrógeno transmitida por la proteína P_{II} en su estado uridilado. Los promotores glnAp1 y glnIp en estas condiciones son fuertemente reprimidos por NRI.

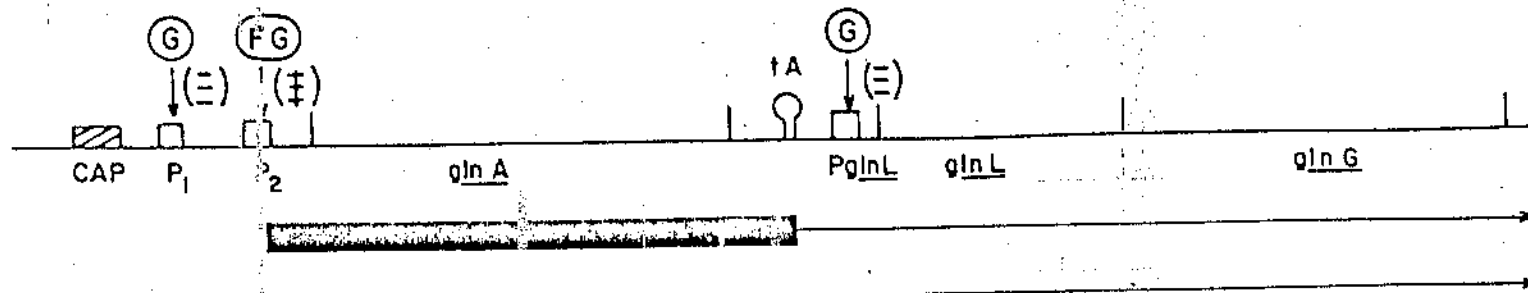
En condiciones de exceso de nitrógeno, la concentración de glutamina aumenta, este incremento disminuye la relación 2-oxoglutarato/glutamina con la consecuente desuridilación de P_{II} . Bajo esta forma P_{II} y el producto de glnI son capaces de antiactivar y por lo tanto provocar una disminución de la transcripción proveniente de glnAp2. Debido a esto, la concentración de NRI disminuye la represión que esta molécula ejercía sobre glnAp1 y glnIp también disminuye. En estas condiciones glnG es transcrito preferencialmente a partir de glnIp. Por último, cuando la relación existente entre C/N disminuye, debido a la presencia de una mala fuente de carbono, y glutamina como fuente de nitrógeno, ésta es acumulada y por lo tanto la activación de glnAp2 esta disminuída. Al mismo tiempo, la transcripción de glnAp1 aumenta ya que su represión es liberada y quizás porque CAP-AMPC sean activadores de este promotor como lo propone Reitzer y Magasanik (62).

Aún quedan muchas preguntas por responder a este respecto, pero es interesante el que la expresión de este operón involucre a reguladores del metabolismo nitrogenado y carbonado.

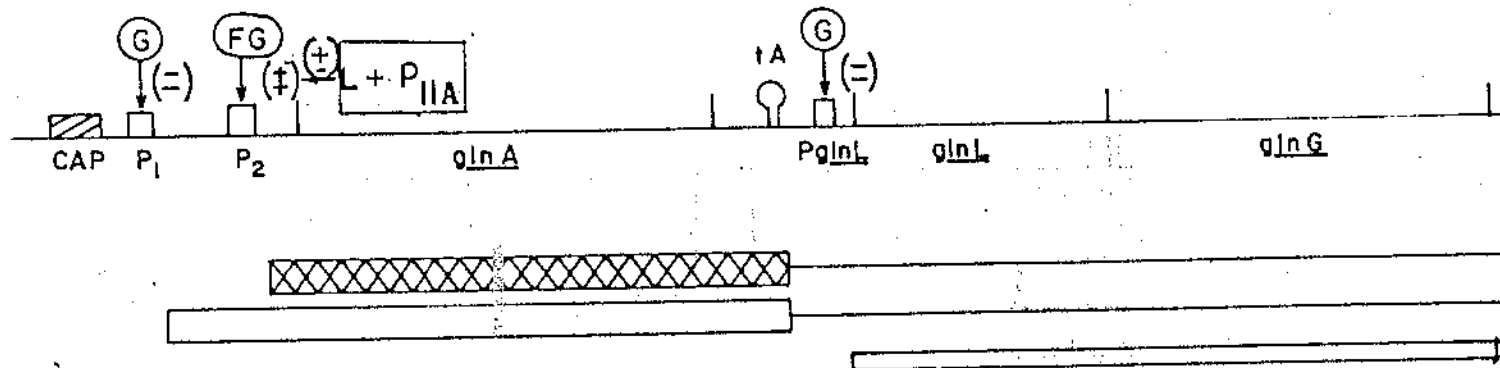
Hasta aquí he discutido las condiciones metabólicas que han sido más estudiadas, indudablemente existen una serie de condiciones que queden aún por estudiar y que muy probablemente nos amplíen más el conocimiento sobre la regulación de el bien llamado operón complejo gInALG.

