

CFN.24
T.D.
1987

Tesis de doctorado en Investigación Biomédica Básica

ALGUNOS ASPECTOS FUNCIONALES DE LA REGION DE
CONTROL DE glnA EN E. coli.

Realizada en el Centro de Investigación Sobre
Fijación de Nitrógeno,
por Alejandro Garcarrubio,
Bajo la Dirección de Alejandra A.Covarrubias.

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INTRODUCCION: EL SURGIMIENTO Y CAIDA DE UNA HIPOTESIS.

Los antecedentes..

La enzima glutamino sintetasa (GS) cataliza la síntesis de glutamina a partir de glutamato y amonio; consumiendo un ATP por reacción. El ácido glutámico proviene principalmente de una de dos reacciones. La reacción catalizada por GDH parte de alfa-ceto glutarato y amonio para dar glutamato. La reacción catalizada por GOGAT parte de alfa-ceto glutarato y glutamina para dar dos moléculas de glutamato. Ambas reacciones consumen poder reductor. El producto de GOGAT es sustrato para GS y viceversa; de esto se desprende que dichas enzimas catalizan un ciclo metabólico. Además de ser aminoácidos constituyentes de proteínas, la glutamina y el glutámico tienen otra importante función: son los principales donadores de nitrógeno biosintético. En muchas condiciones de crecimiento, casi todo el nitrógeno de las macromoléculas celulares pasó por glutámico y, de éste, un alto porcentaje pasó también por glutamina. De aquí que a GS, GOGAT y GDH se les considere enzimas centrales del metabolismo nitrogenado. Sin embargo, es posible que su participación sea menor durante un crecimiento en un medio rico, ya que en este caso, muchos de los componentes de las macromoléculas son importados a la célula como tales y no tienen que ser sintetizados.

Alfa-ceto glutarato forma parte del ciclo de Krebs. Además, las reacciones catalizadas por GS, GOGAT y GDH son grandes consumidoras de energía. Por ello se ha creído que el balance entre nitrógeno y carbono, seguramente esencial para un crecimiento óptimo, debe estar regulado a nivel de esas tres reacciones. Hasta la fecha, esta hermosa hipótesis ha sido muy difícil de demostrar. Sin embargo, ha servido de justificación a muchos proyectos.

En enterobacterias, GS está codificada en el gen glnA. La primera vez que glnA de E. coli fue clonado en un plásmido, la selección fue por

complementación a gln⁻ de una cepa glnA⁻. En el pACR1, que fue el plásmido resultante, glnA estaba contenido en una porción de DNA sobradamente grande. La presencia de glnA se confirmó por varios métodos; uno de ellos fue el de micéculas. En este sistema se observó que pACR1, además de codificar proteínas identificables, codificaba a otra con un aparente peso molecular de 82kd (1). Posteriormente esta proteína fue descrita por otro grupo de investigación, que le asignó un peso molecular de 82kd (2). En lo sucesivo hablaré mucho de esta proteína y del gen que la codifica. La llamaré "la proteína de 82kd"; no por que crea que esto hace mejor justicia a su peso molecular, sino por meras razones de conveniencia. (Toda la información respecto a "la proteína de 82kd" está contenida en las referencias 1 y 2, o son datos de nuestro laboratorio). Cabe aclarar que, dado que no se conocía, ni se conoce, ningún fenotipo seguible de "la proteína de 82kd", generalmente su presencia o ausencia fue monitoreada por tinción o autorradiografía de extractos proteicos sometidos a electroforesis.

Mediante experimentos de delección, pronto se supo que las regiones de control de glnA y del gen de "la proteína de 82kd" están contiguas, y que estos genes se transcriben en sentidos opuestos.

También fue evidente que "la proteína de 82kd" es muy abundante. En un crecimiento en medio rico esta proteína representaba más del 1% de la proteína teñible por Coomassie. En todos los sistemas, siempre se mostró como igual o mayormente abundante que GS, la cual, en limitación de nitrógeno existe en una proporción de más de 20,000 moléculas por célula. De esta abundancia se concluyó que "la proteína de 82kd" no debería ser un regulador.

Al analizar las fracciones soluble y sedimentable de un lisado de micéculas que habían contenido a pACR1, Alejandra Covarrubias encontró que la mayor parte de "la proteína de 82kd" quedaba en la fracción sedimentable. Esto

sugirió que "la proteína de 82kd" estaba asociada a la membrana ó a la pared celulares.

Cuando un alumno, en el laboratorio de Alejandra Covarrubias, intentó obtener inserciones dentro del gen para "la proteína de 82kd", observó que dichas inserciones parecían afectar negativamente el crecimiento en medio rico, pero no en medio mínimo. Son muy pocas las funciones celulares que pueden tener esta característica, por lo cual esta observación nos pareció una clave importante para deducir la función de este gen.

Mi trabajo de maestría consistió en estudiar el funcionamiento de la región de control de glnA. Para ello hice experimentos tipo Northern; y mis probadores frecuentemente fueron de doble cadena. Dado que la región de control del gen de "la proteína de 82kd" esta adyacente a la de glnA, cuando usaba un probador que se extendía hacia arriba de glnA algunos cientos de bases, aparecía en mis autorradiografías una banda muy intensa de 1820 nts. que correspondía al mRNA de "la proteína de 82kd". Al inverso que GS, el transcrito de 1820 nts. era más abundante cuando el cultivo había contenido alto nitrógeno (15mM de amonio) que cuando había contenido poco (0.5mM de amonio); si bien la variación de tal abundancia era de no más de un 30%.

El surgimiento...

El gen glnA es transcrito a partir de dos promotores. El distal, glnAp1, origina un transcrito de 1740 nts.; el proximal, glnAp2, uno de 1670. El promotor glnAp1 es muy débil y el transcrito al que da origen migra en los gels muy cerca de los transcritos de 1820 y 1670 nts., justo en medio de ellos. Por esto comencé a usar un probador pequeño que no detectaba a esos dos transcritos pero sí al proveniente de glnAp1. A la vez tuve que aumentar la sensibilidad de mis experimentos.

Inesperadamente, al hacer esos dos cambios, apareció el dato del cual

se generó mi proyecto de doctorado. El hecho fue que, además del transcrito correspondiente a glnAp1, apareció otro, más abundante, de 1960 nts. Este nuevo transcrito, según pude comprobar, correspondía al gen de "la proteína de 82kd", provenía de un promotor 140pb mas cercano a glnA que aquel que originaba el transcrito de 1820 nts. y, además, su extremo 5' era complementario en al menos 30 bases al del transcrito proveniente de glnAp1. No lo había observado yo antes, porque la abundancia del transcrito de 1820 nts. lo ocultaba.

Estos resultados condujeron al surgimiento de la siguiente hipótesis:

la hipótesis...

Que glnA es parte de un operón divergente con dobles promotores divergentes en su región de control.

En si, esta hipótesis nos pareció muy atractiva. Sin embargo, antes de continuar, debo advertir que, aunque ésto y aún más resultó cierto, también resultó biológicamente irrelevante.

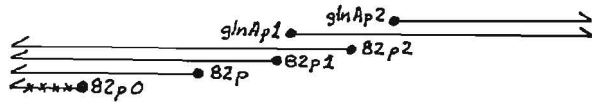
A los lectores no adentrados en la regulación del metabolismo nitrogenado en E. coli recomiendo leer ahora el apéndice A.

(Aquí comienza lo que fue mi trabajo de doctorado.)

La hipótesis se vio rápidamente enriquecida cuando, al buscar los inicios de transcripción del gen de "la proteína de 82kd" mediante experimentos

de "extensión de primero", encontré que no había dos sino cuatro promotores. Este resultado fue muy reproducible. Para referirme a los cuatro promotores, los llamaré 82p2, 82p1, 82p y 82p0; siendo el primero el más cercano a glnA, y así sucesivamente. (Ver la figura 1).

Fig.1



El cuadro al que llegamos fue el siguiente. De 82p se originaba el transcrito de 1820 nts.. En la "extensión de primero" este promotor se manifestaba como uno 30 a 100 veces más fuerte que los otros tres. Los promotores 82p2, 82p1 y 82p0 se manifestaban como de fuerzas muy similares entre sí. 82p2 era el promotor cuyo transcrito, de 1960 nts., se traslapaba con el de glnAp1. Los nuevos hallazgos fueron 82p1 y 82p0. No nos sorprendió no haberlos descubiertos en los Northern, dada su escasa fuerza y en virtud de nuestra selección de probadores.

