

Tesis de maestría,

*Investigación Biomédica*

"Dos promotores para el gen estructural de  
Glutamino Sintetasa en E.coli.",

de Alejandro Garcíarrubio, *García*

dirigida por Alejandra A. Covarrubias.

*1985*

*GRA  
UNAM  
MIBE  
1985*

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



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.

Con todo mi cariño

a "mis familias", las que adoro,

en especial

a los que estando t n lejos están tan cerca:  
Angelica, Arturo, Arturo, Hilda, Leonor y Mario,

y a Ale, mi madre academica, con el mas rotundo  
complejo de Edipo del que soy capaz.

 Me enloquecen las flores amarillas,  
el minesang, glnA,  
la delicada fusión de la c sida con el sloka,  
y t !

### Agradecimientos.

Por su participación en mi formación y en ésta tesis, estoy agradecido, en distintos grados y maneras, pero en todo caso, sinceramente agradecido, a los integrantes de:

el laboratorio III, el mejor laboratorio de CEFINI, CEFINI, el mejor centro que ha habido en México, México, el mejor país de La Tierra, y La Tierra, el mejor planeta que yo haya tenido la dicha de compartir.

Porque quizás esta forma sintética de agradecimientos no les transmita adecuadamente lo que siento, quiero precisar que agradezco a Fernando Bastarrachea, Xavier Soberón y sus discípulos, su amistad y colaboración, a Paty Vázquez y Lola Cuellar, su oportunísima e infalible ayuda, y a Rafael Palacios, por tener en mí una fé que, aunque yo no entienda porque la merezco, quisiera poder mantener.

Obertura.

Quiero iniciar ésta tesis con unos versos en donde se ejemplifica como la curiosidad es capaz de impulsarnos hacia esfuerzos tales, que ciertamente parecerían contrarios a las mas usuales expectativas de nuestra condición humana:

    Todita la noche anduve  
            rondando tu jacalito,  
pa' ver  
            si te podia ver  
                    por algún agujerito.

## PREFACIO

Dentro del contexto del metabolismo nitrogenado en enterobacterias, los esfuerzos de nuestro laboratorio se han dirigido al esclarecimiento de la apasionante regulación del operón glnALG de Escherichia coli. Esta tesis representa una pequeña parte de esos esfuerzos. El trabajo que se presentará trata de la transcripción del primer gen de dicho operón, glnA, el cual codifica para la enzima glutamino sintetasa (GS). Esta enzima cataliza la única reacción por la cual se puede sintetizar el aminoácido glutamina en E.coli

Como se verá más claramente en la "Introducción", la importancia de la reacción catalizada por GS hace -- que esta enzima esté barrocamente regulada tanto en su actividad por molécula como en su misma síntesis.

La presente tesis incluye cinco secciones además de esta. La "Introducción" transcrita aquí directamente de la tesis doctoral de mi tutora, Alejandra Covarrubias, es una excelente descripción de las características estructurales y funcionales de los sistemas de regulación de GS tal y como se conocían en la época en -- que iniciamos el trabajo aquí presentado.

En la sección de "Antecedentes" se hace una recapitulación de aquella información más directamente relacionada con el trabajo de esta tesis. Allí se comentan también algunas de las virtudes y defectos de la me

metodología empleada.

La sección de "Resultados" es en realidad un artículo generado en nuestro laboratorio. Como tal, es el resultado del trabajo de varios y no de una sola persona. En nuestro grupo nadie respeta los proyectos de los demás; continuamente unos y otros insisten en sugerir experimentos, en aportar otras interpretaciones y en brindar todo tipo de ayudas y colaboraciones. Así es que "Resultados" lo hizo "Fuenteovejuna"; solo puedo decir que también yo participé.

Entre las aportaciones novedosas del artículo incluido, cabe mencionar las siguientes:

a) Demostración de la existencia de dos promotores para el gen glnA (PglnA<sub>1</sub> y PglnA<sub>2</sub>) y localización de los mismos.

b) Un análisis de la forma en la que estos promotores responden a cambios en el medio; el cual permitió concluir que, conforme la disponibilidad del nitrógeno disminuye respecto a la del carbono, la expresión a partir del promotor cercano a glnA (PglnA<sub>2</sub>) aumenta mientras que aquella a partir del promotor lejano (PglnA<sub>1</sub>) disminuye.

c) Un análisis del papel regulador de tres proteínas (los productos de los genes glnF, glnG y glnL, ampliamente descritos en la "Introducción" y otras secciones), cuyas funciones habían sido definidas a partir de sus efectos sobre la síntesis de GS, pero cuyos pape

les en este artículo se consideran analizando sus efectos sobre la transcripción a partir de los dos promotores de glnA. Este análisis condujo a las siguientes conclusiones:

I) Los productos de los genes glnF y glnG se requieren para inducir al promotor PglnA<sub>2</sub>. En particular, este promotor no da origen a una transcripción detectable en ausencia del producto de glnG (también conocido como NR<sub>1</sub>).

II) El producto de glnL parece antiactivar la expresión a partir de PglnA<sub>2</sub>. En ausencia de este producto la expresión a partir de PglnA<sub>1</sub> permanece inducida por los productos de glnF y glnG en condiciones de exceso de nitrógeno, contrariamente a lo que sucede en una cepa silvestre.

III) El producto de glnG reprime la transcripción a partir del promotor PglnA<sub>1</sub>. Tal represión es mayor en condiciones de limitación de nitrógeno. Esto es opuesto a lo que antes se había supuesto: que el producto de glnG tenía un efecto represor sobre la expresión de glnA en condiciones de exceso de nitrógeno.

d) Un análisis muy preliminar de los efectos de una mala fuente de carbono sobre la expresión a partir de los dos promotores de glnA. De éste surgen dos datos interesantes. El primero es que, en condiciones de exceso de nitrógeno y limitación de carbono la proporción de las expresiones de PglnA<sub>1</sub> y PglnA<sub>2</sub> está notablemente aumentada; lo suficiente como para hacer que la trans-



cripción iniciada en PglnA<sub>1</sub> tenga un papel significativo en la síntesis de GS. El segundo dato interesante es -- que, en una cepa glnF<sup>-</sup>, la expresión a partir de ambos promotores se aumenta drásticamente en exceso de nitrógeno y limitación de carbono. Este dato es muy difícil de integrar con nuestra concepción actual de la regulación de glnA, sin embargo, indica claramente que puede haber una expresión importante a partir de PglnA<sub>2</sub> en ausencia del producto de glnF, la cual en ningún caso se observa en la ausencia del producto de glnG.

A la sección de "Resultados" le sigue una de -- "Discusión". En esta sección, por un lado, se tratará de eliminar, mediante ciertos argumentos de lógica, algunas de las interpretaciones a nuestros datos que consideramos erróneas y, por otro lado, se ampliarán algunas de las conclusiones y elucubraciones presentadas en la discusión incluida en el artículo.

## INTRODUCCION

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

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

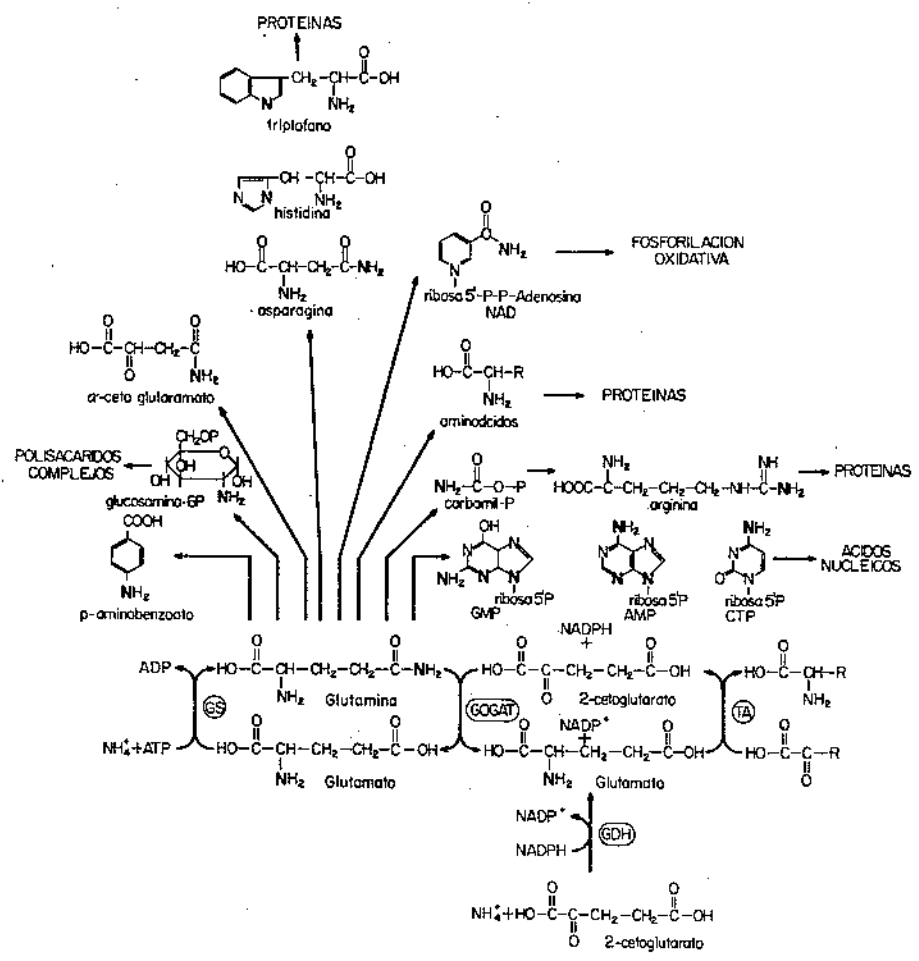


FIGURA 1

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

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

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

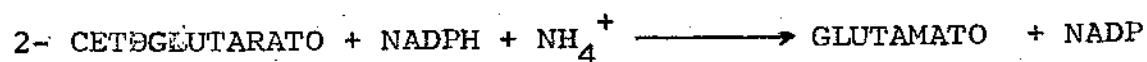
Glutamina, glutamato y aspartato son compuestos fácilmente interconvertibles a través de las siguientes reacciones:

1. 
$$\text{GLUTAMATO} + \text{NH}_4^+ + \text{ATP} \xrightarrow{\text{GS}} \text{GLUTAMINA} + \text{ADP} + \text{Pi}$$
2. 
$$\text{GLUTAMINA} + 2\text{-CETOGLUTARATO} + \text{NADPH} \xrightarrow{\text{GOGAT}} 2 \text{ GLUTAMATO} + \text{NADP}$$
3. 
$$\text{GLUTAMATO} + \text{OXALOACETATO} \xrightleftharpoons{\text{TRANSAMINASA}} \text{ASPARTATO} + 2\text{-CETOGLUTARATO.}$$

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

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

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



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

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

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

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

Durante la introducción de ésta tesis me limitaré a tratar

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

#### BIOQUIMICA DE GS

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



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

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

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

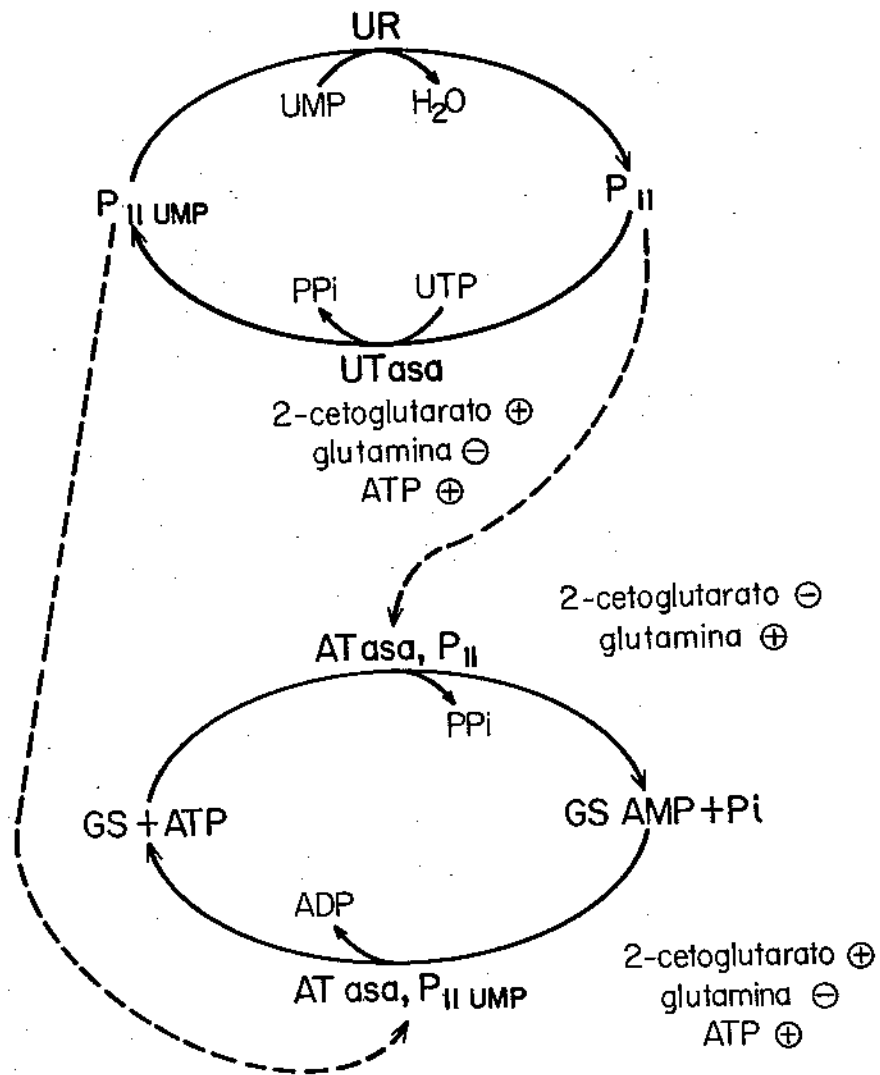


FIGURA 2

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

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

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

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

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

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

#### FISIOLOGIA DE LA SINTESIS DE GS

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

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

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

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

#### GENETICA DEL SISTEMA gln

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

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

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



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

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

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

glutamina.