Figura 6. Modelo de regulación de la expresión del operón glnALG. Las líneas delgadas indican el DNA del operón y las barras o líneas con flecha los transcritos del mismo. Las cajas vacías corresponden a los promotores glnAp1 y glnAp2 (P_1 y P_2 respectivamente). La caja con líneas diagonales representa el sitio de reconocimiento de CAP-AMPC. El terminador de glnA se indica por t_A . Los niveles de los transcritos se representan, para los transcritos indicados en glnA por lo intenso del sombreado de la barra, y para los transcritos iniciados en glnL por la anchura de la barra. Los símbolos son: $C\uparrow$ = glucosa como fuente de carbono, $C\downarrow$ = fuente pobre de carbono, $N\uparrow$ = amonio 15 mM como fuente de nitrógeno, $N\downarrow$ = amonio 5 mM como fuente limitante de nitrógeno, Gln = glutamina, (-) = represión, (+) = activación y (\pm) = antiactivación.

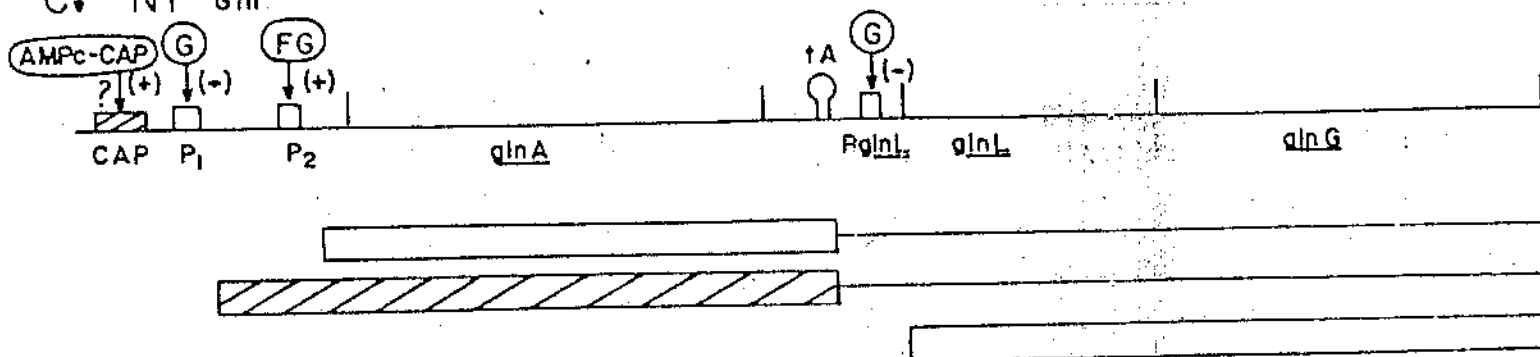
C ↑ N ↓



C ↑ N ↑



C ↓ N ↑ Gln



BIBLIOGRAFIA

1. Stainer, R.Y., E.A. Adelberg y J. Ingraham
(1976) The Microbial World 14th ed. Prentice - Hall
International London.
2. Newton, W., J.R. Postgate y C. Rodriguez-Barneco (1977) Recent
developments in nitrogen fixation. Academic Press. London
3. Ingraham J.L., O. Maaloe, F.C. Neidhart (1983) Growth of the
Bacterial Cell. Sinauer Associates, Inc. Sunderland
Massachusetts.
4. Stadman, E. y A. Ginsburg (1974). En "The Enzime", ed. Paul
Boyer Vol. X. Academic Press pp 755.
5. Tyler, B. 1978. Regulation of the asimilation of nitrogen
compounds. Ann. Rev. Biochem. 47:1127-1162.
6. Wolfolk, C.A. and Stadman ER (1964) Biochem. Biophys. Res.
Comm. 17, 313.
7. Desphande, K.L y J.F. Kane (1980) Biochem. Biophys Res.
Commun. 93:308-14.
8. Ludwing, A.R. (1978) J. Bacteriol. 135:114-123.

9. Brender, R.A. y B. Magasanik (1977) J. Bacteriol. 129:1001-1009.
10. Shapiro, B.H., H.S., Kingdon y ER Stadman (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 58:642-649.
11. Segal, A. y E.R. Stadman (1972) Arch. Biochem. Biophys 152, 367.
12. Woolfolk, C.A. y E.R. Stadman (1964) B.B.R.C. 17:313.
13. Woolfolk, C.A. y E.R. Stadman (1967) A.B.B. 118:736.
14. Ross, P.D. y A. Ginsburg (1969) Biochemistry. 8:4690.
