

03062
1ej-10

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

CARACTERIZACION FISICA DEL GENE QUE CODIFICA PARA LA DES-
HIDROGENASA GLUTAMICA DE ESCHERICHIA COLI K-12.

Tesis que para obtener el grado de
MAESTRA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
p r e s e n t a
ELVIRA SANVICENTE AÑORVE .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D.F.

Octubre de 1983.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**Esta tesis se llevó a cabo en el
Departamento de Biología Molecular
del Instituto de Investigaciones Biomédicas,
y en el Departamento de Genética Molecular
del Centro de Investigación sobre Ingeniería
Genética y Biotecnología,
de la Universidad Nacional Autónoma de México.**

**Se realizó bajo la supervisión directa
del Dr. FRANCISCO G. BOLIVAR ZAPATA.**

CONTENIDO

I. INTRODUCCION

1. Esquema general de la asimilación de nitrógeno en compuestos orgánicos
2. Deshidrogenasa glutámica:
 - A. Importancia
 - B. Distribución
 - C. Genética y Regulación
3. Justificación de la tesis
4. Objetivo de la tesis
5. Enumeración del trabajo experimental realizado

II. MATERIALES Y METODOS

Se enlistan en las publicaciones que se anexan

III. RESULTADOS

- A. Localización de la región cromosomal del plásmido pRSP1 que complementa la mutación gdh-1 en la cepa PA340
 1. Construcción de los derivados del pRSP1
 - 1.1 Plásmido pRSP4
 - 1.2 Plásmido pRSP5
 2. Construcción de los derivados del pRSP5
 - 2.1 Plásmido pSAE1
 - 2.2 Plásmido pSAE4
- B. Naturaleza de la región clonada que complementa la mutación gdh-1 en la cepa PA340

3. Determinación de la actividad específica de GDH
4. Electroforesis de las proteínas codificadas por los plásmidos
 - 4.1 Electroforesis en una dimensión
 - 4.2 Electroforesis en dos dimensiones
5. Inmunoprecipitación específica de la GDH
 - 5.1 Inmunoprecipitación cualitativa
 - 5.2 Nivel de GDH producida por la cepa PA340 sola y portando los diferentes plásmidos recombinantes: inmunoprecipitación electroforética cuantitativa
- C. Localización de la región de iniciación de la transcripción del gene gdh y determinación de la dirección de transcripción de dicho gene
6. Construcción de los derivados del pSAE4
 - 6.1 Plásmido pSAE41
 - 6.2 Plásmido pSAE42
7. Derivados del pSAE42
 - 7.1 Plásmido pSAE421
 - 7.2 Plásmido pSAE422
- D. Determinación de la secuencia nucleotídica del fragmento HpaI-PstI del plásmido pSAE4
 8. Determinación de la secuencia nucleotídica
 9. Análisis y características de la secuencia obtenida
- E. Comparación de la región amino terminal de la GDH de E. coli con otras GDHs

IV. PUBLICACIONES

1. Recombinant plasmids carrying the glutamate dehydrogenase structural gene from Escherichia coli K-12. Gene, 17 (1982) 1-8.
2. Evidencias bioquímicas de la presencia del gene estructural de la deshidrogenasa glutámica de E. coli K-12 en plásmidos recombinantes. Bol. Estud. Méd. Biol., Méx., 32: 225-232, 1983.
3. Nucleotide sequence of the promoter and amino-terminal coding region of the glutamate dehydrogenase - structural gene of Escherichia coli Gene, (1983).

V. DISCUSION

VI. CONCLUSIONES

VII. BIBLIOGRAFIA

ABREVIATURAS

GDH: deshidrogenasa glutámica

GOGAT: glutamato sintasa

GS: glutamino sintetasa

Md: megadaltones

d: daltones

pb: pares de bases

PM: peso molecular

INTRODUCCION

El nitrógeno es uno de los elementos indispensables para la vida celular. Los microorganismos utilizan amonio y una gran variedad de compuestos nitrogenados, tanto orgánicos como inorgánicos, como fuentes de nitrógeno celular. Todos estos compuestos pueden convertirse por medios enzimáticos a amonio (30, 34). La manera exacta de utilizar dichos compuestos es una característica de cada organismo (18).