El dato que más enriqueció a la hipótesis original fue que, en cuanto a secuencia, 82p0 se parecía mucho a los promotores tipo Ntr (como por ejemplo glnAp2); los cuales requieren para expresarse de los productos de los genes que por entonces llamábamos glnF y glnG. Este dato nos hizo creer que el gen de "la proteína de 82kd" compartía esos dos reguladores con glnA.

...y la caída...

Sin embargo 82p0 prontamente se desvaneció; pues observamos que usando a un M13 como templado, la transcriptasa reversa abortaba en la región de control del gen de "la proteína de 82kd", exactamente en la posición correspondiente a 82p0. Al volver a mapear los inicios de transcripción del gen

de "la proteína de 82kd", ahora usando el método de "mapeo por S1", se confirmaron la existencia y posiciones de 82p2, 82p1 y 82p, y la inexistencia de 82p0.

Por aquel tiempo, uno de intensa revisión y análisis dentro de nuestro laboratorio, caí en la obsesión de averiguar la función de "la proteína de 82kd". Para ganar la tranquilidad, construí una hipótesis que explicaba todos los datos existentes. Pensé que una bacteria que crece en medio rico tiene que degradar moléculas nitrogenadas para obtener energía a partir de los esqueletos de carbono. El amonio residual tiene que ser eliminado, pues no hay necesidad de asimilarlo y además es tóxico. Si "la proteína de 82kd" llevara a cabo dicha excreción, se explicarían el que fuese tan abundante, que estuviese asociada a la membrana, que las inserciones en su gen se manifesten en medio rico y no en medio mínimo, que su máxima abundancia fuese justamente en medio rico, se explicaría todo, y lo más importante, se explicaría que la evolución hubiese colocado a su gen tan próximo a glnA (sin duda, para poder regularlos interrelacionadamente).

Para verificar la primera parte de la hipótesis, medí la aparición de amonio en un medio rico (medio Luria) cuando una cepa silvestre crecía en él. Fue sorprendente el comprobar que, en las 6 últimas divisiones celulares anteriores a la fase estacionaria, las bacterias procesaban y excretaban más de 20mmoles de amonio /ml de cultivo. La adición de 2g/l de glucosa al medio Luria reducía la excreción de amonio en un 30%.

Para verificar el resto de la hipótesis, construí un par de plásmidos que llevaban el operón de glnAIG junto con el gen de "la proteína de 82kd". Difieran en que, en uno de ellos, el gen de "la proteína de 82kd" estaba interrumpido por una inserción temprana de un cassette que confiere Cm^r.

Transformé con ellos una cepa de E. coli de la cual tanto el operón de glnALG como el gen de "la proteína de 82kd" habían sido deletados. El primer resultado negativo fue que ambas cepas crecían bien en Luria. El segundo fue que excretaban amoníaco perfectamente y de igual manera.

Usando esas dos cepas examiné una vieja hipótesis que decía que la sensibilidad a medio rico de una cepa deficiente en "la proteína de 82kd" era una cuestión de tipo osmótico. Para ello las crecí en medio Luria adicionado de distintas concentraciones de NaCl. Solamente en concentraciones muy altas de NaCl (más de 0.8M), la cepa deficiente mostraba mayor sensibilidad que la cepa control. Esto cabía esperarse, ya que la ausencia de una proteína tan abundante debía alterar las propiedades físicas de la bacteria, independientemente de la función de esa proteína. Por lo tanto, este resultado no me ayudó en nada a esclarecer la función de "la proteína de 82kd".

Aprovechando esas mismas dos cepas, probé para averiguar si la deficiencia de "la proteína de 82kd" se manifestaba sobre la capacidad de crecimiento de la bacteria en alguno de varios medios mínimos. En estos utilicé combinaciones de glucosa, glicerol o lactato como fuentes de carbono, y amoníaco o glutamina como fuentes de nitrógeno. No pude observar ninguna diferencia entre las dos cepas. También se mostraron indistintas en medio Luria bajo anaerobiosis parcial.

Entonces, tras estas derrotas, decidí que si el gen de "la proteína de 82kd" no tenía fenotipo, y yo no tenía otra hipótesis, mejor debería continuar con el análisis de su región de control.

La expresión de glnA es afectada directamente por los productos de los genes glnE y glnG, e indirectamente por los productos de los genes glnI y glnB. Utilicé cepas defectivas en cada uno de estos cuatro genes para ver si alguno de ellos tenía efecto sobre la transcripción del gen de "la proteína de 82kd". El análisis lo llevé a cabo por "mapeo por S1" de los

transcritos. Usé las condiciones de 0.5 y 15 mM de amoníaco como fuente de nitrógeno, pero adicionando 1g/l de glutamina para suplir esta auxotrofia en la cepa glnE⁻. El promotor 82p fue totalmente insensible a los cuatro contextos genéticos. 82p2 aumentó ligeramente su transcripción (menos del doble) en el contexto genético glnG⁻; 82p1 la disminuyó ligeramente en este mismo contexto genético. Los contextos glnI⁻, glnL⁻ y glnB⁻ no tuvieron efecto sobre promotor alguno.

La mutación gln76 es una transversión de T por A en la región de 10 del promotor glnAp1, la cual hace a éste más parecido al consenso de los promotores tipo Pribnow, y la cual tiene como efecto el hacer al glnAp1 mutante casi 100 veces más fuerte que el silvestre. Sin embargo, el promotor mutado sigue siendo completamente represible por el producto de glnG en la condición de alto amoníaco. Quise indagar si la fuerza del glnAp1 mutante tenía algún efecto sobre los promotores de "la proteína de 82kd". Obtuve los siguientes resultados. Cepas que llevaban esta mutación manifestaron expresión normal de los tres promotores del gen de "la proteína de 82kd". Cuando además de la mutación gln76, la cepa carecía del producto de glnG, sucedió algo curioso: se apagó 82p1 y se hizo aparente un nuevo inicio de transcripción. Este último dato es, aún ahora, demasiado extraño como para tratar de hallarle una explicación. Por otro lado, fue bastante interesante que la transcripción de glnAp1 mutado no obstaculizara la de 82p2, a pesar de estar encontradas. Usualmente uno habría dado por hecho contrario.

En resumen, a pesar del solapamiento de las transcripciones provenientes de sus promotores distales, tuve que concluir que, glnA y el gen de "la proteína de 82kd" ni se relacionan regulatoriamente, ni interaccionan el uno con el otro; ni siquiera se estorban. Concluí, también, que el gen de "la proteína de 82kd" era un gen estructural, constitutivo y fácilmente

prescindible.

En ese momento, mi situación me pareció desesperada. Afortunadamente ahora , basándome en resultados recientemente aparecidos en la literatura, he podido derivar de mis datos negativos una conclusión que es, a mi juicio, relevante. Para ello he tenido que dar a mis datos un enfoque totalmente distinto; que se comprenderá al leer el artículo que constituye la sección de RESULTADOS. Antes de que sea leído, debo aclarar que en ese artículo omití toda alusión a los promotores 82p1 y 82p2. El haberlos mencionado no habría afectado las conclusiones del trabajo y, en cambio, habría aumentado notablemente su complejidad. Por otro lado, dado que dicho artículo tiene su propia estructura interna, pido que sea leído y analizado frescamente, desde el punto de vista que plantea, y libremente de los prejuicios que esta INTRODUCCION haya podido propiciar.

REFERENCIAS:

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

Cloning and physical mapping of the glnA gene of Escherichia coli K-12.
Gene 11 (1980) 239-251.

2.-Keith Backmar, Yu-Mein Chen and Boris Magasanik

Physical and genetic characterization of the glnA-glnG region of
Escherichia coli.

PNAS USA 78 (1981) 3713-3717.

DISCUSION

Esta sección constará de cinco subsecciones cuyos encabezados son:

- a) ¿Cómo actúa el BELE de glnA?
- b) El problema de los 5 sitios de unión para NR₁ en la región de control de glnA.
- c) El BELE de glnA como un modelo para enhancers en general.
- d) La selección de promotores en enhancers eucariotes.
- e) Epílogo: un punto de vista evolutivo personal.