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

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

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

Los fenotipos  $GlnR$ ,  $Ntr^-$  pueden resultar de mutaciones espontáneas, o bien de mutaciones debidas a la inserción del fago  $\mu$  o de los transposones  $Tn_{10}$  ó  $Tn_{\Sigma}$  (26,28,35,36). También se han descrito mutaciones en glnG que resultan en un fenotipo  $Gln^-$  y, las cuales se distinguen de mutaciones en glnA por el hecho de que casi todas las revertantes espontáneas de estas mutantes, seleccionadas por su capacidad para crecer en ausencia de glutamina, presentan los fenotipos  $GlnR$  y  $Ntr^-$  (37,38).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TABLA 1

Características de mutaciones en los genes del sistema gln

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

(a) GH: Glucosa + Histidina; GGln: Glucosa + Glutamina; GN: Glucosa + NH<sub>4</sub><sup>+</sup>  
GNGln: Glucosa + NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + Glutamina; HNGln: Histidina + NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + Glutamina.

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

(c) ND: Actividad no detectable.

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

TABLA 2

Productos y localización de los genes del sistema gln.

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

- (a) La localización de cada gene está dada en minutos con respecto al cromosoma de Escherichia coli K12.
- (b) GS; Glutamina sintetasa; pL: producto de glnL; pG: producto de glnG; pF: producto de glnF; P<sub>11</sub>: proteína P<sub>11</sub>; UTasa: Uridiltransferasa; ATasa: Adeniltransferasa.

gar a un fenotipo GlnR Ntr<sup>-</sup> (47).

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

#### LA ORGANIZACION DE LOS GENES glnA, glnL y glnG.

La clonación de la región glnA del cromosoma de E. coli y su análisis con endonucleasas de restricción (23,43,49), así como los estudios de complementación de mutaciones en la misma región del cromosoma con plásmidos conteniendo fragmentos de DNA de diferentes tamaños provenientes del segmento originalmente clonado, han demostrado que los genes glnA, glnL y glnG se encuentran contiguos en una región de aproximadamente 4 500 pb.

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

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



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

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

Esta hipótesis se ve apoyada por estudios de la expresión de glnG en E. coli, donde este gene se fusionó al gene lacZ que carece de promotor, de tal manera que la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, medida en diferentes condiciones y en diferentes mutantes, refleja la regulación a la cual se encuentra sometido glnG. Los resultados de tal estudio confirmaron que el producto de glnG funciona tanto como activador como represor de la transcripción de

glnA y, por otro lado, que la transcripción que se inicia en el promotor de glnA continúa hasta glnG (51). A partir de este mismo tipo de estudios se han reportado datos que sugieren la presencia de un segundo promotor (47) y éstos se ven apoyados por resultados que se presentan en este trabajo. Las actividades de  $\beta$ -galactosidasa, provenientes de las fusiones de glnG con lacZ, obtenidos en diversas condiciones de disponibilidad de nitrógeno, sugieren que la transcripción iniciada a partir del segundo promotor está sujeta a represión por el producto de glnG en condiciones en que este producto se encuentra en el estado que se requiere para la activación de glnA (51). Así pues, se sugiere que el producto de glnG está presente en, relativamente, altas concentraciones en células crecidas en un medio limitado de nitrógeno y, en este caso la transcripción se inicia en el promotor de glnA; por otro lado, en células crecidas en un medio con una fuente pobre de nitrógeno y un exceso de glutamina y amonio, este producto se encuentra en concentraciones bajas y su transcripción se inicia a partir del segundo promotor. Esta baja concentración del producto de glnG parece, sin embargo, suficiente para reprimir completamente en el promotor de glnA y, en su forma activa, también resulta suficiente para activar la transcripción a partir del mismo promotor; sin embargo, parece ser insuficiente para activar la expresión de hut.

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

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

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

## ANTECEDENTES

Parte de la información que se presentará en esta sección ya ha sido dada en la "Introducción", sin embargo se repetirá aquí por cuestiones de énfasis. Para favorecer la claridad se recurrirá al uso de incisos numerados en donde una afirmación es seguida de su justificación y en ocasiones de alguna aclaración o corolario.

1) Existe un transcrito que incluye los genes -- glnA, glnL y glnG. Inserciones en glnA son polares sobre glnL y glnG ya que disminuyen en cis la transcripción de estos genes (20,28,51,58,0)

2) Cierta cantidad de la transcripción iniciada al principio de glnA no continua hasta el final de glnG. Usando un sistema para medir transcripción (una construcción con Mud1lac insertado en el gen cuya transcripción se desea medir) se observa que la transcripción de glnA es más de cinco veces superior a la de glnG (51,58,0)

3) Existe un promotor entre glnA y glnG. Una inserción en glnA no elimina la transcripción de glnG. Además, ésta transcripción residual está regulada en una forma distinta a la de glnA (47,51,58,0)

4) Resumiendo los incisos anteriores (1,2 y 3), se concluye que sólo una parte de la transcripción iniciada en glnA continúa hasta glnG y que existe un promotor entre estos dos genes. Actualmente se sabe con precisión que dicho promotor se encuentra entre glnA y glnL (86,87). Los transcritos conocidos del operón son, por orden de --

abundancia, TglnA>>TglnALG>TglnLG (3,51).

5) El gen glnA está regulado por la disponibilidad de nitrógeno. Las actividades de GS en limitación de nitrógeno son de 2.0 UGS (unidades específicas de GS= un micromol de gama-glutamihidroxamato/min/mg de proteína), mientras que en exceso de nitrógeno son de 0.2 UGS (3,5, 0).

6) El producto de glnF es parte del activador de glnA. Una cepa glnF<sup>-</sup> tiene actividades de GS menores a 0.01 UGS en ambas condiciones de nitrógeno (amonio 15mM y 0.5 mM) (20,31,35,0).

7) El producto de glnG es parte del activador de glnA. Una cepa glnG<sup>-</sup> tiene actividades de GS menores a 0.08 UGS en ambas condiciones de nitrógeno.

8) El producto de glnG es también un represor de glnA. Cuando a una cepa glnF<sup>-</sup> (carente de activador funcional) se le añade una mutación que elimina al producto de glnG las actividades de GS se elevan, de menos de 0.01 UGS, hasta alrededor de 0.05 UGS. Esto es cierto para ambas condiciones de nitrógeno (26,28,35,36,37,38,0).

9) El efecto activador del producto de glnG es mayor que su efecto represor. Las actividades de GS, en ambas condiciones de nitrógeno, son inferiores en una cepa glnG<sup>-</sup> que en una cepa silvestre (26,36).

10) El producto de glnL disminuye la transcripción de glnA en condiciones de exceso de nitrógeno. Una cepa glnL<sup>-</sup> tiene actividades normales de GS en limitación de nitrógeno, pero en exceso de nitrógeno las actividades de

GS están elevadas a más de 1.5 UGS en lugar de las normales de 0.2 UGS.

11) El producto de glnL recibe información de la proteína P<sub>II</sub>. Algunas mutantes en el gen que codifica a P<sub>II</sub> tienen el mismo fenotipo que mutaciones en glnL. Por otro lado, la mutación glnB3, que causa baja expresión de glnA, no se manifiesta en presencia de una mutación en glnL (3,25).

12) Todos los efectos regulatorios antes mencionados requieren de la presencia del producto de glnG. Mutaciones en este gen son epistáticas a mutaciones en los genes glnF, glnL, glnB y glnD (3,0).

13) Resumiendo, glnA se induce en limitación de nitrógeno mediante los productos de glnF y glnG; en exceso de nitrógeno ésta expresión disminuye por el efecto del producto de glnL y, de alguna forma, por P<sub>II</sub>. El producto de glnG es un represor de glnA pero no se puede concluir si ésta represión es constitutiva o en qué condición es mayor. (Magasanik adoptó la hipótesis más simple: que el producto de glnG reprime en exceso de nitrógeno).

Una mutación (gln76) la cual provoca una expresión alterada de glnA, tiene especial relevancia para ésta tesis por lo cual merece un tratamiento aparte. Esta mutación fué aislada en el laboratorio de Fernando Bastarrachea por Aurora Osorio quien hizo una profunda caracterización de la misma (88), posteriormente, fue transferida a un plásmido por David Romero lo cual permitió a Patricia

Figura \*.- Análisis de cepas con gln76

CEPA	GENOTIPO	UGS en		CONCLUSIONES	
		↓N	↑N		
A	MX902	<u>glnG</u> <sup>-</sup>	0.06	0.04	<u>gln76</u> hace a un promotor más de 30 veces más fuerte.
	MX927	<u>glnG</u> <sup>-</sup> <u>gln76</u>	4.0	2.0	
B	MX931	<u>gln76</u> <u>glnF</u> <sup>-</sup>	0.15	0.5	<u>glnG</u> reprime; más en ↓N que en ↑N
	MX982	<u>gln76</u> <u>glnF</u> <sup>-</sup> <u>glnG</u> <sup>-</sup>	4.0	1.8	
C	MX929	<u>gln76</u>	2.0	0.6	Se requiere <u>glnG</u> para activar en ↓N.
	MX931	<u>gln76</u> <u>glnF</u> <sup>-</sup>	0.15	0.5	
D	MX982	<u>gln76</u> <u>glnG</u> <sup>-</sup> <u>glnF</u> <sup>-</sup>	4.0	1.8	En ausencia de <u>glnG</u> <sup>-</sup> , <u>glnF</u> no activa; <u>glnG</u> <sup>-</sup> es epistático sobre <u>glnF</u> <sup>-</sup> .
	MX927	<u>gln76</u> <u>glnG</u> <sup>-</sup>	4.0	2.0	
E	MX614	<u>Silvestre</u>	2.0	0.2	El aumento en la fuerza de promotor (conclusión de A) no se observa en ↓N; se observa un poco en ↑N.
	MX929	<u>gln76</u>	2.0	0.6	

↓N = glucosa 0.290, 0.5 mM NH<sub>4</sub>Cl

↑N = glucosa 0.290, 15 mM NH<sub>4</sub>Cl

León localizar la mutación por secuencia, así como estudiar los efectos de ésta mutación en un sistema más o menos aislados (89). Siguiendo con la numeración anterior, enunciaré algunas de las características de ésta mutación y de los resultados que de ella se concluyen.

14) gln76 es una mutación en la región de control de glnA. Afecta la expresión de glnA, sólo actúa en cis, y está ligada 100% a glnA por cotransducción. No es una mutación en la región que codifica a GS, ya que no afecta la actividad específica medible de ésta en condiciones de limitación de nitrógeno (88). (La secuencia de la mutación ha demostrado que la mutación cae 198 pares de bases antes del codón de iniciación de GS (89)).

Esta mutación fué tan relevante para ésta tesis porque un intenso esfuerzo para explicar las actividades de GS de las cepas que llevan esta mutación en distintos contextos genéticos (con todos los reguladores presentes o en ausencia del producto de glnF o el de glnG o ambos), nos forzó a implicar la existencia de dos promotores para la expresión de glnA así como inferir algunos aspectos de la regulación de ambos promotores.

En la figura \* se comparan por grupos las actividades de GS de distintas cepas y junto a cada comparación se anotan conclusiones que de ella se derivan.

15) La mutación gln76 aumenta la fuerza de un promotor. En ausencia de inducción y represión las actividades de GS son extremadamente altas en una cepa que



lleva la mutación gln76 (se concluye de A).

16) Como en una silvestre, una cepa con gln76 sigue siendo reprimida por el producto de glnG. Se observa además que el producto de glnG reprime más en limitación que en exceso de nitrógeno, si bien reprime en ambas condiciones. (conclusion B; ver también inciso 8).

17) Al igual que en una cepa silvestre, en una cepa con la mutación gln76 el producto de glnG tiene un papel activador en condiciones de limitación de nitrógeno (conclusión C; ver también inciso 6). El producto de glnF tiene un efecto mínimo en condiciones de exceso de nitrógeno.

18) Como en una cepa silvestre, en una cepa con la mutación gln76, el producto de glnG es parte del complejo activador. (conclusión D, ver también inciso 7). En presencia, como en ausencia, de la mutación gln76, la pérdida del producto de glnG tiene un efecto epistático sobre la ausencia del producto de glnF.

19) Resumiendo, la mutación gln76 hace fuerte a un promotor. Por otro lado, el que los productos de glnF y glnG activen en limitación de nitrógeno, y que el producto de glnG reprima, sigue siendo válido en presencia de ésta mutación.

20) El efecto de aumento de la fuerza de promotor ocasionado por gln76, de alguna forma, no se manifiesta en limitación de nitrógeno cuando todos los reguladores están presentes (conclusión E). Este dato es sumamente difícil de explicar con un sólo promotor, ya que la fuer-

za de un promotor es una propiedad intrínseca del mismo, es decir una propiedad que no depende de la regulación, y por lo tanto un cambio en esa fuerza debe manifestarse bajo cualquier condición metabólica. Además, gln76 aumentó la fuerza del promotor mutado al menos 30 veces (conclusión de A).

La explicación más viable al por qué no se observa el aumento de fuerza del promotor en limitación de nitrógeno es que, precisamente en ésta condición, ese efecto es ocultado por otra transcripción de glnA de mayor proporción. Esto es lo mismo que decir que en limitación de nitrógeno se usa principalmente un promotor que no es el mutado. De las conclusiones C y D es obvio que hay un promotor que se induce por los productos de glnF y glnG en limitación de nitrógeno. Por otro lado, se deduce de la conclusión B que hay un promotor que se reprime mayormente en esa misma condición. Suponiendo que estos dos promotores no son el mismo y que la mutación gln76 afectó la fuerza del que es reprimido por glnG, es fácil explicar esta paradoja. Es más, las actividades de GS en distintas condiciones y cepas, permiten obtener valores numéricos para la fuerza de los promotores así como los rangos de activación y represión. Con tales valores se puede modelar adecuadamente tanto la regulación de las cepas que llevan gln76 como la de cepas que llevan una región de control silvestre.