15. Ginsburg A y E.R. Stadman (1973) En: "The Enzymes of glutamine Metabolism" eds. S. Prusiner y E.R. Stadman, New York, Academic Press pp.45
16. Garcia, E. y S.G. Rhee (1983) J. Biol. Chem. 258:2246-2253.
17. Senior, P.J. (1975) J. Bacteriol. 141:593-602.
18. Kustu, S., J. Hirschman, D. Burton, J. Jelesko y J.C. Meeks (1984) Mol. Gen. Genet. 197:309-317.
19. Schutt, H. y H. Holzer (1972) European J. Biochem. 26:68.
20. Magasanik B (1982) Ann. Rev. Genet. 16:135-68.

21. Tyler, B., A.B. De Leo, B. Magasanik (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71:225-29.
22. Pahel, G. y B. Tyler. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:4544-48.
23. Prival M.J., J.E Brenchly y B. Magasanik (1973) J. Biol. Chem. 248:4334-44
24. Rothman, R., D. Rothstein, F. Foor y B. Magasanik (1982) J. Bacteriol. 150:221-30.
25. Rothstein, D.M., G. Pahel, B. Tyler y B. Magasanik (1980) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 77:7372-76.
26. DeLeo, A.B. y B. Magasanik (1975) J. Bacteriol. 121:313-19.
27. Mayer, E.P., O.H. Smith, W.W. Fredrocks y MA McKinney (1975) Mol. Gen. Genet. 137:131-42.
28. Pahel, G., A.D. Zelenetz y B. Tyler (1978) J. Bacteriol. 133:139-48.
29. Gaillardin, CM., y B. Magasanik (1978) J. Bacteriol 133:1329-88.
30. Garcia, E., S. Bancraft y S. G. Kustu (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74:1662-66.
31. Castaño, I. y Bastarrachea F. (1984) Mol. Gen. Genet. 195:228-233.

32. Kustu, S., D. Burton, E. Garcia, L. McCarter y N. McFarland (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:4576-80.
33. Wei, G.R. y S. Kustu (1981) Mol. Gen. Genet. 183:392-99
34. Covarrubias, A.A., M. Rocha, F. Bolivar y F. Bastarrachea (1980)
Gene 11:239-251.
35. Rocha, M., F. Bastarrachea y A.A. Covarrubias (1983) Biol.
Estud. Med. Biol. Mex. 32:299-307.
36. Backman, K., Y.M. Chen y B. Magasanik (1981) Proc. Natl.
Acad. Sci. U.S.A. 78:3743-47.
37. Rocha, M., M. Vázquez, A.A. Garcíarrubio y A. Covarrubias (1985)
Gene 36 in press.
38. Reitzer L.J. y B. Magasanik (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
71:1342-1346.
39. Branfort, S., S.G. Rhee, C. Neuman y S. Kustu (1978) J. Bacteriol.
134:1046-56.
40. Bloom, F.R., S.L. Streicher y B. Tyler (1977) J. Bacteriol.
130:983-90.
41. Funanage, V.L. y J.E. Brenchley (1977) Genetics 86: 513-26.