¿Cómo actúa el BELE de glnA?

Para analizar la forma de actuar del BELE conviene revisar algunas generalidades del proceso de iniciación de la transcripción y de como éste puede ser regulado. De acuerdo con la teoría vigente, el proceso de iniciación de la transcripción consta de tres etapas (1). La primera consiste en la búsqueda de un promotor por la RNA polimerasa. Durante esta etapa, el muestréo de secuencias de DNA es llevado a cabo esencialmente a través de la subunidad sigma de la holoenzima. Una vez que se encuentra un promotor, comienza la etapa de "complejo cerrado". Durante ésta, la holoenzima permanece unida al promotor a través de contactos establecidos tanto por la subunidad sigma como por el core de la RNA polimerasa. Esta es una etapa crítica, que puede desembocar a la abortición del proceso (con el desprendimiento de la polimerasa del DNA), o a la formación del "complejo abierto" de iniciación. Durante la etapa de complejo abierto, el core de la polimerasa abre las dos cadenas del DNA, aproximadamente

unas cinco bases alrededor de la posición +1, y establece interacción con estas bases. En esta etapa la polimerasa acepta el primer nucleótido trifosfato complementario y se prepara para comenzar la polimerización, a la llegada de segundo nucleótido trifosfato complementario. Momentos después de iniciada la polimerización, la subunidad sigma se desprende del core de la polimerasa. Esto es importante, ya que las interacciones entre sigma y el DNA pudieran frenar el avance del complejo de elongación. Por último, el estado de polimerización progresiva procede muy establemente hasta encontrar un terminador. Todo este esquema ha sido obtenido a partir del comportamiento de promotores tipo Pribnow y siendo sigma 70 el factor sigma de la polimerasa (4). Sin embargo, es posible que la situación sea muy similar para el caso de los promotores tipo Ntr y sigma 60.

Regular a un promotor es cambiar su fuerza virtual (4). Para ello, se debe actuar sobre el que sea el paso limitante, o el más susceptible, del proceso de iniciación (4). Debido a la abundancia de RNA polimerasas, la etapa de búsqueda de un promotor parece no ser un paso limitante de la iniciación de la transcripción (4). Por otro lado, con experimentos de "run off" se ha visto que la duración del complejo abierto no depende de las secuencias reconocidas por la polimerasa (el -10 y el -35) (4,5). Por otro lado más, cuando se han comparado promotores débiles con fuertes en condiciones en las que la formación de complejo abierto está impedida, se ha observado que en estos últimos la permanencia del complejo cerrado es mayor (4). En resumen, parece ser que la diferencia principal entre promotores fuertes y débiles es que los fuertes generan complejos cerrados de iniciación más estables.

En apoyo de esa suposición, es interesante que los sitios operadores de los represores usualmente se encuentran localizados de forma tal, que el represor obstruye la formación del complejo cerrado (4,5). Aunque en algunos casos los

represores funcionan obstaculizando al complejo de elongación, esto es relativamente raro (5). Por otro lado, los sitios de reconocimiento de los activadores nunca se superponen a la región ocupada por la polimerasa; normalmente se encuentran a partir del -15 hasta el -60 (4); si bien, esta última generalización no es válida para los BELEs.

Si como se ha creído, la sensibilidad del complejo cerrado es el punto donde más fácilmente se puede ejercer regulación, entonces, el complejo cerrado tiene que ser estabilizado para que se de un efecto de activación. Esto puede ser logrado únicamente por alguno de los siguientes tres mecanismos (1) :

- I) Cambiando la conformación del promotor,
- II) Cambiando la conformación de la holoenzima de la polimerasa,
- o III) Sin cambiar ni al promotor ni a la polimerasa, pero forzando la interacción entre éstos, mediante mantenerlos en la colocación adecuada.

Cualquier combinación de estos tres mecanismos podría presentarse también.

Para el caso de la activación de glnAp2 por NR_i activador , el mecanismo I resulta improbable, ya que es difícil transmitir al promotor un efecto a larga distancia a través del DNA. Además, intuitivamente me parece, que tal efecto no podría transmitir la información necesaria para ocasionar la selectividad en la activación de los promotores. Más aún, y probablemente la evidencia que excluye a este mecanismo del todo, NR_i puede activar a glnAp2 en una molécula de DNA relajada.

El mecanismo III es incompatible con las propiedades de enhancer del BELE en glnA. No puede ser que NR_i activador coloque a la polimerasa en un sitio específico, si su propio sitio de pegado no requiere estar en una posición determinada. Magasanik ha propuesto, que para activar, el NR_i pegado a la secuencia BEL, interacciona con un NR_i pegado en el promotor (2) . De ser así, el mecanismo III sería perfectamente factible, pues la posición del NR_i

del promotor sería inamovible, y funcionaría como marco de coordenadas para la posición de la polimerasa. Desgraciadamente, la suposición de una molécula de NR_i unida al promotor no está bien justificada.

De los tres mecanismos, el realmento adecuado para explicar propiedades de enhancer es el mecanismo II. Además, ya en el artículo argumentamos, que NR_i en altas concentraciones molares puede activar a glnAp2 sin requerir estar simultáneamente unido al DNA (o, al menos, no a su secuencia específica). Si esto se demostrara, no podríamos dudar de que el mecanismo II opera en la activación de glnAp2, ya que los mecanismos I y III exigen el pegado de NR_i al DNA.

Por otro lado, en condiciones donde la concentración de NR_i es baja (habiendo alrededor de 6 moléculas/célula), los sitios de pegado de NR_i que constituyen a la secuencia BEL son indispensables para la activación de glnAp2 (su posición respecto al promotor puede ser cambiada, pero tienen que estar presente, y probablemente en cis) (2) . Este dato parecería estar en contra del mecanismo II, pues como hemos dicho, este mecanismo no implica sitios de pegado del activador. Sin embargo, pueden hacerse dos consideraciones a este respecto. Es de suponerse, que si de la región de control de glnA se deletan los sitios de pegado de NR_i, el complejo sigma 60-polimerasa que pudiera unirse a glnAp2 no encontrará un NR_i activador con el cual interaccionar, ya que dada la escasa concentración de NR_i, éste no debe existir en forma libre, sino seguramente estará unido a sus otros sitios de pegado en el cromosoma de E. coli, así como a posibles pseudo-sitios. Al no estar modificada por NR_i, esta holoenzima no formará un complejo cerrado estable con glnAp2; y, por lo tanto, la frecuencia de aborción dominará sobre la frecuencia de formación de complejo abierto. Hay una segunda consideración más o menos similar. Aún cuando hubiera NR_i activador libre, la presencia de

un sitio de unión de NR_i cerca de glnAp2 aumentaría la frecuencia de encuentros entre NR_i y sigma 60-polimerasa, trayendo como consecuencia una mayor expresión de glnAp2. Este efecto será más evidente, cuanto menor sea la probabilidad de encuentros espontáneos entre NR_i activador libre y la polimerasa. Esto sucede cuando hay poco NR_i.

De lo expuesto hasta ahora se concluye, que el mecanismo II es necesario para que se presenten propiedades tipo enhancer. Me gustaría añadir, además, que dado un activador cuyo mecanismo de acción sea del tipo II, éste seguramente tendrá la capacidad de actuar como un enhancer.

Es interesante que, dado que el mecanismo II implica un cambio estérico en la polimerasa, es fácil ver como este mecanismo podría volverse uno de represión. Bastaría con que el cambio conformacional inducido en la polimerasa ocultase en ella aquellas regiones de su superficie con las cuales normalmente hace los contactos estables con el DNA. De esta forma, también se puede pensar en un represor que actúe a distancia. Ejemplos de esto ya han sido hallados en los sistemas eucariotes. Un caso interesante es el de la proteína E1A de adenovirus 2, la cual puede ser simultáneamente un activador y un represor en promotores distintos (6).