21) Resumiendo, se sugiere que existen, al menos en las cepas con gln76, dos promotores a partir de los -- cuales se expresa glnA. Uno de ellos es activado por los productos de glnf y glnG (ésta activación es mayor en li mitación de nitrógeno, quizás porque en exceso es impedi da por el producto de glnL). El otro promotor es reprimi do por el producto de glnG en ambas condiciones, pero ma yormente en limitación de nitrógeno.

22) Hay en la región de control de glnA tres se-- cuencias que parecen promotores por su homología con el - promotor consenso (90).

De lo hasta ahora mencionado, la información más relevante se encuentra resumida en los incisos 4, 13 y 21. Con ésto termina la presentación de los antecedentes bio lógicos que dieron un marco conceptual al desarrollo del proyecto.

Ahora comentaré un poco respecto a la metodología. Buena parte de los resultados que se presentan en el artí culo incluido fueron obtenidos mediante el uso de -- "Northern's". Esto consiste en separar una población de RNAs mediante hacerlos migrar electroforéticamente por -- una matriz porosa (agarosa o acrilamida) la cual opone -- más resistencia al movimiento de RNAs grandes que al de -- pequeños. Como lo que interesa es separar de acuerdo a - las longitudes (número de nucleótidos) de los RNAs, se in cluye en la matriz un agente desnaturalizante que impide la formación de estructuras secundarias en el RNA (91).

Posteriormente se transfieren los RNAs a un soporte sólido (papel de nitrocelulosa) en donde la separación lograda por la electroforesis se conserva. Sobre éste soporte sólido se detectan los transcritos deseados mediante hibridización in situ con un oligonucleótido complementario (un probador; en nuestro caso algún fragmento específico de DNA) el cual está marcado radioactivamente o de alguna otra forma.

Este método es sumamente útil ya que permite detectar directamente transcritos específicos. Entre la información que se puede obtener está el tamaño de los transcritos, la cadena de la que se copian, sus sitios de inicio y terminación, así como su abundancia. A diferencia de otras metodologías alternativas, los Northern's son fieles a la abundancia de los transcritos. Esto es, dados transcritos distintos, pero los cuales tengan la misma extensión de homología con el probador, este método los detectará con señales proporcionales a su abundancia. Esto no sucede con métodos como el mapeo por S1 o la extensión de primero, pues en éstos las regiones en las cuales los transcritos difieren, tienen efectos sobre la detección de los mismos.

Por otro lado, el mapeo por S1 o la extensión de primero pueden determinar los extremos de un transcrito con una precisión de más o menos un nucleótido, mientras que la máxima precisión de un Northern es de aproximadamente veinte nucleótidos. Es decir, los Northern's son superiores para realizar estudios fisiológicos mientras

los otros dos métodos tienen una gran precisión para análisis estructurales.

Debo advertir que, a continuación, me propongo -- dar un tratamiento pseudo matemático de un aspecto que es necesario tener en mente. se refiere a un artificio inherente a la cuantificación de RNAs mensajeros en bacterias, el cual también está presente en experimentos de tipo -- Northern. Al final de estas ecuaciones refrasearé el argumento en lenguaje cotidiano.

Empezaré por definir algunos términos:  $R_x/R_t$  significa el cociente de una población  $x$  de RNAs respecto al total de RNA ( $R_t$ ) contenido en una preparación. Así --  $R_r/R_t$  quiere decir la proporción de RNA ribosomal en una preparación. De igual forma se define la proporción de -- RNAs mensajeros ( $R_m/R_t$ ) o de un transcrito  $i$  ( $R_i/R_t$ ). La abundancia relativa de dos poblaciones ( $i, j$ ) de RNAs está dada por  $(R_i/R_t)/(R_j/R_t) = R_i/R_j$ .

Ahora bien, se sabe que en E.coli  $R_r/R_t$  es mayor a 97/100 (92). Nadie ha obtenido directamente el valor -- de  $R_m/R_t$ , pero es necesariamente menor a  $(R_t - R_r)/R_t$  y por lo tanto menor a 3/100. De la abundancia de los ribosoma -- les obtenida del valor  $R_r/R_t$  se concluye que  $R_m/R_t$  depende fuertemente de  $R_r/R_t$ . Se sabe que el valor de  $R_r/R_t$  -- cambia según las condiciones de crecimiento y según la fa -- se de crecimiento del cultivo (92). Esto implica que --  $R_m/R_t$  es distinto para dos cultivos diferentes. Desgra -- ciadamente no hay forma de medir el  $R_m/R_t$  de un cultivo.

Esto tiene serias implicaciones pues, cuando se quieren comparar los niveles de un mRNA específico ( $R_i$ ) entre dos cultivos ( $y, z$ ), el valor importante está dado por  $(R_i/R_m)_y / (R_i/R_m)_z$  y no por  $(R_i/R_t)_y / (R_i/R_t)_z$  el cual es el valor que se obtiene por Northern's, mapeo por S1 o cualquier método alternativo. Esto significa que no se puede comparar directamente, de un cultivo a otro, los niveles de un mRNA específico.

Sin embargo tal comparación se puede establecer en nuestro caso particular, suponiendo, no sin riesgo, que la actividad específica de GS para cada cultivo  $x$  es proporcional a  $(RA/R_m)_x$ , donde RA representa a los mRNAs completos que llevan glnA. Puesto que el nivel de detección de los transcritos de glnA, dados por el valor  $RA/R_t$ , no son proporcionales a la actividad de GS se debe obtener un factor de corrección  $FC_x$  para cada cultivo  $x$ :  $FC_x = (UGS)_x / (RA/R_t)_x$ . Con este factor ya podemos comparar los niveles de los transcritos de glnA de dos cultivos:  $(RA)_x / (RA)_y = FC_x (RA/R_t)_x / FC_y (RA/R_t)_y$ . En ésta tesis se demuestra que hay dos transcritos principales para glnA. La comparación de los niveles de estos transcritos entre dos cultivos ( $x, y$ ) se realiza así:

$$(RA_1)_x / (RA_1)_y = FC_x (RA_1/R_m)_x / FC_y (RA_1/R_m)_y;$$

$$(RA_2)_x / (RA_2)_y = FC_x (RA_2/R_m)_x / FC_y (RA_2/R_m)_y.$$

Es importante destacar que el valor de

$(RA_1/R_m)_x = (RA_1/R_m)_x / (RA_2/R_m)_x$  es equivalente a  $(RA_1/R_t)_x / (RA_2/R_t)_x$  ya que  $(R_m/R_t)_x$  es una constante del cultivo  $x$ . Dado que  $(RA_1/R_t)_x$  y  $(RA_2/R_t)_x$  son datos

que se obtienen de un Northern, entonces la relación - -  
( $RA_1/RA_2$ )x para un cultivo se obtiene directamente. -  
Además, ésta relación se puede comparar de un cultivo a  
otro sin otras consideraciones.

En resumen, los diferentes niveles de RNA riboso-  
mal en una preparación de RNA total generan un artificio  
cuantitativo en la detección de RNAs mensajeros específi-  
cos. Sin embargo, se pueden estimar los niveles reales  
de un transcrito de glnA, (en unidades arbitrarias) me-  
diante considerar la cantidad de GS que tal transcrito -  
genera. Esto permite comparar los niveles de los trans-  
critos en distintas condiciones de cultivo. Por otro la-  
do, la proporción entre dos transcritos en un cultivo se  
puede comparar directamente con la proporción correspon-  
diente de esos dos transcritos en otro cultivo. En el -  
artículo incluido, esto se usó para hacer las comparacio-  
nes necesarias, aunque no en una forma cuantitativa.

## OBJETIVOS

Nuestro objetivo más general es el entender la lógica de la regulación del operón glnALG. Partiendo de la suposición de que dicha lógica debe estar escrita al nivel de los transcritos independientes del operón, se planteó como objetivo inmediato el analizar tales transcritos así como las condiciones y los efectores que modifican su síntesis y/o procesamiento. Inicialmente, se decidió estudiar los transcritos que contuvieran a glnA; la existencia de dos de los cuales, Tglna y TglnALG, se infería por evidencias ya mencionadas.



Running title: The glnA gene from E. coli is expressed from  
two functional promoters.

The glutamine synthetase gene from Escherichia coli  
is expressed from two functional promoters which are  
differentially regulated.

{Nitrogen regulation/glutamine synthetase/Northern  
blots/promoters/transcription initiations.}

Alejandro Garcíarrubio<sup>+</sup>, Mario Rocha<sup>+</sup>, Patricia León<sup>+</sup>,  
Fernando Bastarrachea<sup>‡</sup> and Alejandra A. Covarrubias<sup>+\*</sup>

Centros de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno<sup>+</sup>  
y sobre Ingeniería Genética y Biotecnología,<sup>‡</sup> Universidad  
Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A,  
Cuernavaca, Morelos, México.

\* To whom reprints requests should be sent.

## ABSTRACT

The glutamine synthetase of enterobacteria is one of the enzymes whose synthesis and regulation is best characterized. In *E. coli*, its structural gene, glnA, along with two regulatory genes, glnL and glnG, form the complex operon glnALG. The products of glnL and glnG, together with the product of the glnF gene, control the expression of various genes involved in nitrogen utilization including the glnALG operon. In this work we report that there are two functional promoters for glnA expression which are differentially regulated by the nitrogen availability and which also respond to the carbon metabolism. One of these promoters (PglnA<sub>2</sub>) requires the products of the glnF and glnG genes for activation. However, there can be expression from this promoter at very low rate by the sole action of the glnG product (NR<sub>I</sub>). The other promoter (PglnA<sub>1</sub>) is repressed by NR<sub>I</sub>. We further show that NR<sub>I</sub> binds with high specificity to a restriction fragment containing PglnA<sub>1</sub>. The precise locations of the glnA transcription initiation sites were determined. Some aspects of glnA regulation are discussed from the viewpoint of a two promoters model.

## INTRODUCTION

The synthesis of glutamine is the first step in a highly branched biosynthetic pathway. A high proportion of the intracellular nitrogen is assimilated as glutamine and then distributed to a large number of compounds such as amino acids, nucleotides, amino sugars and cofactors. In view of the central role of glutamine in the nitrogen metabolism it is evident that the enzyme glutamine synthetase (L-glutamate: ammonia ligase, EC 6.3.1.2.) should be a strategic target for cellular control. Studies of this enzyme in Escherichia coli and other gram-negative bacteria have shown that the catalytic activity and the level of this enzyme are subjected to a highly complex and rigorous control system. In addition to feedback inhibition by several end products of glutamine metabolism, the glutamine synthetase activity is regulated by the covalent addition of AMP on each of its 12 subunits through a complex bicyclic cascade system (Stadtman and Ginsburg, 1974; Stadtman et al, 1980). Furthermore, this enzyme is one of several proteins whose synthesis is regulated by the availability of nitrogen in the growth medium. Under nitrogen limitation glutamine synthetase is derepressed. Growth in conditions of nitrogen excess causes repression by about 10-20 fold (Woolfolk et al, 1966; Tyler, 1978).

The intracellular levels of glutamine synthetase also seem to be affected by carbon and/or energy limitation (Tyler, 1978). Prusiner et al have suggested that this enzyme is regulated by CAP and cAMP; however, the effect of a cya<sup>-</sup> mutation on the glutamine synthetase levels are small compared to that observed for more classical catabolite sensitive genes (Prusiner et al, 1972).

The biosynthesis of this enzyme and a number of other gene products involved in the transport and/or utilization of various nitrogen sources such as ammonia, proline, arginine or histidine are under the control of the Ntr system whose effectors are the products of the regulatory genes glnF, glnL and glnG (reviewed

by Magasanik, 1982; Servín-González and Bastarrachea, in press). Evidence from different laboratories have helped to establish the existence of a complex glnALG operon (Pahel et al, 1982; Rothstein et al, 1980; Guterman et al, 1982; MacNeil et al, 1982b; Alvarez-Morales et al, 1984). It has been proposed that under nitrogen limiting conditions the products of glnF and glnG activate transcription from the glnA promoter through glnA, glnL and glnG. Under nitrogen excess conditions, transcription of glnL and glnG can also be initiated at a second promoter, located between glnA and glnL (Pahel et al, 1982; Guterman et al, 1982; MacNeil et al 1982a). Transcription initiated at this promoter is subjected to repression by the glnG product ( $NR_I$ ) (Reitzer and Magasanik, 1983; Alvarez-Morales et al, 1984). Also it has been proposed that  $NR_I$  has negative effects on glnA expression by itself or in combination with the glnL product (Pahel et al, 1982; Ueno-Nishio et al, 1983; Krajewska-Gryniewicz and Kustu, 1983).

The products of three other genes, glnB, glnD and glnE are modulators of glutamine synthesis through the adenylylation-deadenylation of the glutamine synthetase molecules (reviewed by Tyler, 1978). Furthermore, there is evidence suggesting that the product of glnB interferes with the activation of the glnALG operon, presumably through interaction with the glnL product (Magasanik, 1982).

The unique physiological position of glutamine synthetase makes this complex system a very attractive model to study the regulation of gene expression in bacteria. In an effort to understand the control of glutamine synthetase biosynthesis at the molecular level we are carrying out the analysis of the glnALG operon control regions, as well as the identification of the different transcripts synthesized from this operon and the influence of different regulators and growth conditions over its expression.

Osorio et al (1984) have reported the genetic characterization of a cis-acting mutation (gln-76) which mediates high levels of glutamine synthetase synthesis in the absence of a functional glnG

product. As shown in that paper, the glutamine synthetase levels in strains carrying this mutation are abnormally regulated by the nitrogen availability. The fact, that this mutation was isolated in a glnG background (lacking activation and repression), and that in this background the gln76 allele causes extremely high glutamine synthetase levels, suggests the presence of an up-promoter mutation. However, the up-promoter effect of this mutation is not observed in nitrogen limiting conditions in a wild type background. These observations together with a careful analysis of the phenotypic characteristics of gln-76 allele in different genetic backgrounds suggested the presence of more than one promoter for the glnA expression.