En las enterobacterias, así como en la mayoría de los organismos, los aminoácidos L-glutamato, L-glutamina y L-asparagina poseen un papel esencial en la asimilación de nitrógeno: todo el nitrógeno asimilado a partir de amonio en el medio entra al metabolismo celular como el grupo amino del glutamato o como el grupo amido de la glutamina o asparagina (30, 34, 43, 44). En las reacciones biosintéticas, glutamato, glutamina y aspartato son los intermediarios celulares claves en la síntesis de compuestos nitrogenados; además, los tres compuestos son fácilmente interconvertibles (26, 30, 44).

El ácido glutámico no sólo proporciona todo o una porción de su esqueleto carbonado para la síntesis de los aminoácidos de la "familia del ácido glutámico" (glutamina, prolina y arginina) o para la generación de energía en el ciclo del ácido tricarboxílico, sino también actúa como un grupo amino donador en la síntesis de prácticamente todos los aminoácidos mediante reacciones de transaminación (44). A través de su conversión a glutamina y aspartato (26), puede canalizarse a otros compuestos.

El grupo amido de la glutamina es utilizado en la biosín

tesis de aminoazúcares, aminoácidos, nucleótidos y cofactores (30, 43).

El aspartato participa también, como amino donador, en numerosas reacciones biosintéticas (30).

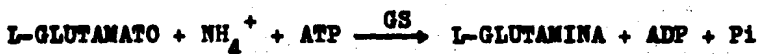
De esta manera, la interconversión de glutamato, glutamina y aspartato, está situada en una encrucijada donde las vías metabólicas del nitrógeno y de carbohidratos interseccionan.

En la mayoría de los organismos, incluyendo Escherichia coli y otras enterobacterias, tres enzimas juegan un papel muy importante en la biosíntesis de glutamato y glutamina (26, 30, 43, 44):

El glutamato puede producirse mediante la aminación reductiva del 2-oxoglutarato a través de una reacción reversible catalizada por la deshidrogenasa glutámica (L-glutamato: NADP⁺ óxido-reductasa, EC 1.4.1.4) (GDH):

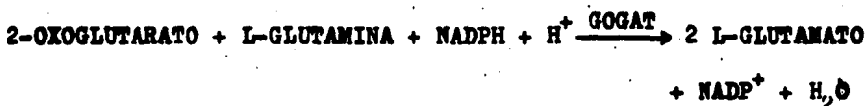


La glutamina es producida por una reacción única catalizada por la glutamina sintetasa (L-glutamato: amonio ligasa, EC 6.3.1.2) (GS):



Sin embargo, algunos microorganismos carecen de la GDH y la aminación del 2-oxoglutarato la llevan a cabo a expensas del grupo amido de la glutamina (con el consecuente gasto previo de ATP). La glutamato sintasa (L-glutamato: NADP⁺ óxido-

reductasa, EC 1.4.1.3) (GOGAT) cataliza esta reacción:



Esta reacción es utilizada también en muchos organismos cuando el amonio en el medio está en cantidades limitantes o cuando es suministrado lentamente por la desaminación enzimática de otras fuentes nitrogenadas. En tales casos, casi todo el amonio que entra a la poza metabólica lo hace vía GS, debido a que esta enzima posee una mayor afinidad por el amonio que la GDH (además el equilibrio de la reacción se favorece debido a la hidrólisis de ATP) (30, 32).

En enterobacterias se ha establecido que las enzimas GDH y GOGAT pueden funcionar independientemente para proporcionar suficiente glutamato para crecer cuando el amonio disponible está en exceso. Las mutantes que carecen de GOGAT no crecen cuando el amonio está en bajas concentraciones o cuando es generado a partir de otras fuentes de nitrógeno. Las mutantes que carecen de GDH crecen bien en concentraciones altas y bajas de amonio o en otras fuentes de nitrógeno. La pérdida de ambas actividades es necesaria para producir un auxótrofo de glutamato (6, 9, 10).

Existen otras formas para la obtención de glutamato por la célula: como producto directo de la degradación de ciertos aminoácidos, a partir de los grupos amino de otros aminoácidos y 2-oxoglutarato por una reacción de transaminación y, en ausencia de GOGAT, por acción de la glutaminasa sobre la glutamina (43).