Hasta el momento me he referido a un cambio conformacional de la holoenzima de la RNA polimerasa inducido por NR_i activador. Lo más probable es que éste se lleve a cabo por un contacto entre NR_i y sigma 60, dado que el core de la polimerasa es común a todos los eventos de transcripción, mientras que NR_i y sigma -60 han sido especializados para la expresión de genes Ntr. Además, en el caso de los promotores tipo Pribnow, se ha llegado a la conclusión de que el core hace principalmente contactos inespecíficos con las bases, mientras la subunidad sigma los hace específicos (4,5). Por esta razón, se ha creído que los activadores actúan sobre la subunidad sigma (4,5). Esto se ve apoyado por la circunstancia de que el sitio de unión de un activador

siempre está hacia el lado de la subunidad sigma; en una posición muy favorable para que sigma y el activador hagan contacto (4). La misma lógica parece poder aplicarse al caso de NR_i y sigma-60 en glnA, y al caso del producto de NifA y sigma-60 en NifH.

El mecanismo III, a pesar de ser contrario a la flexibilidad posicional del BELE, probablemente participa en la activación de glnAp2 como un mecanismo adicional o, quizás, circunstancial. La flexibilidad posicional del BELE es un hallazgo resultante de la modificación artificial del DNA. In vivo, la distancia de la secuencia BEL a glnAp2 parecería estar sujeta a selección, pues no cambia con el tiempo. (Las posiciones de estas secuencias son idénticas en *S. typhimurium* y en *E. coli*) (2). Por otro lado, a pesar de que teóricamente podrían estar más cercanas o más lejanas, sucede que en varias probables secuencias BELE (las de los genes nif), la distancia entre éstas y sus respectivos promotores es bastante similar para todos los casos (3). Esto permite suponer, que si esa distancia es justamente la adecuada, NR_i activador podría estabilizar al complejo cerrado, sirviendo de conexión entre la polimerasa y el DNA (además de actuar por el mecanismo, ya discutido, de cambiar a la polimerasa para que tenga contactos más fuertes con el DNA).

De esta forma, actualmente preferimos el siguiente modelo:

- a) NR_i, tanto cuando está como activador como cuando no lo está, se une a sus sitios de alta afinidad en la región de control de glnA.
- b) NR_i tiene una región de su superficie que es capaz de interactuar con una región de la superficie de sigma60.
- c) El complejo sigma60-polimerasa rastrea al DNA en busca de promotores.
- d) Cuando el complejo sigma60-polimerasa choca con un NR_i activador, unido al DNA (aunque no necesariamente), se induce un cambio conformacional en sigma60 que hace que ésta aumente su afinidad por los promotores Ntr. Dado que

usualmente habrá sitios de unión para NR_i adyacentes a los promotores Ntr, el montaje de la polimerasa sobre el promotor es casi inmediato.

e) Probablemente al momento de formarse el complejo abierto de iniciación, se libera la interacción entre NR_i y sigma60.

El problema de los 5 sitios de unión de NR_i en la región de control de glnA.

En la región de control de glnA existen 5 sitios de unión para NR_i (ver figura II). Dos de ellos son de alta afinidad, y sobre estos no hay duda de su significado biológico. Es distinto el caso de los tres de baja afinidad. Para éstos, únicamente se ha demostrado que in vitro pueden unir NR_i cuando el regulador está en un gran exceso molar. La presencia de estos cinco sitios ha dificultado el lograr conclusiones limpias respecto a la regulación de glnAp2. Molesta en particular, la posibilidad de que aún habiendo una baja concentración de NR_i, los sitios de baja afinidad puedan ser llenados, lo cual podría suceder, si hubiera cooperatividad con los sitios de alta afinidad. Si bien la evidencia final tendrá que provenir de nuevos experimentos, quisiera argumentar en contra de la posibilidad de que estos sitios débiles encierren un mecanismo de activación hasta ahora no previsto.

En primer lugar, los experimentos de unión in vitro no apoyan la existencia de cooperatividad, o visto desde otro punto de vista, la baja afinidad determinada para los sitios NR₃, NR₄ y NR₅ ya incluye cualquier efecto de cooperatividad que pudiera darse. Extrapolando esto a la situación in vivo, resulta que aún habiendo cooperatividad, los sitios débiles no deben estar ocupados cuando solo hay de 0 a 8 moléculas de NR_i por célula

(condiciones en las cuales, sin embargo, glnAp2 puede ser inducido hasta un 80 a 90% de su máxima capacidad). En segundo lugar, supongamos que la forma de acción de los sitios de alta afinidad fuera el garantizar el llenado de los sitios próximos a glnAp2, en los cuales hipotéticamente NR_i podría actuar con mayor facilidad sobre el complejo cerrado de iniciación. Si esto fuese algo esencial, entonces se esperaría que cualquier otro método que garantizara el llenado de los sitios próximos a glnAp2, condujera, igualmente, a activación. El experimento ha sido hecho mediante mover los sitios de alta afinidad a las posiciones de los dos sitios próximos a glnAp2 (2) . El resultado fue que no hubo activación, sugiriendo que NR_i unido en esas posiciones no puede interaccionar en forma efectiva con la polimerasa.

Por último, es de suponerse que el mecanismo de acción de NR_i sea fundamentalmente el mismo cuando hay poco que cuando hay mucho de este regulador. Sin embargo, al menos cuando hay abundancia de NR_i, es dudosa la participación de los dos sitios próximos a glnAp2 en la activación de este promotor. El argumento proviene del hecho de que, en exceso de NR_i, glnAp2 es igualmente activable cuando estos dos sitios están presentes que cuando han sido deletados (2) .

En cierta forma, mis dos últimos argumentos, que son los más fuertes, han desacreditado esencialmente a los sitios NR₄ y NR₅. No he podido encontrar un tan buen argumento a favor o en contra del sitio NR₃. Sin embargo, podemos suponer que la posición de este sitio no lo hace significativamente diferente de los sitios NR₁ y NR₂, y por lo tanto, que si acaso el sitio NR₃ juega un papel en la activación de glnAp2, su participación debe ser mecánicamente similar a la de los dos sitios de alta afinidad.

El BELE de glnA como un modelo para enhancers en general.

Ciertamente el BELE de glnA ha sido poco estudiado como un enhancer. Sin embargo, tiene cuatro características que lo hacen muy interesante como modelo de enhancers en general. En primer lugar, este elemento se encuentra en el sistema biológico que mejor conocemos y el que más expeditamente somos capaces de manipular: *E. coli*. En segundo lugar, existe, ya, un amplio conocimiento de la genética relevante a este elemento. En tercer lugar, aparentemente conocemos el conjunto completo de las proteínas que interaccionan con la región de control de glnA. Y, por último, existe un sistema in vitro bien definido, donde se manifiesta fidedignamente la capacidad transcripcional de la región de control de glnA, y en particular, el efecto activador de NR_i.

Falta aún hacerse una caracterización sistemática del significado de la secuencia nucleotídica en la región de control de glnA. A partir de comparaciones se han llegado a establecer consensos, tanto para las secuencias reconocidas por NR_i, como para las que definen a un promotor tipo Ntr. Sin embargo, estas secuencias consenso no han sido debidamente validadas por mutagénesis de las bases correspondientes. Actualmente, no sabemos cuales secuencias de la región de control de glnA son dispensables y cuales no.

Tampoco se cuenta con un análisis de las estructuras espaciales ni de NR_i, ni del complejo sigma 60-polimerasa. Es predecible que esto se hará pronto. Los primeros pasos en ese sentido han sido dados con el trabajo de purificación de las proteínas y con la deducción de las secuencias de aminoácidos de éstas.

Hay al menos dos características, frecuentemente encontradas en los enhancers eucariotes, para las cuales el BELE de glnA probablemente no servirá como modelo. La más importante de las dos se refiere al concepto de

programa genético (entendiéndose por éste, la expresión preferencial y concertada de una fracción de los genes de la célula, de acuerdo con una estrategia adaptativa). Tanto NR_i como sigma 60 definen un programa genético. Sin embargo, a diferencia de muchos programas genéticos en eucariotes, el programa definido por NR_i y sigma 60 es reversible y es, además, independiente de tiempo, en el sentido de que puede expresarse en casi cualquier momento de la historia de un crecimiento. En eucariotes, los enhancers participan en el establecimiento de programas estables, los cuales se ponen en función en momentos secuencial o cronológicamente determinados (7). Parece ser que para ello, varios enhancers actúan concertadamente para definir la expresión de un gen dado. Se ha postulado que en estos casos existe interacción física entre las proteínas regulatorias de dichos enhancers (6). Este tipo de mecanismo no puede ser modelado por el BELE de glnA.