We report here the results obtained from Northern<sup>n'</sup>-hybridization and primer extension experiments which show the existence of two promoters for the glnA expression. Furthermore, evidence is presented which indicates that these promoters are differentially regulated. Previously existing models on the glnALG operon regulation were modified to include these new data.

## RESULTS.

- Two initiation sites for *glnA* transcription.

In order to explore if, as suggested, there are two promoters for *glnA*, we looked for the corresponding initiation sites in a primer extension experiment. For this, RNA was obtained from a strain containing pACR101 (MX789, Table I) grown in GHA. According to the construction of pACR101, transcription initiated at the *glnA* promoter should continue downstream into the  $\beta$ -lactamase gene of pBR327 (Figure 1). Thus, the 5'-end nucleotide of the EcoRI primer used in this experiment hybridizes with the RNA 154 bases downstream from the first nucleotide of the glutamine synthetase initiation codon, as shown in Figure 1. Two main reverse transcripts were detected. Their sizes indicate that *glnA* transcription is initiated 70 and 184 bp upstream of the glutamine synthetase initiation codon. The promoters corresponding to the distal and proximal initiation sites (from now on referred as PglnA<sub>1</sub> and PglnA<sub>2</sub>, respectively) do not match those which were inferred by their sequence homology to the consensus promoter (Covarrubias and Bastarrachea, 1983). The possible -35 and -10 regions for PglnA<sub>1</sub> and PglnA<sub>2</sub> are shown in Figure 2. Unlike PglnA<sub>1</sub>, PglnA<sub>2</sub> resembles very little the consensus promoter.

The two *glnA* promoters respond differently to the nitrogen availability. Most available data on *glnA* regulation have been obtained by measuring the glutamine synthetase levels. The existence of two functional promoters forced us to reconsider that data from a new perspective: that the glutamine synthetase levels are the result of the expression from two promoters, possibly regulated in different ways. For this analysis, Northern blots were used since they reliably reflect the relative abundance of the transcripts within the cell. However the detected levels of a transcript are influenced by the abundance of rRNA in a total RNA preparation. This difficulty is inherent to any method (Northern blot, S1 mapping or other) used to compare the intracellular levels of any transcript coming from different growth conditions. This artefact is evident in the Northern blot experiments presented here since the detected levels of the transcripts do not correspond to the glutamine synthetase specific activities. To circumvent this

problem we decided to make such comparisons assuming that the glutamine synthetase sepecific activities indicate the real levels of the transcripts. On the other hand, the ratio of two transcripts can be compared directly between two different growth conditions.

Some aspects of the regulation of both promoters are more easily observed in strains carrying the gln76 allele since as we will show later, this mutation increases the expression of PglnA<sub>1</sub> without drastically modifying the logic of the regulation (León et al, submmited to publication and this work). For this reason many of the experiments that will be presented here were done with strains having this mutation. These experiments will be presented first, to be confronted afterwards with those performed with the wild type glnA control region.

Lane a and b in Figure 3 show RNAs of the strain MX929 (bearing gln76 in a wild type genetic background, Table I) obtained from GLA ( ↓ ) and GHA ( ↑ ) cultures respectively. These were hybridized against a glnA internal probe (Probe A). As it can be seen, the electrophoresis conditions used allow the distinction of two glnA transcripts. One transcript, predominant in the GLA RNA, has aproximately 1640 nucleotides; the other, predominant in GHA has an estimated size of 1770 nucleotides. It should be noted that, in our system, the RNAs used as molecular weight markers, fragmented human rotavirus genome and E. coli rRNA, migrate precisely in proportion to the logarithm of their molecular weight. Due to this, we can affirm that the lengths of the two glnA transcripts coincide very well with the distances from the two promoters, identified by primer extension, up to a terminator localized in the glnA-glnL intercistronic region (Ueno-Nishio et al, 1984; Rocha et al, submitted to publication). We call the 1770 nucleotide transcript TglnA<sub>1</sub> and the 1640 nucleotide transcript TglnA<sub>2</sub> according to the promoters from which these transcripts start. Figure 3 also shows that the synthesis of the two transcripts is regulated in response to the nitrogen availability. The levels of TglnA<sub>2</sub> are higher in GHA. The levels of TglnA<sub>1</sub> are regulated in the opposite way, being lower in GLA than in GHA.

When a wild type strain, MX614, is subjected to this kind of analysis, the absence of the gln76 mutation is manifested by the absence of TglnA<sub>1</sub> either in GLA or GHA (lanes a and b in Figure 4).

This agrees with other results, which indicate that the gln76 mutation is an up-mutation in PglnA<sub>1</sub> (León et al, manuscript in preparation). In the primer extension experiment shown in Figure 1 we have demonstrated that PglnA<sub>1</sub> from a wild type glnA control region is indeed expressed in GHA. When a Northern hybridization is done using much more RNA per lane, TglnA<sub>1</sub> can also be detected in MX614-GHA RNA (lane g, Figure 4). It is important to emphasize that the observed expression ratio of the two promoters, PglnA<sub>1</sub>/PglnA<sub>2</sub>, is lower in this experiment than that observed in the primer extension experiment. Among the possible explanations to this, it should be considered that primer extension usually produces quantitative artifacts on the detection level of different transcripts. The discrepancy may also be due to the fact that in the primer extension experiment the glnA control region was in multicopy. This interpretation agrees with the Northern experiment shown in lanes c and d in Figure 4. In this case the RNAs came from a strain, MX781, carrying a multicopy plasmid, pACR1, which contains the wild type glnALG operon. As it can be seen, TglnA<sub>1</sub> is easily detectable in GHA but not in GLA. It is also observed that the levels of TglnA<sub>2</sub> are enhanced in GLA with respect to GHA. Thus, the direction in which PglnA<sub>1</sub> and PglnA<sub>2</sub> respond to changes in the nitrogen availability resembles that of a strain bearing the gln76 mutation. This suggests that the logic of the regulation and, therefore, the action of the regulators is not qualitatively altered by the gln76 mutation. It should be mentioned that, like in the primer extension experiment, the PglnA<sub>1</sub> / PglnA<sub>2</sub> expression ratio is higher from pACR1 than from the wild type chromosome (experiment with MX614); probably accounted by an effect of the copy number.

A confirmation that the 1770 nucleotide transcript seen in the MX789-GHA RNA is indeed TglnA<sub>1</sub> and that its level is lower in GLA, is shown in Figure 4 (lanes a' thru f'). In this case RNAs from strains MX614, MX781 and MX929 obtained from GLA and GHA were hybridized with a single stranded probe (ssI) chosen so that it would specifically detect transcripts initiated at PglnA<sub>1</sub> but not at PglnA<sub>2</sub>. As expected, this probe detects specifically TglnA<sub>1</sub>;



mainly in the MX789-GHA and MX929-GHA RNAs. This transcript is also detected, but at a much lower level in MX789-GLA. This experiment demonstrates that the expression of PglnA<sub>1</sub> in a wild type glnA control regions is repressed under nitrogen limitation. No transcript was detected in any of both MX614 RNAs (GHA and GLA) indicating that the amount of TglnA<sub>1</sub> is under the sensitivity of this experiment. This data is important since in the MX614 GLA RNA hybridized with probe A (lane b Figure 4), a band of approximately 1770 nucleotides is seen above the TglnA<sub>2</sub> band which could be interpreted as TglnA<sub>1</sub>. However from the intensity of that band it can be predicted that if it were TglnA<sub>1</sub> it should be easily detected with the single stranded probe. Since this is not the case, that band is likely to be a TglnA<sub>2</sub> transcript whose 3'-end is longer than that of the main TglnA<sub>2</sub> transcript.

#### Regulation of the two glnA promoters.

To identify which regulators mediate these responses to nitrogen availability we made similar experiments using strains carrying mutations in known regulators (glnF and glnG). These strains are derivatives either from a wild type strain (MX614) or from the strain containing the gln76 mutation (MX929) (see Table I).

As it had been established, mutations in glnG are epistatic to mutations in any other regulator of the system, suggesting that the product of glnG is required for any regulation, either positive or negative (Kustu et al, 1979; Pahel and Tyler, 1979; McFarland et al 1981; MacNeil et al, 1982; Magasanik, 1982). Lanes c and d in Figure 5 show RNAs from strain MX927 (gln76, glnG74::Tn5) grown in GLA and GHA and hybridized with probe A. It can be appreciated that the lack of glnG product causes a complete loss of regulation. First, the synthesis of TglnA<sub>1</sub> is almost constitutive, at a very high level. TglnA<sub>2</sub> is not synthesized at all. These data explain how the glnG product is, at the same time, an activator and a repressor: it activates the PglnA<sub>2</sub> promoter and represses PglnA<sub>1</sub>. It is interesting to note that even though in the absence of the glnG product the levels of TglnA<sub>1</sub> rises in both conditions, the effect is much larger in GLA. This suggests that the repression exerted by the glnG product is more important under nitrogen

limitation.

Lanes e and f in Figure 5 show RNAs of strain MX931 (gln76, glnF73::Tn5) obtained from GLA and GHA and hybridized against probe A. In this case, it is observed that induction of PglnA<sub>2</sub> is prevented in both nitrogen conditions. This agrees with the previous data which indicated that the glnF product is, along with the glnG product, part of the glnA activator complex (Kustu *et al*, 1979; Pahel and Tyler, 1979; McFarland *et al*, 1981). On the other hand, the absence of a functional glnF gene does not seem to have any effect over the regulation of TglnA<sub>1</sub>, which keeps responding normally to the nitrogen availability.

Lanes g and h in Figure 5 show the same type of analysis done with strain MX982 (gln76, glnF73::Tn5, glnG77). As expected, the results obtained in this case are very similar to those obtained with strain MX927 (gln76, glnG74::Tn5), which corroborate that a glnG mutation is epistatic to mutations in glnF.

The glutamine synthetase levels of a glnG<sup>-</sup> strain is typically low and not regulated, about 0.05 GS units. The glutamine synthetase level in a glnF<sup>-</sup> strains is below 0.01 GS units or not detectable. When a mutation in glnG is introduced to a glnF<sup>-</sup> strain, the strain recovers the glutamine synthetase levels characteristic of a glnG<sup>-</sup> strain, indicating that the glnG mutation alleviated the glnA transcription from repression. We have shown that in the presence of gln76 such glnG product repression is exerted over PglnA<sub>1</sub>. Lanes c and d in Figure 6 show RNAs of a glnG<sup>-</sup> strain with a wild type glnA control region (MX902) obtained from GLA and GHA and hybridized with probe A. Since the only transcript detected in either nitrogen condition is TglnA<sub>1</sub>, two conclusions can be drawn: first, that the glnG product is required to activate PglnA<sub>2</sub> and second, that the transcription repressed by the glnG product is that from PglnA<sub>1</sub>. Both conclusions are consistent with the ones obtained in the presence of gln76 allele.

Lanes e and f in Figure 6 show RNAs from a glnF<sup>-</sup> strain (MX848) obtained from GLA and GHA and hybridized with probe A. As expected from the glutamine synthetase activities of a glnF<sup>-</sup> strain, the level of glnA transcripts is extremely low. In the insert in

Figure 6 an overexposure of this experiment is shown. Both transcripts are present in both conditions. This result indicate that, although the glnF product is required for PglnA<sub>2</sub> activation, the glnG product by itself can originate a very low expression from PglnA<sub>2</sub>. On the other hand, expression from PglnA<sub>1</sub> is being repressed by the glnG product. We should point out that, in this case, unlike that when the gln76 mutation is present, there is no evident regulation of TglnA<sub>1</sub> in response to the nitrogen availability, In this strain, the glutamine synthetase level is so low that it can not be used for reference. For this reason we do not know if the regulation of PglnA<sub>1</sub> is hidden by the rRNA artefact or if, with a wild type glnA control region, the glnF product is required by PglnA<sub>1</sub> for its regulation.

Lanes g and h in Figure 6 show RNAs from a glnL non-polar mutant (MX1019), obtained from GLA and GHA and hybridized with probe A. The most drastic effect of this mutation is on the synthesis of TglnA<sub>2</sub>. This strain is unable to reduce the expression from PglnA<sub>2</sub> in GHA. This suggest that the glnL product is required to limitate, under nitrogen excess, the activation function of the glnG and glnF products. In this glnL strain, PglnA<sub>1</sub> still responds to the nitrogen availability, although the TglnA<sub>1</sub>/TglnA<sub>2</sub> ratio in GHA is increased as refered to a wild type strain. Since the TglnA<sub>2</sub> levels are abnormally high, this indicates that the TglnA<sub>1</sub> levels are much higher than expected. This implies that, although the glnL product is dispensable for repression, it does have a negative effect over PglnA<sub>1</sub> expression.

#### The glnG product binds to glnA control region.

The aforementioned experiments indicate that the product of glnG exerts regulation over PglnA<sub>1</sub> by itself. We further supported this hypothesis by shoing that this product can specifically bind, in vitro, the 214 bp HhaI fragment containing PglnA<sub>1</sub> (Figure 7). It should be noted that no other fragment was retained, not even the 192 bp fragment which contains PglnA<sub>2</sub>. This result correlates with the fact that induction of PglnA<sub>2</sub> also requires the product of glnF.

PglNA<sub>1</sub> responds to carbon limitation.

One of the most interesting features of PglNA<sub>1</sub> is that although it is a regulated promoter, it is expressed very little compared to PglNA<sub>2</sub>. Even in GHA, where PglNA<sub>1</sub> is derepressed and PglNA<sub>2</sub> is less activated, the TglNA<sub>1</sub>/TglNA<sub>2</sub> ratio indicates that TglNA<sub>1</sub> has a minor participation in the synthesis of glutamine synthetase.

In order to find growth conditions where expression from PglNA<sub>1</sub> would be more significant for the glnA expression, we explored the effects of a poor carbon source. As expected, under these conditions, either in Luria broth or in LHA, the TglNA<sub>1</sub>/TglNA<sub>2</sub> ratio is increased enough to make the levels of TglNA<sub>1</sub> important for glutamine synthetase synthesis, (Lanes b and g, Figure 8). This increase in the TglNA<sub>1</sub>/TglNA<sub>2</sub> ratio is caused, only in part, by a further reduction in the levels of TglNA<sub>2</sub>. In a glnF<sup>-</sup> background the levels of both transcripts are highly increased in LHA conditions compared with those in GHA (Figure 8, lanes c and d). None of the poor carbon source effects just mentioned are clearly evident in a glnG<sup>-</sup> background (Figure 8, lanes e and f).