De esta manera, la interacción existente entre GS, GDH y GOGAT principalmente, determinará los niveles de 2-oxoglutarato, glutamato y glutamina existentes dentro de la célula y por lo tanto, la disponibilidad del nitrógeno para el metabolismo celular.

A continuación se presenta una revisión sobre las deshidrogenasas glutámicas, con atención especial a las de enterobacterias.

A. IMPORTANCIA

La DESHIDROGENASA GLUTAMICA, como se mencionó, cataliza la interconversión de 2-oxoglutarato y L-glutamato en una reacción reversible que utiliza NAD (EC 1.4.1.2) o NADP (EC 1.4.1.4). Esta enzima puede funcionar tanto en asimilación de amonio (que indudablemente es el papel primario de la enzima en numerosos organismos) como en la oxidación de glutamato (30, 41, 43).

Es claro que esta enzima es importante ya que proporciona una ruta para la incorporación de nitrógeno en compuestos orgánicos, por la posición central que ocupan glutamato y 2-oxoglutarato en el metabolismo celular y la habilidad de estos compuestos de entrar en muchos tipos de vías. Por tanto, esta enzima constituye un puente entre el metabolismo de carbohidratos y el metabolismo de aminoácidos.

Hay por lo menos tres tipos de GDHs las cuales difieren en su especificidad por la coenzima: aquéllas que son específicas para a) NAD, para b) NADP y c) aquéllas que pueden funcionar con ambos cofactores. Muchas especies contienen ambas GDHs coenzima-específicas (GDH-NAD y GDH-NADP). Aunque las reac

ciones de las GDH-NAD y GDH-NADP son reversibles, se les ha atribuido un determinado papel biológico. En microorganismos NAD dependientes, las GDHs parecen tener una función catabólica, mientras que las que utilizan NADP (en su forma reducida) sirven primariamente para la biosíntesis de glutamato (30, 41).

Es esencial notar que estas enzimas varían también en otras propiedades, por ejemplo, inducción y represión de su síntesis por metabolitos, regulación de la actividad por nucleótidos purínicos di y trifosfatados (ADP, ATP, GDP, GTP) y otros ligandos, y en sus propiedades moleculares (41).

B. DISTRIBUCION

Las GDHs están ampliamente distribuidas, sólo unos cuantos organismos carecen de ellas. Mientras que las GDHs provenientes de los tejidos animales pueden utilizar tanto NAD como NADP, las enzimas de otros orígenes casi siempre son específicas para una de estas coenzimas (41).

Las bacterias entéricas poseen sólo una GDH-NADP dependiente. En E. coli y Salmonella typhimurium esta enzima es sólo biosintética, pero estos organismos pueden metabolizar glutamato por otras rutas. Estudios sobre mutantes de E. coli, que crecen en medio mínimo con glutamato como única fuente de carbono, sugieren que el glutamato es utilizado principalmente por transaminación con oxalacetato y el aspartato producido forma fumarato por acción de una aspartasa (30, 44).

C. GENETICA Y REGULACION ENZIMATICA

La regulación de la biosíntesis de aminoácidos, en este caso glutamato, ocurre a dos niveles: a) regulación de la acti

vidad enzimática o flujo metabólico y b) regulación de la sin tesis de enzima o expresión génica.

Se han descrito diversos mecanismos reguladores de repre sión y atenuación para las vías biosintéticas de ciertos aminoácidos. En la mayoría de estas vías, los aminoácidos son usados sólo para síntesis de proteínas. Los aminoácidos gluta mato y glutamina, sin embargo, difieren de ellos debido a que son usados como donadores de grupos amino y amido para otros compuestos nitrogenados, que a su vez son necesarios para bio síntesis de proteínas. Por tanto, la regulación de las tres enzimas que sintetizan glutamato y glutamina puede tener algu nas características especiales además, o en vez de, los elementos de control común a otras vías biosintéticas (30, 44).

En muchos microorganismos la formación de estas enzimas está regulada por la disponibilidad de amonio en el medio de cultivo (30, 43). Este control por nitrógeno de la síntesis de enzima (que no necesariamente es el único) impide la producción innecesaria de enzima y el rompimiento incontrolado de compuestos que pudieran ser de valor para la célula en sus propósitos biosintéticos.