Por otro lado, existe evidencia de que hormonas, u otro tipo de efectores, entran al núcleo celular, donde directamente califican la acción de las proteínas regulatorias de los enhancers (6,7). Esto se parece un poco al efecto de cAMP sobre CRP en enterobacterias, pero difiere significativamente del caso de NR_i, para el cual la interconversión de sus formas activa e inactiva requiere de la acción catalítica de NR_u. Otra característica importante de NR_i, aunque esto merece un mayor estudio, es la manera en la que mecanísticamente se diferencian sus estados activo e inactivo; ya que aparentemente la diferencia no reside en una distinta capacidad para reconocer secuencias de DNA. Es posible que ésta sea otra diferencia entre el BELE de glnA y los enhancers eucariotes, por lo cual habrá que tener cautela. Sin embargo, tomadas en cuenta las anteriores consideraciones, me parece que el funcionamiento de los enhancers bacterianos será en buena medida extrapolable a los enhancers eucariotes.

La selección de promotores en enhancers eucariotes.

En repetidas ocasiones se han hecho quimeras entre enhancers y promotores eucariotes (6,7). El resultado más común ha sido, que la expresión a partir del promotor aumenta en las condiciones que el enhancer así lo dicta. Este resultado indica, que en los casos probados, los enhancers no han mostrado selectividad de promotores. Quizás este hecho sea consistente con que no se ha encontrado un equivalente a subunidades sigma alternativas en las polimerasas de eucariotes. Se sabe que hay varios factores proteicos de la polimerasa que solamente participan en la iniciación a la transcripción; sin embargo, cada uno lleva a cabo un función distinta y no son sustituibles el uno por el otro. Debe tomarse en cuenta, que al hacerse este tipo de consideraciones, normalmente se está pensando en PolII, y se está olvidando que una célula eucariote posee otras dos RNA polimerasas distintas: PolI y PolIII. Las tres polimerasas están constituidas por conjuntos bien definidos de subunidades. Ninguna de esas subunidades es compartida por una polimerasa con alguna otra. Sin embargo, es fácil ver que casi todas las subunidades de una polimerasa tienen un equivalente en las otras dos. Puede decirse, que tanto funcional como estructuralmente, PolI, PolII y PolIII son bastante parecidas; más PolII con PolIII. Por esto, cabe preguntarse si un enhancer de un gen transcrito por PolII (todos los estudiados hasta ahora caen en este caso) puede activar un promotor reconocido por PolIII. Si la respuesta es "no", la siguiente pregunta sería, ¿es esta indicación de selección de promotores? Desgraciadamente, se conoce poco de la regulación de los genes transcritos por PolIII.

Un dato interesante es, que sí se ha encontrado una cierta diversidad de formas de PolII en un solo organismo. Esto pudiera estar relacionado al

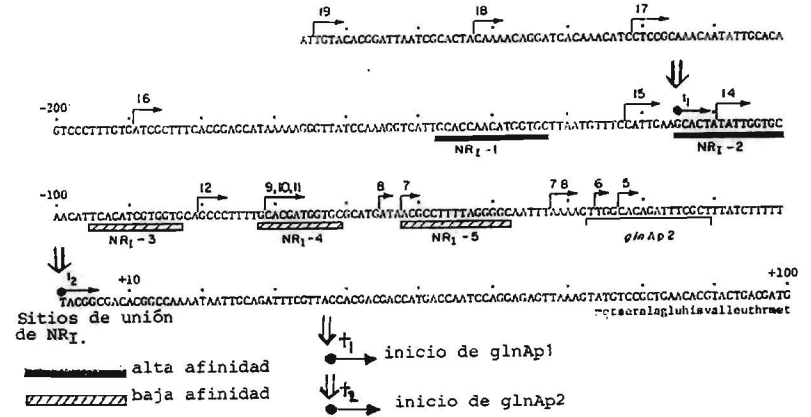
creciente reconocimiento de que algunos promotores, aparentemente utilizados por PolII, tienen una región rica en pares G/C, en lugar de la secuencia "TATA" que se consideraba consenso para los promotores reconocidos por esta polimerasa (10). Parece ser que esa región rica en G/C resultará ser común a los promotores de los genes de mantenimiento, genes cuyos productos son enzimas del metabolismo basal y que por ello son expresados en las células de todos los tejidos. Dada la existencia de al menos dos clases de promotores reconocidos por PolII, cabe otra vez, preguntarse si un enhancer puede discriminar entre estas dos clases de promotores.

El record mundial para la distancia a la que puede actuar un enhancer eucariote lo ostenta el enhancer del promotor V_H del gen de IgH de ratón, con una distancia 16,000 bases (6). Sin embargo, cálculos bien fundamentados indican, que en eucariotes superiores hay en promedio un gen, o menos, por cada 15000 pares de bases (9). Esto hace pensar, que en estos organismos, la distancia entre los genes basta para aislarlos de la regulación de los genes vecinos. De acuerdo a esto, (in vivo) la selectividad de promotores podría ser una consecuencia de la posición de los enhancers, cuya efectividad de largo alcance no sería suficiente para afectar a promotores distintos a su propio promotor blanco; ni siquiera a los de los genes vecinos más próximos, pues aún estos estarían demasiado lejanos. Aunque en otras dimensiones, esto sería muy parecido al mecanismo de selección de promotores que manifiesta CRP en E. coli. Desde luego, la existencia de este tipo de mecanismo no implicaría necesariamente, que no haya activadores de enhancers eucariotes que puedan comportarse como NR_1 en cuanto a discriminar su acción sobre las polimerasas.

Epílogo: un punto de vista evolutivo personal.

Para concluir esta discusión, me gustaría plantear el siguiente punto de vista. Yo creo, que a pesar de las grandes ventajas que los enhancers proporcionan en cuanto a plasticidad (la cual permite una más rápida adaptación y evolución), la capacidad de regular a distancia no es un triunfo evolutivo. Creo que es una consecuencia gratuita del mecanismo II de activación, ya discutido. Creo que el verdadero problema, y por tanto el verdadero logro evolutivo, de los organismos que requerían economía de DNA, fue el haber limitado esos efectos regulatorios a distancia; el impedir que los genes fueran afectados por los efectos regulatorios que correspondían a sus genes vecinos.

Fig.2. Secuencia de la región de control de *glnA* donde se muestran las posiciones de los sitios de unión para NR_I.



BIBLIOGRAFIA

En las siguientes obras esta contenida toda la información, relacionada a esta tesis, que no haya citado yo específicamente en el artículo. Las presento aquí como literatura de consulta general y las ordeno por temas.

Metabolismo nitrogenado en bacterias.

1

Boris Magasanik,
Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria.
Ann.Rev.Genet. 16 (1982) 135-168.

2

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

3

Martin Buck, Stephen Miller, Martin Drummond and Ray Dixon.
Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation
genes.
Nature 320 (1986) 374-378.

Funcionamiento de promotores procariotes.

Biological Regulation and Development, Vol I, Gene expression.
Edit. Robert S. Goldberg.
Plenum Press, New York, 1979.

4

4.-Regulation of enzyme synthesis in bacteria: a comparative
and evolutionary study.
Patricia H. Clarke.

5

7.-Genetic control signals in DNA.
David Pribnow.

Genética molecular de eucariotes (enhancers y otras cosas).

6

Paolo Sassone-Corsi and Emiliana Borelli.
Transcriptional regulation by trans-acting factors.
TIG 2 (1986) 215-218.

7

William S. Dynan and Robert Tjian.
Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence specific DNA-binding
proteins.
Nature 316 (1985) 776-778.

8

Kim Nasmyth.
A U-turn in the regulation of transcription?
TIG 2 (1986) 115.

9

Susumu Ohno.
The total number of genes in the mammalian genome.
TIG 2 (1986) 8.

APENDICE A

La GS de *E.coli* consta de 12 subunidades idénticas codificadas en el gen *glnA*. La actividad de un dodecamero de GS puede ser gradual y reversiblemente disminuida mediante la adenilación de sus subunidades. Esta adenilación, así como la desadenilación, es el resultado de la acción catalítica de una ATasa, el producto del gen *glnE*. La acción de la ATasa es calificada por la proteína P_{II} , el producto del gen *glnB*. A su vez, la acción de P_{II} es calificada mediante la uridilación/desuridilación de esta proteína; modificaciones que son llevadas a cabo por una UTasa, el producto de *glnD*. El resultado de esta compleja regulación (a la cual se denomina "de cascada") es que GS está adenilada (inactiva) cuando la relación alfa-ceto/glutamina es baja, y que está desadenilada (activa) cuando la relación alfa-ceto/glutamina es alta.