Not even in LHA the levels of TglNA<sub>1</sub> become higher than those of TglNA<sub>2</sub>. The possibility that PglNA<sub>1</sub> is used preferentially in later phases of a culture was discarded. RNAs isolated at late exponential and early and late stationary phases from MX614-GLA and MX614-GHA cultures show no increase in the TglNA<sub>1</sub>/TglNA<sub>2</sub> ratio (data not shown).

## DISCUSSION.

We have shown that glnA transcription is initiated at two promoters which are inversely regulated. Changes in the growth condition causing glutamine synthetase synthesis to decrease are accompanied by a gradually diminishing expression from PglnA<sub>2</sub> and a gradually increasing expression from PglnA<sub>1</sub>. However, under all the conditions studied, the largest proportion of transcription starts at PglnA<sub>2</sub>. This suggests that the expression from PglnA<sub>1</sub> would be a mechanism for finely tuning this synthesis, particularly under glutamine synthetase repressing conditions. It would be very interesting to find out if there are conditions where expression from PglnA<sub>1</sub> overrides that from PglnA<sub>2</sub>.

The data presented here demonstrate that NR<sub>I</sub> participates in the regulation of both promoters. In its absence, PglnA<sub>2</sub> is completely turned off. On the other hand, the highest expression we have observed from PglnA<sub>1</sub> occurs only in the absence of NR<sub>I</sub>. In this case PglnA<sub>1</sub> by itself is sufficient to give a glutamine synthetase activity of about 0.05 G.S. units. Before this work, it was not clear how NR<sub>I</sub> participated as a repressor of glnA expression. In particular, it seemed a more logical hypothesis that NR<sub>I</sub> would repress under nitrogen excess since the glutamine synthetase levels are lower in this condition than under nitrogen limitation. Instead we have demonstrated that NR<sub>I</sub> represses under conditions where the glutamine synthetase levels are induced. Our interpretation to why should there be such a mechanism will be discussed later.

Our data indicate that the glnF product, along with NR<sub>I</sub>, is required to induced PglnA<sub>2</sub>. However, in a glnF<sup>-</sup> background we observe some expression, although very small, from PglnA<sub>2</sub>. In a glnG<sup>-</sup> background this expression is not detected. This probably indicates that NR<sub>I</sub> is able to bind to a certain extent to PglnA<sub>2</sub> in the absence of the glnF product causing a low expression from this promoter.

From our data, it is not clear if the glnF product has a direct participation on PglnA<sub>1</sub> expression. The regulation of

PglnA<sub>1</sub> appears to be normal in a gln76 glnF<sup>-</sup> background when compared to a gln76 background. On the other hand, in a glnF<sup>-</sup> strain carrying a wild type glnA control region we observe no response of PglnA<sub>1</sub> to the extracellular levels of ammonia. An in depth characterization of the gln76 mutation, being carried out in our laboratory, will probably shed light over this question. Some preliminary data suggest that a gln76 mutation does not interfere drastically with the normal regulation pattern. This would indicate that the observed lack of regulation over PglnA<sub>1</sub> in a glnF<sup>-</sup> background is an effect of some metabolic imbalance. It should be noted that the glnF<sup>-</sup> strain, MX848, is the only Gln auxotroph used in this work, therefore Gln was added to its cultures. Although, a wild type strain responds to the extracellular concentrations of ammonia showing no effect by the presence or absence of Gln, it is possible that in a glnF<sup>-</sup> strain the extracellular Gln does have an effect over the glnA regulation.

The mutation in glnL present in MX1019 causes an elevated synthesis of TglnA<sub>2</sub> under nitrogen excess. This suggests that a functional glnL product is required to prevent induction of PglnA<sub>2</sub> under these conditions. Chen Y.- M. et al (1982) have shown that a glnL deletion mutant is able to fully decreased the levels of glutamine synthetase. According to this report, it would be the presence of an aberrant glnL product, not the absence of a functional one, which causes elevated expression from PglnA<sub>2</sub> under nitrogen excess. This suggests that the direct effectors of glnA regulation receive information from the glnL product as well as from another signal, probably a metabolite. An indication that at least NR<sub>1</sub> can receive information independently of the glnL product is that PglnA<sub>1</sub>, in MX1019, is correctly regulated. This is not to say that we have discarded any effect of the glnL product over PglnA<sub>1</sub>. In fact it seems that the range of PglnA<sub>1</sub> regulation is broadened in this glnL mutant as reflected by an increase of TglnA<sub>1</sub> in GHA with respect to its levels in the MX614-GHA RNA. This suggests that the glnL product has a negative effect over PglnA<sub>1</sub> expression.

Under carbon excess and nitrogen excess the level of TglnA<sub>1</sub> is very low compared to that of TglnA<sub>2</sub>. When a poor carbon source

is supplied, instead of a good one, the glutamine synthetase levels decrease while the  $TglnA_1/TglnA_2$  ratio increases substantially. Although in this condition  $TglnA_2$  remains the main transcript, the amount of  $TglnA_1$  becomes significant for glutamine synthetase synthesis. This effect is more pronounced in GHA than in Luria broth. Adding glucose to Luria broth reduces the  $TglnA_1/TglnA_2$  ratio (unpublished results). It is possible that under a more severe carbon limitation, like in acetate as carbon source, the  $TglnA_1$  levels will reach those of  $TglnA_2$ . This would have important implications to understand the role of  $PglnA_1$ .

Tyler (1979) has reported that the glutamine auxotrophy of a  $glnF^-$  mutant can be suppressed by growth in a carbon limiting medium. She has found that there is an eight fold increase in the glutamine synthetase activity. This outstanding result is supported by our data, which indicate that in a  $glnF^-$  strain the levels of both transcripts are dramatically augmented under carbon limitation. These data support that  $TglnA_2$  can be transcribed in the absence of the  $glnF$  product. In this case,  $PglnA_1$  and  $PglnA_2$  are regulated in the same direction, contrasting with the other regulatory effects we have observed. Although this may imply another regulatory level, at present we do not have any good explanation for these facts.

Recently, Dixon (1984) has found that the  $glnA$  gene from *Klebsiella pneumoniae* can also be transcribed from two tandem promoters. In this case the downstream promoter is activated by the  $glnF$  gene product in the presence of either the  $glnG$  and  $glnL$  or the  $nifA$  products. The requirement of the  $glnL$  product for activation marks an important difference with the *E. coli* promoter. The downstream promoters from *E. coli* and *K. pneumoniae* are completely homologous. We have found that a sequence overlapped with the *E. coli*  $glnA$  downstream promoter, from positions -98 to -84 (Fig.2), present a very high homology with the consensus sequence for a  $nif$  promoter (Ausubel, 1984). This may have to do with the hypothesis that the  $glnG$  and  $nifA$  product are evolutionary related (for review see Ausubel, 1984). In regard to the upstream promoters, both are negatively regulated by the  $glnL$  and  $glnG$  products. However, in this case the *E. coli* upstream promoter does not correspond to that of

### K. pneumoniae.

The existence of two promoters poses some interesting questions. One may think that the glnA expression could be properly regulated at only one promoter. However, bacteria have evolved a more complex strategy. The major regulation of glutamine synthetase synthesis in response to the availability of nitrogen is mediated by  $NR_I$ . Perhaps only with two promoters can  $NR_I$  mediate regulation according to many different signals. On the other hand, our results indicate that, in conditions where glutamine synthetase is synthesized at low levels, a decrease in the TglnA<sub>2</sub> levels is partially compensated by an increase in the TglnA<sub>1</sub> levels. Thus, it seems that the synthesis of glutamine synthetase varies in a smoother way than that of TglnA<sub>1</sub>. Probably, this smooth response to changes in the intracellular milieu can not be attained with a promoter which, on the other hand, is committed to respond more drastically under nitrogen limitation conditions. This could also explain why one of the two promoters is expressed at low levels and why they are inversely regulated.

Under nitrogen excess and carbon limitation, glutamine synthetase could deplete the  $\alpha$ -ketoglutarate pools of the cell, thus there should be a level of fine carbon regulation over glnA expression. PglnA<sub>1</sub> would be a strategic target for this control. According to this hypothesis, the inverse regulation of PglnA<sub>1</sub> is a mechanism to allow the carbon metabolism regulation system an increasing control over the glutamine synthetase synthesis when the carbon resources become precarious.

The presence of a sequence homologous to the CAP binding site preceding PglnA<sub>1</sub> (Fig. 2) agrees with the hypothesis that this promoter responds to the carbon metabolism.

#### A regulation model involving two promoters.

The results obtained in this work have slightly modified the view of how the genes in the glnALG operon are expressed. We proposed the following model.

Under carbon excess and nitrogen limitation conditions, most transcription from the glnALG operon starts at PglnA<sub>2</sub>. Under these conditions PglnA<sub>2</sub> is activated by the coordinated action of  $NR_I$ .



and the glnF product, while PglnA<sub>1</sub> and PglnL are repressed by NR<sub>I</sub>. These are the conditions of maximal glutamine synthetase synthesis.

Under carbon and nitrogen excess, the activation of PglnA<sub>2</sub> is reduced through the action of the glnL product, maybe in combination with the P<sub>II</sub> protein, as proposed by Magasanik (1982). Under these conditions the repression of PglnA<sub>1</sub> and PglnL exerted by NR<sub>I</sub> is partially relieved. This results in an increase in the TglnA<sub>1</sub>/TglnA<sub>2</sub> ratio. The level of glutamine synthetase decreases about 10-fold.

Under carbon limitation and nitrogen excess, a further decrease in the expression of PglnA<sub>2</sub> occurs. Also, expression from PglnA<sub>1</sub> increases. Under these conditions the glutamine synthetase levels are reduced another 4-fold.

P. 99 ✓

## MATERIALS AND METHODS.

Reagents. Enzymes were obtained from commercial sources. Aminoacids vitamins and deoxyribonucleotides were from Sigma Chemicals Co. Radiochemicals were from Amersham. All other reagents and media used were analytical grade.

Strains. All strains used in this work are described in Table I.

Culture media. The NN minimal medium, described elsewhere (Covarrubias et al 1980), was supplemented with different carbon and nitrogen sources to form the following combinations: glucose high ammonium (GHA), glucose-Gln (G-Gln), glucose high ammonium Gln (GHA-Gln), lactate high ammonium (LHA) and lactate-high ammonium-Gln (LHA-Gln). The final concentrations were 2g/l glucose and lactate, 0.5mM and 15mM for low and high ammonium respectively, and 1mg/ml for Gln. The Ntr phenotype of a strain was tested by its ability to grow in 0.2% arginine as the sole nitrogen source. The presence of transposon Tn<sub>5</sub> was tested, by the kanamycin resistance it confers, in media containing 30mg/l of kanamycine sulfate. Luria broth (LB) was made as described by Davis et al (1980).

Throughout this article, the name of a strain followed by the name of a medium will be used to designate a particular culture or RNA.

Glutamine synthetase activity. The  $\gamma$ -glutamyl transferase assay used was as previously reported (Covarrubias et al, 1980). Specific activities are given as nanomoles of  $\gamma$ -glutamyl hydroxamate formed per min. per mg of protein at 37°C (GS units).

Plasmids. Plasmid pACR1 is a ColE1 derivative containing the complete glnALG operon (Covarrubias et al, 1980). Plasmid pACR101 was constructed as follows: A SmaI-EcoRI fragment (728 bp) which contains the glnA control region (Covarrubias and Bastarrachea, 1983) was purified from plasmid pACR1. After adding BamHI linkers to the SmaI end, this fragment was cloned into the BamHI-EcoRI digested cloning vehicle pBR327 (Soberón et al, 1980).

RNA isolation. Cultures were harvested at 0.5 O.D. 600nm, and total RNA was extracted according to Aiba et al (1981).

Northern Procedures. Agarose gels containing 2.2M formaldehyde were prepared and electrophoresed as described by Maniatis et al (1982) except that 2mM NaKHP<sub>4</sub> was added to all buffers. The gel transference as well as the nitrocellulose filter hybridization were carried out as described by Thomas (1980). Probe A is a - 700 bp EcoRI-BamHI glnA internal fragment. Probe sSI is a single stranded probe obtained from a M13mp8 derivative by primer - extension with klenow polimerase. This probe corresponds to the complementary strand of the glnA transcript. Its 5'-end is in the HaeIII site adjacent to PglnA<sub>2</sub> (see Fig.2). Probe A was labeled with { $\alpha$ -<sup>32</sup>P} dCTP by nick translation and used at a concentration of 10ng/ml and a specific activity of 5X10<sup>8</sup> dpm/ $\mu$ g. 4 $\mu$ g of total RNA were used per gel slot. The results from the Northern experiments shown here were reproducible with different RNA isolates.

NR<sub>I</sub> binding assay. This assay was carried out in a similar way to the RNA polymerase binding assay described by West and Rodríguez (1980). 3 $\mu$ g of HhaI digested pACR101 were mixed with purified E. coli NR<sub>I</sub> (Rocha et al., submitted to publication) in a 1 to 10 molar ratio. The binding reaction was carried out in 20 $\mu$ l of binding buffer - (BB, 20mM Tris-HCl pH8, 10mM MgCl, 0.1mM EDTA, 0.1mM DTT, 5% glycerol and 75mM KCl) and was incubated for 20 min at 37°C. 1 $\mu$ l of heparin (10mg/ml) was added and incubation continued for another 20 min. The reaction was diluted with 200 $\mu$ l of BB. Restriction fragments bound to NR<sub>I</sub> were trapped by filtering this reaction through a 6mm - nitrocellulose disc (Scheleicher and Schuell-BA85). These were then eluted from the nitrocellulose with 500 $\mu$ l of elution buffer (10mM Tris-HCl pH8, 0.2% SDS, 0.3M sodium acetate), ethanol precipitated and analyzed in a 7.5% polyacrylamide gel.