Mucho del trabajo fisiológico y genético que examina la regulación de la utilización de nitrógeno, se ha enfocado a la enzima responsable de la biosíntesis de glutamina (GS) más que a las enzimas que biosintetizan glutamato. Esto condujo origi nalmente a Magasanik y colaboradores a formular un modelo (5, 31) en el cual el principal regulador de la asimilación de nitrógeno era la GS. Postularon que la GS era responsable no sólo de la biosíntesis de glutamina y la asimilación de nitrógeno en glutamato, sino también para la activación de la transcrip

ción de operones tales como hut y put. En los últimos seis años estudios realizados en E. coli, S. typhimurium, Klebsiella aerogenes y K. pneumoniae, han demostrado que la GS no es la proteína reguladora y en su lugar se han considerado los productos de, al menos, seis genes específicos (glnF, glnG, glnD, glnB, glnE y glnL) (30).

Las enzimas que sintetizan glutamato, sin embargo, tienen características que hacen el estudio de su regulación particularmente interesante.

En algunas bacterias, principalmente entre las pertenecientes a las enterobacterias, se ha estado estudiando la regulación de la GDH por un mecanismo de represión-desrepresión (28, 30, 43).

En E. coli, K. aerogenes y S. typhimurium, las mutantes que carecen de GDH no requieren glutamato para vivir. Derivados de estas mutantes gdhA, que tienen una mutación adicional en alguno de los dos genes para GOGAT (gltB), son auxótrofas de glutamato (6, 9, 10, 30, 43). Las cepas que contienen ambas mutaciones (gdhA, gltB) se han utilizado para localizar el gen gdh en el minuto 26.7 del mapa de E. coli. El orden de los genes es purB-gdhA-trp en el cromosoma de E. coli (35), gdhA-trp-pyrF en K. aerogenes (4) y pyrD-pncA-gdhA-nit-trp en S. typhimurium (37). En estos organismos, y en K. pneumoniae, las cepas que carecen de la actividad de GDH no tienen un fenotipo fácilmente discernible: tales mutantes crecen tan bien como la cepa silvestre en concentraciones altas y bajas de amonio y en algunas otras fuentes de nitrógeno. Las cepas gltB crecen en medio mínimo que contenga altas concentraciones de amonio pero son incapaces de crecer en bajas concentraciones

de amonio o en una variedad de otros compuestos orgánicos como única fuente de nitrógeno (fenotipo Asm^-) (10, 35). Mutantes Asm^- de Klebsiella no crecen en 1 mM de amonio como única fuente de nitrógeno, pero las mutantes Asm^- de E. coli sí lo hacen y dejan de crecer a una concentración de 0.1 mM de amonio (la cepa silvestre de E. coli si crece a esta concentración, aunque lentamente) (30).

Muy utilizada en este trabajo fue la cepa de E. coli PA340, una doble mutante (gdh-1, gltB31) (6). Glutamato, glutamina y aspartato, suplementan la auxotrofia por glutamato que presenta esta cepa. De ellos, sólo aspartato conduce a una velocidad normal de crecimiento semejante a la de la cepa silvestre, ya que tanto glutamato como glutamina son transportados muy lentamente a través de la membrana celular.

En E. coli, las K_m para los substratos de las enzimas productoras de glutamato son aproximadamente las siguientes (39, 41):

Substrato	K_m (μM)	
	GDH	GOGAT
2-oxoglutarato	640	36
amonio	1100	
glutamina		300
glutamato	1300	---
NADPH	40	8.5
NADP ⁺	42	---

(Las constantes del glutamato y NADP⁺ para GOGAT no se determinaron porque la reacción de aminación es virtualmente irreversible).

Estos datos sugieren que en las células que crecen bajo condiciones limitantes de amonio, la GDH es relativamente inefectiva en la asimilación de nitrógeno. Los valores para GOGAT son de 4 a 20 veces más bajos que los correspondientes de GDH, lo cual es consistente con el papel "in vivo" propuesto para la GOGAT (24, 39, 41).