Como se verá un poco más abajo, GS, además de estar regulada en su actividad/molecula, está regulada en cuanto a su síntesis, como consecuencia de la regulación de *glnA*.

glnA es parte del operón *glnAntrBC* (o *glnALG*, lo que es lo mismo). En este operón existen los promotores *glnAp1* y *glnAp2*, antes de *glnA*, y *glnLp*, antes de *ntrBC*. Los promotores *glnAp1* y *glnLp* tienen expresiones máximas que son de 10 a 30 veces menores que la máxima de *glnAp2*. Tanto *glnAp1* como *glnLp* funcionan cuando hay exceso de nitrógeno, y son reprimidos por NR_i , el producto de *ntrC*, cuando hay deficiencia de nitrógeno. Parece ser que *glnAp1* es activado por CRP unido a cAMP. Tanto *glnAp1* como *glnLp* son promotores tipo Pribnow.

A diferencia de *glnAp1* y *glnLp*, *glnAp2* es un promotor tipo Ntr, por lo cual solamente es reconocido por polimerasas asociadas a σ_{60} , el producto del gen *rpoN* (antes *glnF*). *glnAp2* es activado por NR_i activo cuando hay escases de nitrógeno. La conversión de NR_i en activo se da por la

adición de un fosforilo a la proteína. Tanto esta reacción como su inversa es catalizada por NR_{II} , el producto del gen *ntrB* (antes *glnL*). La acción de NR_{II} es calificada por P_{II} . De esta forma, tanto la regulación catalítica de GS como la regulación genética son participes de una información común.

Como resultado de las regulaciones genéticas mencionadas, los niveles de GS, NR_{II} y NR_i son más altos cuando hay deficiencia de nitrógeno que cuando hay exceso de éste.

Además de realizar las funciones referidas, tanto NR_i como σ_{60} son necesarios para la expresión eficiente de los varios promotores Ntr que hay en *E.coli*. Probablemente, para estos efectos regulatorios, NR_i dependa de las mismas fuentes de información que para el caso del operón *glnAntrBC*. Sin embargo, *glnAp2* parece ser el promotor Ntr más sensible a activación por NR_i que hay en *E.coli*.

GRAPHON		out 7 APR 1987	
F. C. O.		4-4 APR 1987	
m			
1st proof	2nd proof	3rd proof	final proof

Promoter selection by a bacterial enhancer-like activator element (BELE) in *Escherichia coli*

(Regulation; recombinant DNA; Ntr; NR₁; *rpoN*; RNA polymerase; nitrogen fixation; glutamine synthetase)

Alejandro A. Garciarrubio and Alejandra A. Covarrubias

Centro de Investigacion Sobre Fijacion de Nitrogeno, Cuernavaca, Mor. (Mexico)

Received 17 October 1986

Revised 15 November 1986

Accepted 20 November 1986

URGENT

SUMMARY

The *Escherichia coli glnA* gene promoter *glnAp2* is activated by an element able to act bidirectionally and at variable distance over the DNA. We demonstrate here that this activating element does not influence another promoter, *82p*, adjacent to it, from which a gene is transcribed in opposite direction to *glnA*. Thus, although it displays a great flexibility, this element can activate selectively. The unresponsive promoter and *glnAp2* are recognized by RNA polymerases complexed to two different σ factors. Therefore, we argue that promoter selection by this element is dependent upon distinguishing the proper σ factor.

INTRODUCTION

An important characteristic of an activator is its ability to activate only specific promoters. Frequently, this characteristic is uncritically assumed, considering that, to be activated, a promoter has to keep a precise, rather unflexible, position in regard to the

activator's binding site (Reznikoff et al., 1985; Raibaud and Schwartz, 1984). Thus, selective activation would arise from a stringent geometrical requirement in the activation complex; a requirement no promoter would fulfill if not specifically favored by natural selection. However, this explanation would not be applicable if activation could be effected at variable distance over an ample stretch of DNA. Such is the case of the enhancer-like activator element in the *nifH* gene of *Klebsiella pneumoniae*; a gene encoding one of the nitrogenase's subunits (Buck et al., 1986). This activator belongs to a novel class of regulators which we will call a BELE. This particular BELE is constituted by the product of the *nifA* gene, a Nif-specific activator, and its binding site in the *nifH* control region (herein, the activator's binding site of a BELE will be called a BEL sequence). In its natural position, the BEL sequence lies approx. 110 bp upstream from the susceptible

Correspondence to: Dr. A.A. Covarrubias, Centro de Investigacion sobre Fijacion de Nitrogeno, Apdo-postal 565-A, Cuernavaca, Mor. (Mexico) Tel. (731)39988.

Abbreviations: bp, base pair(s); BEL, bacterial enhancer-like; BELE, BEL element; CAP, catabolite-activator protein; *glnAp1*, the 'Pribnow'-type *glnA* promoter; *glnAp2*, the Ntr-type *glnA* promoter; kb, 1000 bp; Nif, belonging to the nitrogen fixation system; NR, nitrogen regulator; Ntr, belonging to the nitrogen regulatory network; nt, nucleotide(s); *nifHp*, *nifH* promoter; *nifLp*, *nifL* promoter; T_m, 50% renaturation temperature; Tn, *E. coli* transposon; *82p*, the promoter of the 82-kDa protein gene.

IMPORTANT

1. Please correct proofs carefully
2. Restrict corrections to instances in which the proof is at variance with the edited manuscript
3. Recheck all reference data
4. Return proofs by airmail within 3 days of receipt

promoter *nifHp*. Constructions that do not carry the nucleotides between the BEL sequence and *nifHp* indicate that there are no sequences required for *nifA*-dependent activation in that region. The BEL sequence can be placed up to 2 kb away from *nifHp*, or its orientation can be reversed, and still mediate *nifA*-dependent activation. When this BEL sequence was fused to another promoter, *nifLp*, it allowed *nifA*-dependent activation of this promoter (Buck et al., 1986).

The only other well-documented BELE was found to activate a promoter of *glnA*, the *E. coli* glutamine synthetase gene. (Reitzer and Magasanik, 1986). This BELE is constituted by the NR_I protein, an Ntr regulator (see below), and its BEL sequence, the two high-affinity NR_I binding sites in the *glnA* control region (Reitzer and Magasanik, 1985; 1986; Ames and Nikaido, 1985; Hirschman et al., 1985). These two NR_I binding sites are required for the activation of the *glnAp2* promoter by NR_I under conditions where its levels are low. This BEL sequence lies 100 bp upstream from *glnAp2*. It conserves the ability to mediate low-NR_I activation when it is moved 1400 bp upstream from *glnAp2*, or when its orientation is reversed, or even when it is placed 3' to the *glnA* gene (Reitzer and Magasanik, 1986). Besides the high affinity sites, there are three other low affinity NR_I binding sites in the *glnA* control region (Hirschman et al., 1985). Apparently, they do not participate in the low-NR_I activation of *glnAp2* (Reitzer and Magasanik, 1986). Enhancer-like properties have not been demonstrated for these sites.

The *glnA* gene can also be transcribed from the weak promoter *glnAp1*. This promoter lies inside the BEL sequence. It is activated by the CAP associated with cAMP, and it serves mainly to keep basal levels of *glnA* transcription under nitrogen-excess growth conditions, when *glnAp2* is inactive. When nitrogen resources become limiting, *glnAp2* becomes activated by NR_I, and *glnAp1* becomes repressed, apparently by simple obstruction, since it is overlapped by the BEL sequence (Reitzer and Magasanik, 1985).

glnA is part of the complex *glnAntrBC* operon (Pahel et al., 1982). The genes *ntrB* and *ntrC* code for the Ntr regulators NR_{II} and NR_I, respectively. Ntr regulators co-ordinate the expression of a set of genes involved in the nitrogen metabolism, the so called Ntr genes, which includes *glnA* (Magasanik, 1982; Gottesman, 1984). Ninfa and Magasanik

(1986) have shown that NR_{II} interconverts the active and inactive forms of NR_I as an activator according to the information about the nitrogen availability furnished by the products of the genes *glnB* and *glnD* (Bueno et al., 1985). Apparently these gene products do not affect *glnAp2*, or other promoters, in a direct way but their information is conveyed through NR_I (Hirschman et al., 1985; Hunt and Magasanik, 1985).