Primer extension procedure. We followed a modification of a protocol kindly provided by John Rossi, using as a primer the EcoRI-16mer (Wallace et al, 1981) which is homologous to the sequence adjacent to the EcoRI site in pACR101. 0.1 picomoles of (<sup>32</sup>P) 5'-end labeled primer were mixed with 50 $\mu$ g of RNA obtained from strain MX789 grown in GHA. The mix was denatured at 94°C for 5 min in 8.7mM Tris-HCl pH8.3, 0.3-M EDTA and immediately chilled on ice. The primer-RNA hybridization was done at 43°C for 3 hrs. The reverse transcription

reaction was carried out in 52 mM Tris-HCl pH8.3, 10.5mM MgCl<sub>2</sub>, 4.2mM DTT, 1mM each TTP, dGTP, dATP, dCTP and 53 units of reverse transcriptase in a final volume of 25µl, during 30 min, at 43°C. RNA was degraded by adding 2 µl of a 1mg/ml RNase solution and incubating for 1 hr at 37°C. This reaction was phenol extracted, ethanol precipitated and the reverse transcripts were analyzed in a conventional sequencing gel.

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

## Acknowledgements

We are grateful to Jaime Mora, Rafael Palacios, Jean Marc Bonneville and Lorenzo Segovia for critically reviewing this manuscript, to Elvia Miranda for typing and to Alejandro Pichardo, Eduardo J. Peralta and Georgina Hernández for technical assistance. We also want to thank X. Soberón for providing us the synthetic EcoR1-16mer, and to Carlos Arias for kindly providing us with the human rotavirus RNA's. Finally, we are most grateful to Martha Vázquez for her generosity in providing her time and friendly effort in most stages of this project's accomplishment. This work was supported, in part, by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México) grant PCCBBNA-020413.

## REFERENCES

- Adhya, S. and Garges, S. (1982) *Cell* 29, 287-289.
- Aiba, H., Adhya, S. and de Crombrughe, B. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 11905-11910.
- Ausubel, F. M. (1984) *Cell*, 37, 5-6.
- Both, G. W., Bellamy, A. R., Street, J. E. and Siegman, L. J. (1982) *Nucleic Acids Res.*, 10, 7075-7088.
- Chen, Y. M., Backman, K. and Magasanik, B. (1982). *J. Bacteriol.*, 150, 214-220.
- Covarrubias, A. A., Sánchez-Pescador, R., Osorio, A., Bolívar, F. and Bastarrachea, F. (1980) *Plasmid*, 3, 150-164.
- Covarrubias, A. A. and Bastarrachea, F. (1983) *Mol. Gen. Genet.*, 190, 171-175.
- Davis, R. W., Botstein, D. and Roth, J. R. (1980) *Advanced Bacterial Genetics. A manual for Genetic Engineering* by Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y.
- Dixon, R. (1984) *Nucleic Acids. Res.*, 12, 7811-7817.
- Guterman, S.K., Roberts, G. and Tyler, B. (1982) *J. Bacteriol.*, 150, 1314-1321.
- Krajewska-Grynkiewicz, K. and Kustu, S. (1983) *Mol. Gen. Genet.*, 192, 187-197.
- MacNeil, T., MacNeil, D. and Tyler, B. (1982a) *J. Bacteriol.* 150, 1302-1313.
- MacNeil, T., Roberts, G.P., MacNeil, D. and Tyler, B. (1982b) *Mol. Gen. Genet.*, 188, 325-333.
- Magasanik, B. (1982) *Ann. Rev. Genet.*, 161, 135-168.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A laboratory manual* by Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Osorio, A. V., Servín-González, L., Rocha, M., Covarrubias, A.A. and Bastarrachea, F. (1984) *Mol. Gen. Genet.*, 194, 114-123.
- Ow, D.W., Sundaresan, V., Rothstein, D.M., Brown, S.E. and Ausubel, F.M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80, 2524-2528.
- Pahel, G., Rothstein, D.M. and Magasanik, B. (1982) *J. Bacteriol.* 150, 202-213.

- Prusiner, S., Miller, R. E. and Valentine, R. C. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 69, 2922-2926.
- Reitzer, L. J. and Magasanik, B. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80, 5554-5558.
- Rothstein, D. M., Pahel, G., Tyler, B. and Magasanik, B. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 145, 7372-7376.
- Servín-González, L. and Bastarrachea, F. (1985) J. Gen. Microbiol., In press.
- Soberón, X., Covarrubias, L. and Bolívar, F. (1980) Gene, 9, 287-305.
- Stadtman, E. R. and Ginsburg, A. (1974) in Boyer, P. (ed.), The Enzymes, Vol. X, Academic Press, N. Y. pp. 755-807.
- Stadtman, E. R., Mura, U. Boon-Chock, P. and Goo-Rhee, S. (1980) in Mora, J. and Palacios, R., (eds.), Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation, Academic Press, Inc. London, UK. pp. 41-59.
- Thomas, P. S. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 77, 5201-5205.
- Tyler, B. (1978) Ann. Rev. Biochem., 47, 1127-1162.
- Ueno-Nishio, S., Backman, K. and Magasanik, B. (1983) J. Bacteriol. 153, 1247-1251.
- Wallace, B. R., Johnson, M. J., Suggs, S. V., Miyoshi, K., Bhatt, R. and Itakura, K. (1981) Gene, 16, 21-26.
- West, R. W. and Rodríguez, R. L. (1980) Gene, 9, 175-193.
- Woolfolk, C. A., Shapiro, B. and Stadtman, E. R. (1966) Arch. Biochem. Biophys., 116, 177-192.

Table I. Bacterial Strains

STRAIN	GENOTYPE	SOURCE OR REFERENCE
MX614	F <sup>-</sup> ( <u>pro-lac</u> ) <sub>Δ</sub> <u>galE ilv680 thi-1</u>	Bastarrachea <u>et al</u> (1980)
MX848	Same as MX614 but <u>glnF73::Tn5</u>	Osorio <u>et al</u> (1984)
MX902	Same as MX614 but <u>glnG74::Tn5</u>	Osorio <u>et al</u> (1984)
MX927	Same as MX902 but <u>gln76</u>	Osorio <u>et al</u> (1984)
MX929	Same as MX614 but <u>gln76</u>	Osorio <u>et al</u> (1984)
MX931	Same as MX929 but <u>glnF73::Tn5</u>	Osorio <u>et al</u> (1984)
MX982	Same as MX931 but <u>glnG77</u>	Osorio <u>et al</u> (1984)
MX1019 <sup>ca</sup>	Same as MX614 but <u>glnL83<sup>a</sup></u>	F. Bastarrachea
MX781	F <sup>-</sup> <u>proA2 leuB6 thi-1 lacY1 galK2 rpsL20 hsdS</u> <u>recA glnA70 r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup> / pACR1</u>	Covarrubias <u>et al</u> (1980)
MX789	F <sup>-</sup> <u>proA<sub>2</sub> leuB6 thi-1 lacY1 galK2 rpsL20 hsdS</u> <u>recA r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup> / pACR101</u>	This paper

<sup>a</sup> glnL83 is a non-polar point mutation isolated as a supressor of the Asm<sup>-</sup> phenotype of the gltB31 mutation.



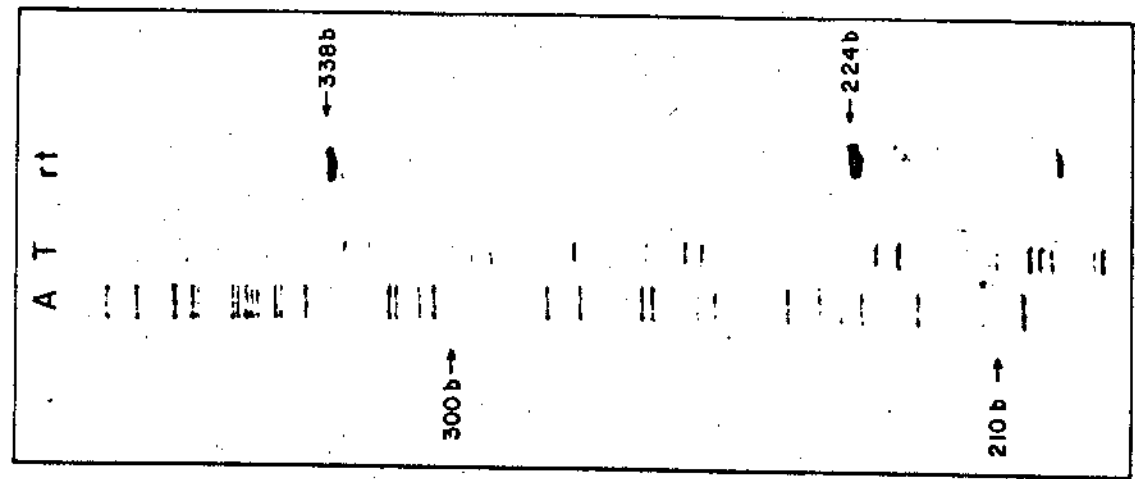
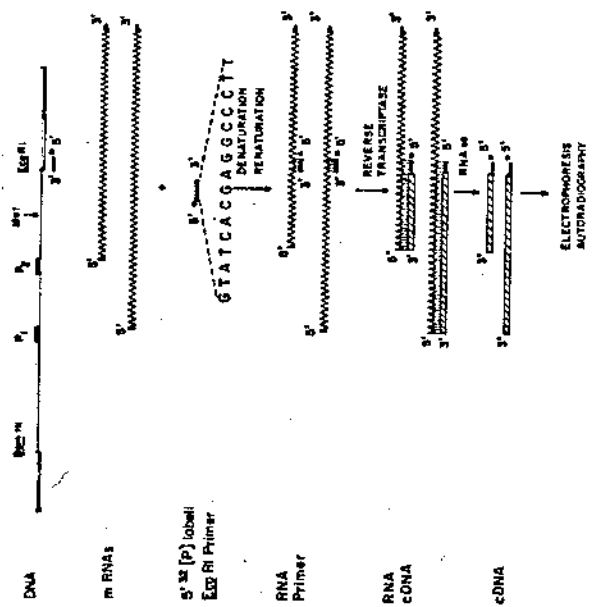


Figure 1. Primer extension experiment to localize the TglnA<sub>1</sub> and TglnA<sub>2</sub> initiation sites. Lanes A and T correspond to the adenine and thymidine ladders of a known sequence, used here as molecular weight markers. Lane rt shows the reverse transcripts synthesized in this experiment. The lengths of these reverse transcripts are indicated at the right of lane rt. The scheme above represents the rationale of this experiment.



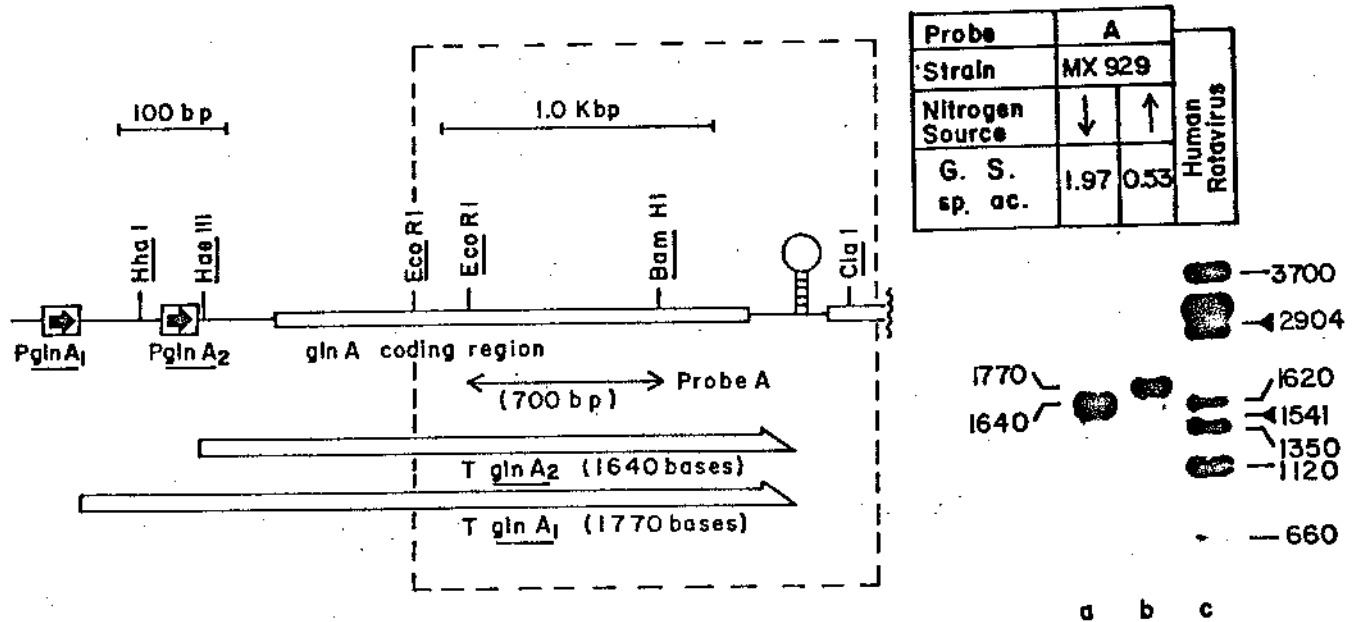


Figure 3. Northern blot hybridization of RNAs obtained from strain MX929 (gln76) grown in a medium containing as nitrogen source either 0.5mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $\downarrow$ , lane a) or 15mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $\uparrow$ , lane b) and hybridized against probe A. Denatured human rotavirus (250761) genome and *E. coli* rRNAs were used as molecular weight markers. The sizes of the rotavirus RNAs were based on Both et al (1982) and Arias (personal communication). A typical pattern of rotavirus RNAs migration is shown in lane c; the positions of *E. coli* rRNAs are indicated with full triangles. All molecular weight markers are expressed in nucleotides. The approximate molecular weights of the two main glnA transcripts are indicated at the left of lane a. The scheme on the right shows the initiation and termination sites of TglnA<sub>1</sub> and TglnA<sub>2</sub>. The restriction fragment corresponding to probe A is indicated. The dashed box indicates a reduced drawing scale.