En K. aerogenes (y K. pneumoniae) la GDH está sujeta a una regulación muy estricta; su síntesis está regulada por componentes del sistema gln. En estas bacterias el nivel de GDH está inversamente relacionado al nivel de GS; si crecen en una fuente de nitrógeno limitante se incrementa el nivel de GS y disminuye el de GDH, lo contrario sucede cuando crecen en una alta concentración de amonio (3, 10, 27, 30).

En estos organismos una pérdida de GOGAT parece interferir con la desrepresión de GS a niveles bajos de amonio, además, son incapaces de utilizar como fuente de nitrógeno aminoácidos que son convertidos a glutamato, tales como histidina, pero pueden usar glutamato como fuente de nitrógeno. Por el contrario, la pérdida de GDH no afecta el nivel de GS (10, 30).

Mutantes de K. aerogenes que carecen de GS, contienen altos niveles de GDH tanto en concentraciones limitantes como en exceso de amonio (3, 35). En mutantes en las cuales la GS está producida en altos niveles bajo todas las condiciones (GS constitutiva, fenotipo GlnC), los niveles de GDH están severamente reprimidos, aun con exceso de amonio en el medio, y la cepa es fenotípicamente Gdh⁻. Así, una cepa GlnC que lleve una mutación gltB (fenotipo Asm⁻) requiere glutamato para cre

cer en medio mínimo con glucosa y amonio, aun cuando genéticamente sea gdh⁺ (3, 10, 35).

En estas mutantes (glnL, gltB) (GlnC, Asm⁻) se han detectado mutaciones muy cercanas a gdh, que rehabilitan a la célula con la capacidad de producir GDH, independientemente de la mutación glnL (4, 30). Otros supresores de este defecto tienen un efecto pleiotrópico: la adquisición de la habilidad para producir GDH está acompañada por la inhabilidad de utilizar histidina o prolina como fuente de nitrógeno (30).

Es entonces probable que independientemente de esta regulación por el sistema gln, otro sistema actúe para regular los niveles de GDH en K. aerogenes. El crecimiento en histidina como única fuente de carbono y nitrógeno conduce a una reducción de 2 a 3 veces en los niveles de GDH, aun cuando el nivel de GS sea muy bajo (en cepas silvestres) o completamente ausente (en mutantes glnA) (30, 39).

En E. coli poco se conoce acerca de la regulación de su GDH. En este organismo el nivel de GDH creciendo con o sin exceso de amonio es el mismo. En contraste, el nivel de GS aumenta cuando crece en fuentes pobres de nitrógeno (amonio bajo, prolina, arginina, etc.) y disminuye cuando crece en amonio alto (30, 43).

Los primeros estudios, realizados conjuntamente con K. aerogenes, demostraron claramente que en E. coli la expresión de gdh no está bajo el control del sistema gln (el sistema gln fue manejado en un principio como el modelo de regulación por GS de Nagasnik) (5, 31). Estos trabajos preliminares indicaban que la GS de E. coli (GS_E) era capaz de regular la expre-

sión de genes nativos en K. aerogenes (GS^-) tan bien como su propia GS_K (35, 42). Además, que la GS_E era también capaz de regular los genes de utilización de histidina (hut) tanto de K. aerogenes como de S. typhimurium cuando éstos se encontraban en el citoplasma de E. coli (7). Estos estudios sugirieron inicialmente que la GS poseía la habilidad de regular la expresión de los genes involucrados en la asimilación de nitrógeno (modelo de Boris Magasanik) y que E. coli tiene todos los componentes necesarios para la regulación de genes nativos, de aquí que algún(os) otro(s) factor(es) fuera(n) responsable(s) de que la GDH_E no sea reprimida cuando los niveles de GS_E están altos (35). Un lugar lógico donde colocar este factor sería en la región reguladora de gdhA de E. coli.

Otros datos reforzaban lo anterior: al introducir un epísona de E. coli que contenga gdhA-trp a la cepa de K. aerogenes auxótrofa de glutamato ($GlnC$, Asm^-) y que además sea Trp^- , las exconjugantes Trp^+ ya no requieren de glutamato para crecer. Estos datos sugieren que alguna región de control presente en el epísona que lleva gdhA de E. coli es la responsable de que la síntesis de GDH no sea reprimida cuando el nivel de GS está alto (35).

En trabajos posteriores se ha observado también que la síntesis de esta enzima no está afectada por mutaciones gln (30).