The product of the gene formerly called *ntrA* or *glnF*, now called *rpoN*, was also thought to be an Ntr activator; however, it is now recognized as a σ^{60} factor of the RNA polymerase, σ^{60} (Hirschman et al.,

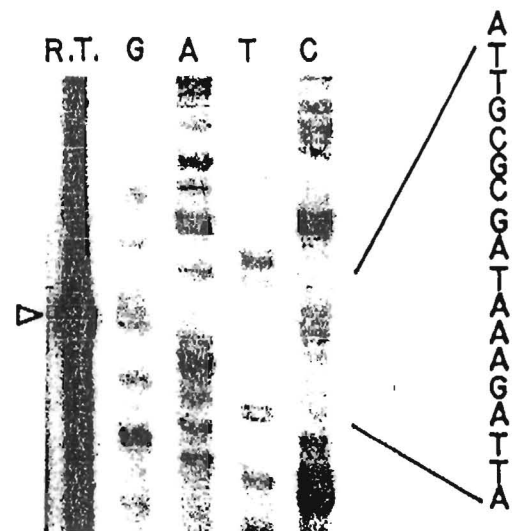


Fig. 1. Primer extension experiment to locate the transcription initiation site of *82p* in the wild-type strain MX614. The RNA used was from a high ammonia culture (described in the legend to Fig. 3). The nucleotide sequence was determined using an M13mp8 phage containing the same strand as the RNA. The same primer was used for both procedures; the synthetic oligodeoxynucleotide

5'-GTCGGCGTGCCCCGGGTATC-3', based on the sequence obtained by Covarrubias and Bastarrachea (1983) and whose 5'-end would correspond, according to the coordinate system used in Fig. 2, to position -539 (Covarrubias and Bastarrachea, 1983). Both methodologies and RNA purification were carried out as described by Leon et al. (1985). For the primer-extension experiment, 50 μ g of RNA and 3 ng of primer were used. After denaturation at 96°C, primer-RNA hybridization was incubated at Tm-25°C for 15 min. The reverse transcriptase reaction was incubated at 48°C for 30 min. The triangle in the left lane indicates the position of the primer extension product (reverse transcript) corresponding to *82p*. R.T. designates reverse transcript. The ATTG...TTA sequence in right lane was read from the sequencing gel; it was corroborated with the sequence obtained by Covarrubias and Bastarrachea (1983).

1985; Hunt and Magasanik, 1985). In enterobacteria, RNA polymerases charged with σ^{60} recognize a set of promoters with conserved -12 and -24 regions called Ntr-type promoters (Ausubel, 1984). This type of promoters includes *glnAp2*, the Nif genes promoters, and many promoters of genes involved in nitrogen metabolism. Probably all promoters activated by NR₁ or *nifA* are of Ntr type, since in an *rpoN* background activation of these regulators is not observed (Magasanik, 1982; Gottesman, 1984). These promoters lack the canonical -35 and -10 regions that characterize the 'Pribnow'-type promoters, those recognized by RNA polymerases containing the 'normal' σ^{70} factor (Hawley and McClure, 1983; Reznikoff et al., 1985).

In *E. coli*, adjacent to and upstream from *glnA*, there is a gene whose function is unknown called 'the 82-kDa protein gene' (Backman et al., 1981; Covarrubias et al., 1980; Magasanik, 1982). It is transcribed in opposite direction to *glnA*, and its promoter, here called *82p*, lies near the BEL sequence. This last circumstance allowed us to explore whether this BELE can show promoter selectivity in spite of acting bidirectionally and in a distance-independent fashion. In this work we show that *82p* is not influenced by the *glnA* BELE. We also

demonstrated that *82p* has the conserved -35 and -10 regions of 'Pribnow'-type promoters and is independent of σ^{60} . We will argue that the promoter selectivity we demonstrated for the BELE is based on this difference between *82p* and *glnAp2*.

EXPERIMENTAL AND DISCUSSION

(a) Promoter location and interactions

The primer-extension experiment shown in Fig. 1 was done to find the exact location of *82p*. The G at position -272 in the sequence shown in Fig. 2 was found to correspond to its start point. In the correct position, there is the sequence 5'-TTGTAG-N₁₆-TACAAT-3' which qualifies very well as a 'Pribnow'-type promoter (Hawley and McClure, 1983). If our assignment of this sequence to *82p* were correct, *82p* should be σ^{60} -independent. We confirmed this by showing that our wild-type strain, MX614, and strain MX818, which holds a Tn5 insertion in *rpoN*, produce equivalent amounts of 'the 82-kDa protein' mRNAs (Fig. 3, lanes a-d). In each case, the use of *82p* in mutant strains was verified by primer extension experiments (not shown).



Fig. 2. Nucleotide sequence of the *glnA* control region. This sequence was obtained by Covarrubias and Bastarrachea (1983) and later amended by Reitzer and Magasanik (1985). The start points for *82p* (-273), *glnAp1* (-114) and *glnAp2* (1) are designated T, t1 and t2, respectively; their orientation is specified by arrows. The -10 and -35 regions of *82p* are underlined with dots. The two NR₁-binding sites which conform the BEL sequence are underlined with heavy bars. The N-terminal amino acid sequence of *glnA* is shown.

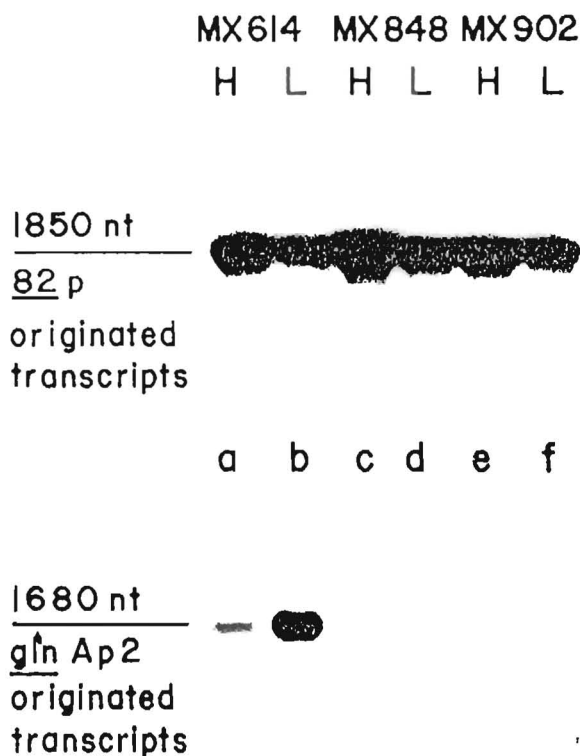


Fig. 3. Northern hybridization analysis of *82p* expression (top). A parallel experiment for the *glnAp2* expression is shown for comparison (bottom); *glnAp1*-promoted transcripts are not detected at this sensitivity. The corresponding strain and medium is indicated on top of each lane. H and L mean high and low ammonia minimal media (see below). The probe for the *82p* experiment was the oligodeoxynucleotide described in legend to Fig. 1. *glnA* transcripts were detected with an *EcoRI* fragment internal to *glnA*. Northern procedures were carried out as described by Rocha et al. (1985). The overall stringency of the Northern procedures was Tm-15C. The NN inorganic solution (Covarrubias and Bastarrachea, 1983) was supplemented with 2 mg of glucose/ml, and with either 15 mmol or 0.5 mmol of ammonium chloride per liter, to make the high and the low ammonia minimal media, respectively. All strains have been described by Osorio et al. (1984); relevant genotypes are as follows: MX614, wild type; MX848, *rpoN::Tn5*; MX902, *nrC::Tn5*. Cultures of the glutamine auxotroph MX848 contained 1 mg of glutamine/ml.