Probe	A						ss I						A
	MX 614		MX 781		MX 929		MX 614		MX 781		MX 929		
Strain	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↑
Nitrogen Source	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↑
G. S. sp. a c.	1.99	0.26	2.50	0.31	1.97	0.53	1.99	0.26	2.50	0.31	1.97	0.53	0.26

2904 —

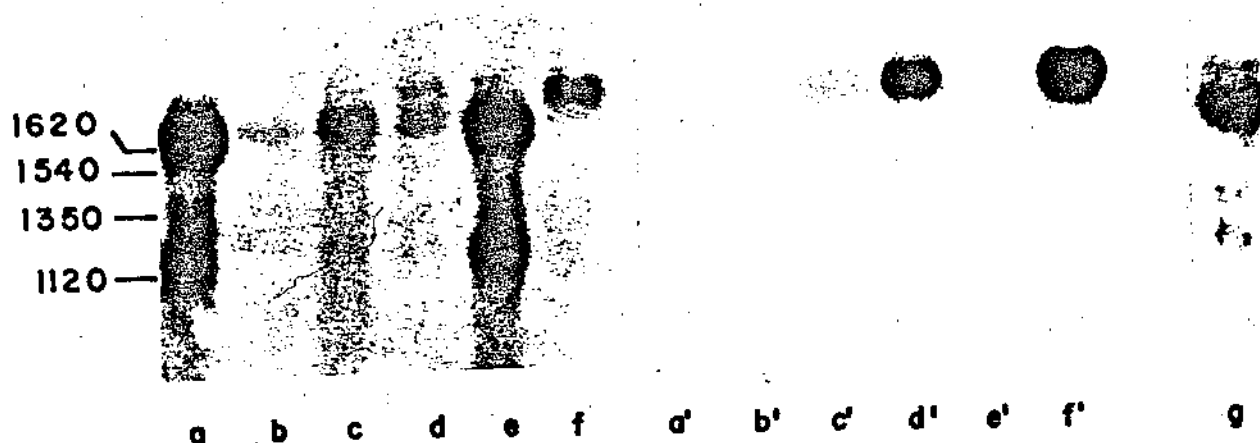


Figure 4. Northern blot hybridizations. In the line indicating the nitrogen source, up and down pointing arrows mean 15mM and 0.5mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , respectively. The amount of RNA loaded in each lane was: a thru f, 5 $\mu\text{g}$ ; a' and b', 20 $\mu\text{g}$ ; c' and d', 10 $\mu\text{g}$ ; e' and f', 5 $\mu\text{g}$ ; g, 20 $\mu\text{g}$ . Lanes a' thru f' were hybridized with a single stranded TglnA<sub>1</sub> specific probe, ssI. Lane g is equivalent to lane b but at a much higher sensitivity. The relevant genotypes of the strains used in these experiments are: MX614, wild type; MX781, glnA70/pACR1; MX929, gln76.

Strain	Probe A							
	MX 929		MX 927		MX 931		MX 982	
Nitrogen Source	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑
G. S. sp. ac.	1.97	0.53	4.13	1.87	0.15	0.60	4.18	1.39

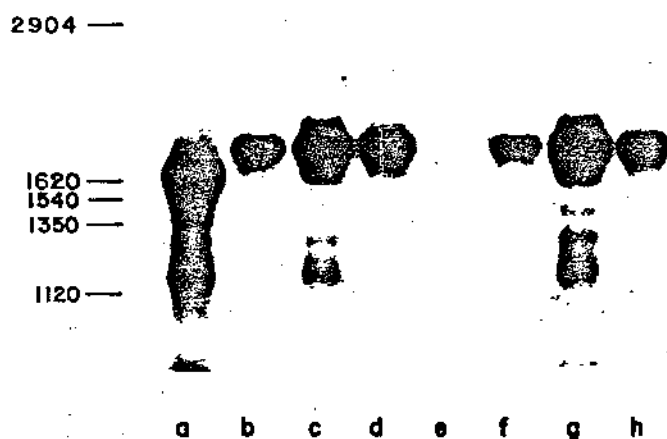


Figure 5. Northern blot hybridization of RNAs from strains carrying the gln76 allele. In the line indicating the nitrogen source, up and down pointing arrows mean 15mM and 0.5mM NH<sub>4</sub>Cl, respectively. The detection sensitivity is the same for all lanes. Bands below the main glnA transcripts are products of physiological mRNA degradation. The relevant genotypes of the strains used are: MX929, gln76; MX927, glnG74::Tn5 gln76; MX931, glnF73::Tn5 gln76; MX982, glnF73::Tn5 glnG77 gln76.

Strain	Probe A							
	MX 614		MX902		MX 848		MX1019	
Nitrogen source	↓	↑	↓	↑	g	g+↑	↓	↑
G. S. sp. ac.	199	026	002	005	-	-	211	177

2904—

1620—  
1540—  
1350—  
1120—

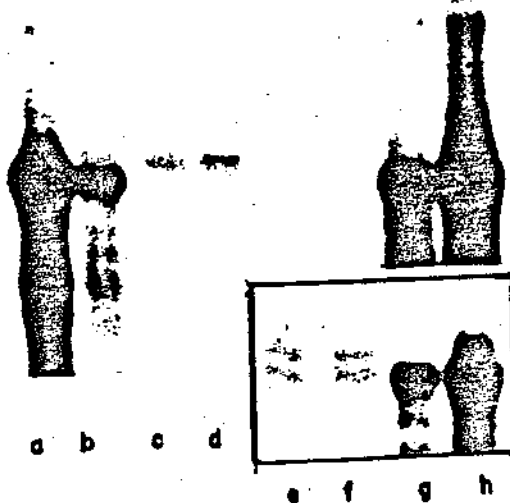


Figure 6. Northern blot hybridization. In the line indicating the nitrogen source, up and down pointing arrows mean 15mM and 0.5mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , respectively; g means 1g/l Gln. The lanes on top are shown at the same sensitivity. The insert below, lanes e-f and g-h represents the same hybridizations at different sensitivity to emphasize the presence and relative abundance of the two glnA transcripts. The relevant phenotypes of the strains used are: MX614, wild type; MX902, glnG74::Tn5; MX848, glnF73::Tn5; MX1019, glnL83.

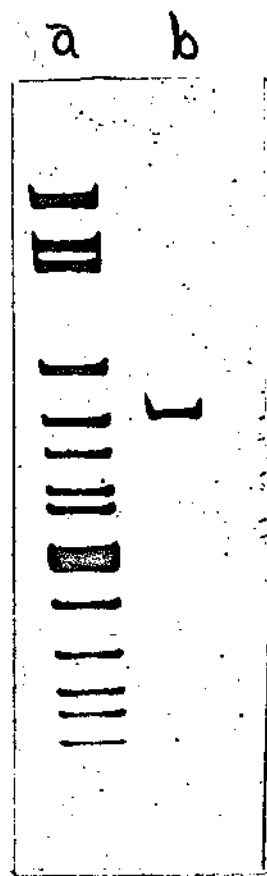


Figure 7. NR<sub>1</sub> binding assay. Lane a, pACR101 digested with HhaI. Lane b, fragments bound to NR<sub>1</sub>; only the 214 bp fragment, containing PglnA<sub>1</sub>, was retained. For details see Materials and Methods.

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

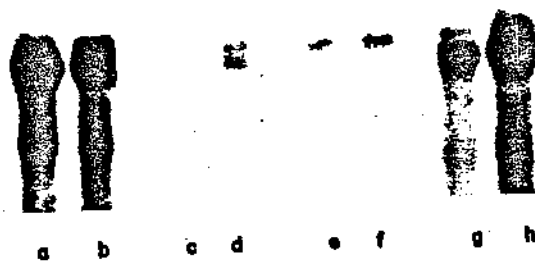


Figure 8. Northern blot hybridization. In the line indicating the nitrogen source, up and down pointing arrows mean 15mM and 0.5 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  respectively; g means 1g/1 Gln. In the line indicating the carbon source, G means 0.2% glucose, L means 0.2% lactate. The detection sensitivity is the same for all lanes - except g and h .



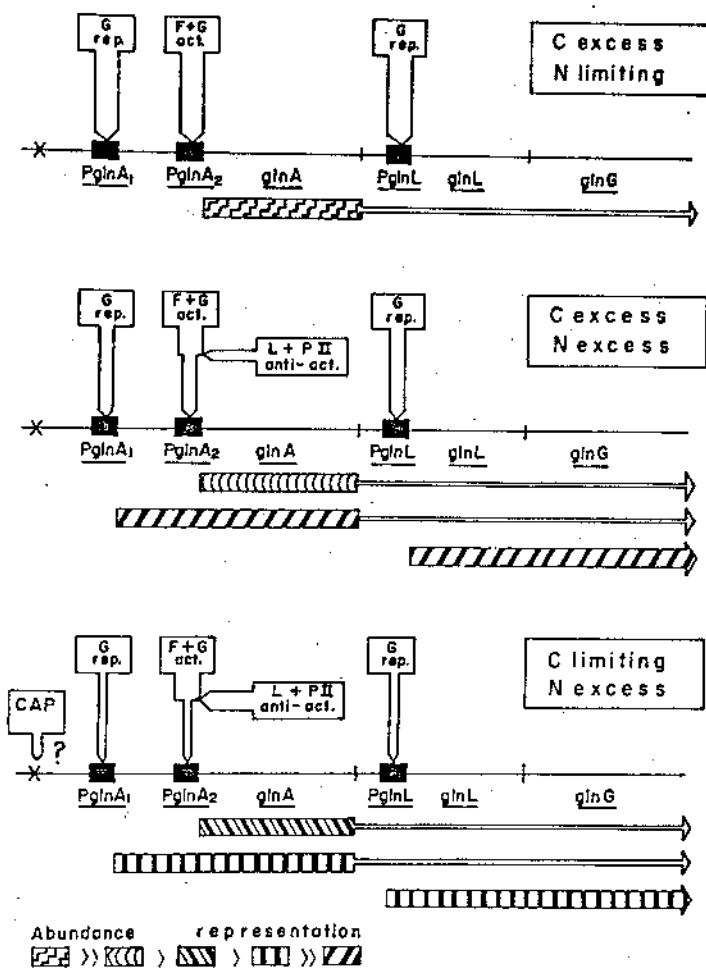


Fig 9.

## DISCUSION

El trabajo de ésta tesis abre nuevas posibilidades para entender la regulación del operón glnALG. Su importancia reside en que plantea una serie de preguntas que al ser contestadas ahondarán nuestra comprensión del sistema. Las primeras preguntas que se nos han ocurrido son: ¿ Es una estrategia común en bacterias el tener más de un promotor para la expresión de un gen ? ¿ Por qué es conveniente tener más de un promotor ? ¿ En el caso de glnA, para qué sirve el tener dos promotores ? ¿ Por qué estos se regulan inversamente ? Alrededor de algunas de estas preguntas quisiera centrar la discusión.

Si resultara que la existencia de más de un promotor es casual, las preguntas anteriores perderían todo significado. Por ello quiero analizar, antes que nada, ésta posibilidad. Veamos. No es improbable que se generen promotores al azar; es decir, sin ninguna presión selectiva; por simple acumulación aleatoria de mutaciones. Se sabe que la RNA-polimerasa reconoce in vitro secuencias que no son promotores (93). Más aún, dado que en glnA el promotor distal es muy débil, pudiera haberse generado por deriva génica. Sin embargo, se debe recordar que el promotor distal de glnA está regulado por la disponibilidad de nitrógeno y además comparte con el promotor proximal un regulador importante del metabolismo nitrogenado: el producto de glnG.

Tomando en cuenta lo anterior, resulta muy difícil concebir que el promotor distal no haya estado sujeto a presión selectiva. Sin dicha presión; ¿Cómo pudo éste -- promotor adquirir un sistema de regulación específico que, por sus características, parece estar tan relacionado a las funciones del operón? Por otro lado, dado que tal regulación existe, es muy improbable que la presencia de -- tal promotor tenga un valor neutral para la bacteria.

En particular, la transcripción del promotor distal pasa por encima del promotor proximal, PglnA<sub>2</sub>. Hemos demostrado que la transcripción de PglnA<sub>1</sub> representa en algunos casos, como en lactato alto amonio, al menos el 30% de los transcritos de glnA. Esto sugiere que la síntesis de TglnA<sub>1</sub> debe interferir con la transcripción a -- partir del promotor proximal, PglnA<sub>2</sub>.

Más aún, dada la cercanía de estos dos promotores, cabe pensar que se establezca una competencia por la RNA-polimerasa. Dicha competencia no sería irrelevante pues, si bien ambos promotores transcriben el mismo gen, no es de suponerse que ambos promotores tengan la misma capacidad para formar el "complejo abierto de transcripción" -- con la RNA-polimerasa, es decir, el complejo funcional de la iniciación de la transcripción (93).

Tampoco debe ser irrelevante el que ambos promotores compartan para su regulación al producto de glnG. Se ha calculado que en la célula debe haber alrededor de 30 moléculas de éste regulador (94). Es difícil concluir si

ésta cantidad representa o no un exceso de regulador. Si bien entre ambos promotores solo pueden titular dos de estas moléculas, es posible que las restantes estén unidas al DNA en otras regiones o simplemente se encuentren libres en el citoplasma, pero demasiado lejos de la región de control de glnA. Lo que con esto quiero decir, es que, en cada momento, solamente las moléculas de NR<sub>1</sub> que estén suficientemente cerca de glnA entran en juego, y que estas deben ser pocas. Ya que, como se muestra en este trabajo, un fragmento de restricción que lleva al promotor distal une con gran avidéz al producto de glnG, es muy probable que éste promotor reduzca la disponibilidad de NR<sub>1</sub> en cuanto a la activación del promotor proximal.