42. Leonardo, J.M. y R.B. Golberg (1980) J. Bacteriol. 142:99-110.
43. Streicher, S.L., R.A. Bender y B. Magasanik (1975) J. Bacteriol. 121:320-31
44. Foor, F., Z. Reuveny y B. Magasanik (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:2636-40.
45. Foor, F., KA Janssen y B. Magasanik (1975) Proc. Acad. Sci. U.S.A. 72:4844-48.
46. Bueno, R., G. Pahel y B. Magasanik no publicado.
47. Foor, F., R.J. Cedergren; S. Streicher, SG Rhe y B. Magasanik (1978) J. Bacteriol. 134:562-68.
48. Chen, Y.m., K. Backman y B. Magasanik. (1982) J. Bacteriol. 150:214-20.
49. McFarland, N., L. McCarter, S. Kustu (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:2135-59.
50. Covarrubias, A.A., R. Sanchez-Pescador, A. Osorio, F. Bolivar y F. Bastarrachea (1980) Plasmid. 3: 150-164.
51. Funange, V.L. y J.E. Brenchley (1977) Genetics. 86: 513-26.
52. Backman, K., Y.M. Chen y B. Magasanik (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3743-47.

53. Guterman, S.K., G. Roberts y B Tyler. (1982) J. Bacteriol. 150: 1314-1321.
54. Pahel, G., D.M. Rothstein y B. Magasanik (1982) J. Bacteriol. 150:202-13.
55. Ueno-Nishio, S., K.C. Backman y B. Magasanik (1983) J. Bacteriol 153:1247-1251.
56. Adhya, S. y M. Gottesman (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 967-996.
57. Rothstein, D.M. y B. Magasanik (1980) J. Bacteriol. 141: 671-679.
58. Mc.Carter, L., K. Krajewska-Grynkiewicz, D. Trinh, G. Wei y S. Kustu (1984) Mol. Gen. Genet. 197: 150-160.
59. Osorio, A. V., I.G. Servín, M, Rocha, A.A. Covarrubias y F. Bastarrachea (1984) Mol. Gen. Genet. 194: 114-123.
60. Covarrubias, A.A. y F. Bastarrachea (1983) Mol. Gen. Genet. 190: 171-175.
61. Garcarrubio, A., M. Rocha, P. León, F. Bastarrachea y A.A. Covarrubias. EMBO J. sometido a publicacion.
62. Reitzer, L.J. y B. Magasanik (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
63. Dixon, R. (1984) Nucl. Acid. Research. 12: 7811-7830.

64. Prusiner, S., R.E. Miller y R.C. Valentine (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69: 2922-2926.
65. Rosemberg, M. y D. Court (1979) Ann. Rev. Genet. 13: 319-353.
66. Mulligan, M.E., D.K. Hawley, R. Entriken y W. McClure (1984) Nucl. Acid. Res. 12: 789-800.
67. Tumer, N.E., S.J. Robinson y R. Haselorn (1983) Nature. 306: 337-342.
68. Soberon, X., J.J. Rossi, G.P. Larson y K. Itakura (1982) En promoters, structure and function. Edited by R.L. Rodriguez y M.J. Chamberlin. Prager 407 pp.
69. Brown, S.E. y F.M. Ausbel (1981) J. Bacteriol. 159: 143-147.
70. De Brujin, F.F. y F.M. Ausbel (1981) Mol. Gen. Genet. 183: 289-297.
- 71.
72. Banner, C.B.D., C.P. Jr. Moran y R. Losick (1983) J. Mol. Biol. 168: 351-365.

BIBLIOTECA
JUAN A. ESCALANTE H.
UNIDAD ACADÉMICA DE
LOS C.C.C.S. PROFESIONALES
Y DE POSGRADO / CCH
(U.N.A.M.)