To explore the influence of the *glnA* BELE over *82p* we compared the levels of 'the 82-kDa protein' transcripts between our wild-type strain and strain MX902, which lacks NR_1 as a consequence of a Tn5 insertion in *nrC*. The absence of NR_1 completely abolishes *glnAp2* activation while it has no effect over *82p* expression (Fig. 3, lanes a, b, e and f). This demonstrates that the *glnA* BELE specifically activates *glnAp2*. We want to propose that the promoter

selectivity of this element relies on the recognition by NR_1 of those RNA polymerases which are associated to the proper σ factor.

(b) Interactions between RNA polymerase and BELE

There are several lines of evidence indicating that NR_1 and the *nifA* product can interact directly with the RNA polymerase holoenzyme. The two main classes of activation models imply either that there is a direct activator-polymerase contact, or that the activator exerts a local torsional effect on the DNA molecule (Raibaud and Schwartz, 1984). In the case of a BELE, models of the later class would require the torsional effect to be transmitted over kb of DNA, at the moment very unlikely. Furthermore, a torsional effect can transmit a limited amount of information, making it a bad, although conceivable, candidate to bear promoter selectivity. Based on the mutational data of McNeil et al. (1982) and on their own structural analysis, Drummond et al. (1986) have suggested that a highly conserved region between NR_1 and the *nifA* product, domain D, interacts directly with σ^{60} or, alternatively, with the RNA polymerase core. This can explain why NR_1 proteins apparently altered in domain D are impaired in their activation function while keeping their ability to recognize NR_1 binding sites. This also explains why NR_1 or *nifA*-dependent activation processes have not been observed in *rpoN* backgrounds. The same authors (Drummond et al., 1986) remarked that the NR_1 and the *nifA* product recognition sequences are very different and that, accordingly, they found that the helix-turn-helix DNA-binding domains of these proteins resemble each other weakly. If that remark could be stressed, it would imply that, since at high concentration the *nifA* product can substitute NR_1 's activation functions, specific DNA binding is not an absolute requirement (Ow and Ausubel, 1983). Similarly, results by Reitzer and Magasanik (1986, Table 1, line 15) indicate that, if a high molar concentration of NR_1 is provided, 30% of *glnAp2* activation is retained after the removal of all the NR_1 binding sites from the *glnA* control region. (Activation occurs to a similar extent when the two weak NR_1 binding sites proximal to *glnAp2* are left; questioning their functionality.) When the two high-affinity NR_1 binding sites that

conform the BEL sequence are moved closer to *glnAp2*, a point is reached where low-NR_I activation is lost (Reitzer and Magasanik, 1986). This point may reflect a pre requisite of a minimum DNA flexibility for the establishment of the proper activator-polymerase interactions. Extensive genetic research and the existence of a precise and efficient reconstituted in vitro system (Hirschman et al., 1985; Hunt and Magasanik, 1985) suggest that no unknown proteins participate in the activation of *glnAp2*.

(c) Conclusions

Altogether, the information discussed indicates that NR_I interacts directly with the polymerase holoenzyme. We believe that the simplest explanation for the BELE's promoter selectivity is the specific recognition of σ^{60} by NR_I. Furthermore, it could be that both promoter selectivity and enhancer-like properties are consequences of the way of interaction between NR_I (or the *nifA* product) and σ^{60} . Some of the nucleotides of the *nifH* BELE are conserved among the upstream regions of several Nif promoters (Buck et al., 1986). An 8-bp consensus sequence has been derived which presumably represents important bases recognized by the *nifA* product or homologous proteins. All these binding sites might possess the ability to mediate activation irrespective of distance and orientation. The heat-shock genes of *E. coli* are also dependent on a special σ factor, σ^{32} (Grossman et al., 1984). It is tempting to suggest that their promoters are activated by elements with enhancer-like properties and capable of promoter selectivity.

ACKNOWLEDGEMENTS

Martha Vazquez

We wish to thank Juan Miranda-Rios, Lola Cuellar, Lorenzo Segovia, Regina Basurto, Irene Castano, Alejo Pichardo and Jacqueline Mazari for their enthusiastic help, and Dr. Fernando Bastarrachea for providing bacterial strains. This work was supported by research grants PCCBBNA-020413 from Consejo Nacional de Tecnologia (Mexico) and 17/85 from Fondo de Estudios e Investigaciones Ricardo J. Zevada.

REFERENCES

- Ames, F.L.G. and Nikaido, K.: Nitrogen regulation in *Salmonella typhimurium*. Identification of an *nitC* protein-binding site and definition of a consensus binding sequence. *EMBO J.* 4 (1985) 539-547.
- Ausubel, F.M.: Regulation of nitrogen fixation genes. *Cell* 19 (1984) 5-6.
- Backman, K., Chen, Y.-M. and Magasanik, B.: Physical and genetic characterization of the *glnA-glnG* region of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 3743-3747.
- Buch, M., Miller, S., Drummond, M. and Dixon, R.: Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. *Nature* 320 (1986) 374-378.
- Bueno, R., Pahel, G. and Magasanik, B.: Role of *glnB* and *glnD* gene products in the regulation of the *glnALG* operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 164 (1985) 816-822.
- Covarrubias, A., Rocha, M., Bolivar, F. and Bastarrachea, F.: Cloning and physical mapping of the *glnA* gene of *Escherichia coli* K-12. *Gene* 11 (1980) 239-251.
- Convarrubias, A. and Bastarrachea, F.: Nucleotide sequence of the *glnA* control region of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 190 (1983) 171-175.
- Drummond, M., Whitty, P. and Wootton, J.: Sequence and domain relationships of *nitC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to other regulatory proteins. *EMBO J.* 5 (1986) 441-447.
- Gottesman, S.: Bacterial regulation: global regulatory networks. *Annu. Rev. Genet.* 18 (1984) 415-441.
- Grossman, A.D., Erickson, J.W. and Gross, C.A.: the *hipR* gene product of *E. coli* is a σ factor for heat-shock promoters. *Cell* 38 (1984) 383-390.
- Hawley, D.K. and McClure, W.R.: Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucl. Acids Res.* 11 (1983) 2237-2255.
- Hirschman, J., Wong, P.-K., Sei, K., Keener, J. and Kustu, S.: Products of nitrogen regulatory genes *nitA* and *nitC* of enteric bacteria activate *glnA* transcription in vitro: evidence that the *nitA* product is a σ factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 7525-7529.
- Hunt, T.P. and Magasanik, B.: Transcription of *glnA* by purified *Escherichia coli* components: core RNA polymerase and the products of *glnF*, *glnG*, and *glnL*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1985) 8453-8457.
- Leon, P., Romero, D., Garciarubio, A. Bastarrachea, F. and Covarrubias, A.: Glutamine synthetase-constitutive mutation affecting the *glnALG* upstream promoter of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 164 (1985) 1032-1038.
- MacNeil, T., MacNeil, D. and Tyler, B.: Fine-structure deletion map and complementation analysis of the *glnA-L-G* region in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 150 (1982) 1302-1313.
- Magasanik, B.: Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 16 (1982) 135-168.
- Ninfa, J.A. and Magasanik, B.: Covalent modification of the *glnG* product, NR_I, by the *glnL* product, NR_{II}, regulates the transcription of the *glnALG* operon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 5909-5913.

- Osorio, A.V., Servin-Gonzalez, L., Rocha, M., Covarrubias, A. and Bastarrachea, F.: *cis*-dominant, glutamine synthetase constitutive mutations of *Escherichia coli* independent of activation by the *glnG* and *glnF* products. *Mol. Gen. Genet.* 194 (1984) 114-123.
- Ow, D.W. and Ausubel, F.M.: Regulation of nitrogen metabolism genes by *nifA* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature* 301 (1983) 307-313.
- Pahel, G., Rothstein, D.M. and Magasanik, B.: Complex *glnALG* operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 150 (1982) 202-213.
- Reitzer, L.J. and Magasanik, B.: Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 1979-1983.
- Reitzer, L.J. and Magasanik, B.: Transcription of *glnA* in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. *Cell* 45 (1986) 785-792.
- Reznikoff, W.S., Siegle, D.A., Cowing, D.W. and Gross, C.A.: The regulation of transcription initiation in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 19 (1985) 355-387.
- Rocha, M., Vazquez, M., Garciarubio, A. and Covarrubias, A.: Nucleotide sequence of the *glnA-glnL* intercistronic region of *Escherichia coli*. *Gene* 37 (1985) 91-99.

Communicated by F. Bolivar.