Hasta el momento mi argumento ha sido que, dada la preexistencia del promotor proximal, con una regulación optimizada, la aparición del promotor distal afectaría tal regulación y por lo tanto tendría un valor de selección negativo. Claro que esto es "poner la carreta en frente del caballo". Lo que en realidad suponemos es que la función de ambos promotores ha sido optimizada durante una larga evolución y que la presencia de un segundo promotor aumenta las probabilidades de éxito de la bacteria. Otros argumentos a favor de la utilidad de PglnA<sub>1</sub> provienen de la existencia de sistemas similares, con dos promotores para la expresión de glnA, en Klebsiella y Anabaena, los cuales se analizarán en breve.

Con la discusión anterior he querido convencerles de que, al menos en el caso de glnA, la existencia de dos -- promotores sí tiene un papel fisiológico (aunque desconocido) y a la vez he aprovechado para destacar algunas -- ideas que tienen implicaciones para cuando haya que considerar la función de ambos promotores.

Como ya se mencionó, en Anabaena y en Klebsiella pneu-monie la expresión de glnA tiene importantes similitudes con E.coli (nota 1). (En Anabaena existen cuatro promotores, aunque los dos más distales tienen una baja expresión y no se ha hallado que estén regulados).

En primer lugar, los tres sistemas tienen más de un -- promotor. En los tres casos, el promotor proximal tiene la mayor capacidad para originar transcripción de glnA. -- En todos los casos, añadir una alta concentración de amonio al medio tiene el efecto de disminuir la expresión de éste promotor. Sin embargo en ninguno de los tres casos se ha observado que dicho promotor pueda ser apagado del todo en respuesta a las condiciones de cultivo.

El segundo promotor, ordenados según su lejanía al codón inicial de GS, se parece, entre los tres organismos, -- por su baja expresión, la cual puede ser apagada del todo. (En realidad no se han encontrado, en K.pneumoniae de tipo silvestre, condiciones donde éste promotor esté activo. Es probable que el análisis no haya sido suficientemente

Nota 1. En los siguiente párrafos, cuando no se especifique alguna otra referencia, la información respecto a los promotores de Anabaena, Klebsiella y coli provienen de las referencias 95,96 y -1.

sensible o exhaustivo). En E.coli y Anabaena este promotor tiene una más alta expresión en exceso de nitrógeno que en limitación del mismo. Además, en los tres casos, el segundo promotor se parece al "promotor consenso" de E.coli, -- mientras que el primer promotor en ningún caso se parece a éste consenso; pareciéndose, en cambio, a los promotores "nif" (97).

El segundo promotor de Anabaena se expresa en E.coli - en condiciones de exceso de nitrógeno. Por otro lado, en una E.coli glnG<sup>-</sup>, dicho promotor se expresa, aunque desreguladamente, tanto en exceso como en limitación de nitrógeno. No se han probado otras condiciones tales como limitación de nitrógeno en presencia de glnG. Sería interesante ver si en tales condiciones la similitud entre los genes glnA de Anabaena y de E.coli se mantiene.

Anabaena y Klebsiella tienen la posibilidad de fijar nitrógeno molecular. En las condiciones en la que esto sucede, el primer promotor de glnA está inducido, mientras el segundo promotor está reprimido. Dado que la fijación de nitrógeno es reprimida por la presencia de amonio en el medio, esto pudiera ser una correlación accidental. Sin embargo en Klebsiella se sabe que en realidad existe una regulación cruzada (96,97). En este caso el producto de nifA, un regulador de los genes involucrados en la fijación de nitrógeno, puede, si se encuentra en gran abundancia, funcionar como un activador del promotor proximal de glnA.

Desgraciadamente se sabe poco respecto a los reguladores de glnA en Anabaena. Por otro lado, en Klebsiella parece existir un sistema de regulación muy similar a E.coli. Como en E.coli, se han identificado los genes glnF, glnG y glnL (llamados ntrA, ntrB y ntrC, pero que aquí, por claridad, designaremos con el nombre dado en E.coli). Además de que la organización de estos genes en E.coli y en Klebsiella se asemeja, la expresión de glnA y el sistema de regulación Ntr, o Reg, también tienen una gran similitud.

En cuanto a la regulación de los dos promotores de glnA el trabajo realizado en Klebsiella indica los siguientes paralelismos con nuestros resultados en E.coli. El promotor proximal es activado por los productos de glnF y glnG en limitación de nitrógeno. El promotor distal es reprimido por el producto de glnG. En ambos casos el producto de glnL parece ser un represor de éste promotor. En Klebsiella no hay represión completa del promotor distal en ausencia de glnL. En correlación con esto, en nuestro caso parece haber una elevación en los niveles de TglnA, en una cepa glnL en alto amonio. Una diferencia importante entre ambos sistemas es que en Klebsiella el producto de glnL parece requerirse para la activación del promotor proximal, mientras que en E.coli tal dependencia no existe.

Es interesante el que hayan todas esas similitudes ya que no son el resultado de una divergencia reducida. Por un lado E.coli y Anabaena están muy poco relacionadas. Por otro lado, E.coli y K.pneumoniae, aunque son parientes cer-

canos, utilizan secuencias distintas para la expresión de glnA. Alineando, en virtud a su alta homología, las regiones de control de glnA de estos dos microorganismos, se ve que los promotores usados no corresponden exactamente. Estos datos sugieren que una función común ha encontrado soluciones similares, aunque no idénticas, en estos tres organismos. ¿Cuál es esa función que exige tal mecanismo de regulación?... Desafortunadamente no se han analizado mutantes donde la expresión del promotor distal haya sido eliminada. De momento sólo podemos jugar un poco a especular.

Existen distintos tipos de hipótesis para explicar la conveniencia de dos promotores en un sistema:

A) El primer tipo plantea una imposibilidad física para lograr una curva de expresión de ciertas características deseadas como respuesta a una curva señal. Como un ejemplo imaginario digamos que fuese fisiológicamente conveniente que los niveles de expresión de un sistema cambien exponencialmente respecto al cambio lineal de una señal. Las hipótesis de imposibilidad física explicarían la presencia de más de un promotor, asumiendo que existen limitaciones inherentes a las proteínas y el DNA que impiden contruir un sistema con sólo un promotor el cual responda con una curva -- exponencial al cambio de la señal reguladora y que con dos, o varios promotores es posible asemejar la expresión deseada más adecuadamente.

B) Las hipótesis de un segundo tipo plantean que algunos promotores son una especie de sistema de seguridad. Es



decir, que en caso de que, debido a mutaciones o a condiciones radicalmente distintas, el promotor principal dejara de funcionar, un promotor secundario garantizaría una expresión que permitiese el crecimiento de la bacteria. El promotor secundario sería insensible a la catástrofe o, más aún, se prendería por ella.

C) El tercer tipo de hipótesis propone la existencia de más de un promotor como un mecanismo para aumentar los grados de libertad de un sistema. En el caso de dos promotores, A y B, estas hipótesis asumen que la expresión de éstos se puede comportar como no acoplada. Es decir que a partir de conocer la expresión de A no hay ninguna función (en el sentido matemático) que permita predecir la expresión de B, pues para una expresión Ax, existen una serie de expresiones alternativas Bx, By, Bz, etc. Esto implica, forzosamente, que existe al menos una señal que no es común a A y B. Implica también, que al menos alguno de los reguladores no es compartido. Si, por ejemplo, un sistema de dos promotores se regula con una sola proteína, ésta tiene necesariamente al menos tres estados: uno que afecta a A, otro que afecta a B y otro que no afecta, como regulador, a ninguno de los dos.

Estos tres tipos de hipótesis no son excluyentes y puede ser que sean simultáneamente ciertos. Sin embargo, las hipótesis del tercer tipo, debido a la versatilidad que plantean y al tipo de conceptos que manejan, parecen, intuitivamente, encerrar un significado biológico más relevante.

Para el caso de los dos promotores de glnA nuestras hipótesis favoritas pertenecen a esta categoría.

Aunque debemos reconocer que no hemos ensayado muchas condiciones de crecimiento, cabe recordar que sólo hemos visto una expresión significativa de PglnA<sub>1</sub> cuando la limitación de carbono es determinante de la velocidad de crecimiento de la bacteria. Esto, y el hecho de existir muy cerca de PglnA<sub>1</sub> un posible sitio de reconocimiento para la proteína CAP, nos ha inducido a pensar que este promotor está sujeto a una regulación por carbono que no comparte con PglnA<sub>2</sub>. Lo atractivo de esta posibilidad es que sitúa a PglnA<sub>1</sub> como un punto importante para regular el equilibrio necesario entre los metabolismos del nitrógeno y del carbono.

Otra de las explicaciones que nos gusta proviene de la sugerencia, hecha por Little y Brenner (98), de que existan en E.coli dos estados posibles para la RNA-polimerasa, el balance de los cuales afectaría diferencialmente la expresión de todos los genes de la bacteria. Es posible que TglnA<sub>1</sub> sea transcrito preferencialmente por un estado de polimerasa y TglnA<sub>2</sub> por el otro. Esta posibilidad se hace, de alguna forma, más interesante por el hecho de que quizás glnF codifique para una especie de subunidad sigma (99,100). En este sentido hay que recordar que PglnA<sub>2</sub> no se parece al "promotor concenso" de E.coli y sí a los promotores "nif" de Kleibsellia lo cual invita a pensar que es reconocido por una RNA-polimerasa distinta a la que reconoce a la mayo

ria de los promotores de E.coli.

Las hipótesis expuestas, y mucho de lo que se ha planteado en esta discusión, encuentran contrargumentos en datos ya existentes. En ningún caso la interpretación es única; pero en esto reside el encanto del sistema. A veces la elección de una alternativa es cuestión de intuición o, en dado caso, de sensibilidad estética.

Al final de la discusión del artículo incluido se presenta un modelo de regulación. Sin duda es una belleza de simplificación descriptiva... pronto estará obsoleto: habrá uno más amplio y detallado. Eso no está mal, pero lo que más motiva el inquirir científico es el pasar del describir al entender. Después de todo, no hay placer mayor que el concluir que nuestra lógica estaba equivocada: que la bacteria tenía razón !

## Referencias.

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

16. Shanmugan, K. T. y Morandi, C. (1976). BBA. 437: 322.
17. Senior, P. J. J. Bacteriol. 123: 407
18. Stadman, E. R. Ginsburg, A., Ciardi, J. E., Yeh, J., Henning, S. B. y Shapiro, B. M. (1970). Adv. Enzyme Regul. 8: 99.
19. De Leo, A. B. y Magasanik, B. (1975). J. Bacteriol. 121: 313.
20. Pahel, G., Zelenetz, A. D. y Tyler, B. (1978) J. Bacteriol 133: 139.
21. Streicher, S. L., Bender, R. A. y Magasanik, B. (1975) J. Bacteriol. 121: 320.
22. Kuštu, S. G., Mckereghan, K. (1975). J. Bacteriol. 122: 1006.
23. Covarrubias, A. A., Sánchez-Pescador, R., Osorio, A., Bolívar, F. y Bastarrachea, F. (1980). Plasmid. 3: 150.
24. Rothstein, D. M., y Magasanik, B. (1980). J. Bacteriol. 141: 671.
25. Osorio, A. V., Servín-González, L., Rocha, M., Covarrubias, A. A., y Bastarrachea, F. (1983). Manuscrito en preparación.
26. Pahel, G., y Tyler, B. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 76: 4544.
27. Prival, M. J., Brenchley, J. E., y Magasanik, B. (1973). J. Biol. Chem. 248: 4334.
28. Rothman, R., Rothstein, D. M. Foor, F. y Magasanik, B. (1982). J. Bacteriol. 150: 221.
29. Rothstein, D. M., Pahel, G. Tyler, B., y Magasanik, B. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 7372.
30. Bastarrachea, F. Brom, S., Covarrubias, A. A., Osorio, A. y Bolívar F. (1980). En "Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation", eds. J. Mora y R. Palacios, pp. 107, New York, Academic Press.
31. García, E., Bancroft, S., Rhee, S. G. y Kustu, S. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 1662.
32. Friedrich, B., y Magasanik, B. (1979). J. Bacteriol. 137: 1127.
33. Fuchs, R. L., Madonna, M. J. y Brenchley, J. E. (1982). J. Bacteriol. 149: 906.

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

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

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

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

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

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



86. Rocha, M., Vázquez, Mh., Garcíarrubio A., Covarrubias, A.A. (1985) Gene, sometido.
87. Veno-Nishio, S., Mango, S., Reitzer, L.J. y Magasanik, B. (1984) J. Bacteriol. 160: 379
88. Osorio, V.A., Servin-González, L., Rocha, M., Covarrubias, A.A. y Bastarrachea, F. (1984) Mol. Gen. Genet. 194: 114.
89. León, P., Romero, D., Garcíarrubio, A., Bastarrachea, F., y Covarrubias, A.A. (1985). Mol. Gen. Genet., so metido.
90. Covarrubias, A.A. y Bastarrachea, F. (1983) Mol. Gen. Genet. 190: 171
91. Thomas, P.S. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 5201
92. Gansing, K. (1977) J. Mol. Biol. 115: 335
93. Von Hippel P.H., Bear D.G., Morgan, D.W. y McSwiggen, J.A. (1984) Ann, Rev. Biochem. 53: 389
94. Reitzer, L.J. y Magasanik, B. (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 5554
95. Tumer, N.F., Robinson, S.J. y Haselkorn, R. (1983) Nature, 306: 337
96. Dixon, R. (1984), Nuc. Acid. Res. 12: 7811
97. Ansubel, F.M. (1984) Cell. 37: 5
98. Little, R y Bremer, H. (1984). J. Bacteriol. 159:863
99. de Bruijn, F.T., y Ansubel, F.M. (1981). Mol. Gen. Genet. 183: 289.

100. Dixon, R., Alvarez-Morales, A., Clements, J.,  
Drummond, M., Merrick, M. y Postgate, J.R. en  
Advances in Nitrogen Fixation Research.  
Veeger, C. y Newton, W.E., editores.

BIBLIOTECA  
JUAN A. ESCALANTE  
UNIDAD ACADÉMICA DE  
LOS CICLOS PROFESIONAL  
Y DE POSGRADO / CCH  
UNAM