Es poco probable que la GDH juegue algún papel catabólico en E. coli, ya que cuando las células crecen en glutamato resulta una represión de GDH (y una alta actividad de GS). Las mutantes que carecen de GDH crecen, aunque lentamente, en glutamato como fuente de carbono (30, 32, 35).

Prusiner y colaboradores (36) encontraron que si en cultivos de E. coli se adiciona AMPc, se incrementan los niveles de GDH y GS y disminuye el nivel de GOGAT. Estas alteraciones requieren de proteína receptora de AMPc (CRP). El cloramfenicol anula los efectos de AMPc, resultado que sugiere que la síntesis de proteínas es necesaria para que ocurran estos cambios en los niveles enzimáticos. Los efectos de AMPc sobre los niveles de GDH, GS y GOGAT son, por consiguiente, tanto de regulación positiva como de regulación negativa, y pueden tener un papel importante en la regulación celular del metabolismo de nitrógeno. En general, se ha observado que las enzimas bacterianas que están bajo control positivo por AMPc están sujetas a represión catabólica por glucosa.

En cuanto a S. typhimurium, la síntesis de GDH no está afectada por mutaciones gln⁻ (9, 20, 25, 30) (como en E. coli). En este organismo la función de GDH es interesante debido a que esta actividad enzimática no varía durante el crecimiento celular en diferentes fuentes nitrogenadas; a semejanza de E. coli, la síntesis de GDH no está reprimida en células presentes en medios pobres de nitrógeno, y a diferencia de E. coli, la GDH en S. typhimurium no está reprimida por glutamato (9, 43). Sin embargo, el valor relativo de las K_m de esta enzima para 2-oxoglutarato y glutamato sugieren fuertemente que la GDH de Salmonella posee sólo capacidad biosintética (41).

Brenchley y colaboradores (38) analizaron en S. typhimurium el efecto de las mutaciones relA1 e hisT1504 sobre la regulación de las enzimas GDH, GOGAT y GS. Sus resultados demuestran que bajo las condiciones empleadas, la síntesis de es

tas enzimas es dependiente del producto del gene relA o de alguna función mediada por él; este efecto es particularmente dramático para la GDH. Encontraron también que bajo ciertas condiciones, las mutantes hisT1504 mostraban una desrepresión importante en la actividad enzimática de GDH.

Este mismo grupo clonó en el pBR328 el gene gdhA de S. typhimurium y se observó que la actividad de GDH se incrementa de 30 a 100 veces con respecto al nivel de las células haploides, cuando las células crecen en medio glucosa-amonio. La regulación del gene clonado se refleja en niveles más bajos de GDH en células que crecen en triptona-extracto de levadura o en medio suplementado con glutamato y aspartato. Además; las células que portan estos plásmidos tienen un requerimiento parcial para metionina y lisina, sugiriendo una alteración en el flujo de metabolitos a través del ciclo del ácido tricarbóxico.

JUSTIFICACION DE LA TESIS

La asimilación de nitrógeno en compuestos orgánicos y el flujo de estos metabolitos a través de las diferentes vías, es esencial para el crecimiento celular. Por tanto, es interesante y conveniente conocer a fondo estos mecanismos.

De aquí se desprende la importancia de contar con los genes objetos de este estudio en sistemas discretos y de fácil manipulación.

La recombinación "in vitro" de ácidos nucleicos nos ofrece la posibilidad de disectar y aislar las regiones del genoma involucradas en la asimilación y metabolismo del nitrógeno.

Los estudios que pueden entonces llevarse a cabo en este campo con cada gene particular, completan y facilitan la comprensión de los importantes trabajos fisiológicos y genéticos. Estos estudios se refieren a la organización y caracterización física del gene, al análisis de su expresión en diferentes condiciones fisiológicas y ambientes genéticos, a producir y analizar mutaciones dirigidas, a deducir las propiedades moleculares de la proteína codificada, entre otros.

A través de todo este tipo de experimentos puede llegar a comprenderse la regulación de la expresión genética y modificar, si así se desea, ciertos mecanismos básicos de la regulación o estructura de la proteína.

OBJETIVO

Las diferencias en síntesis, comportamiento y propiedades moleculares de las GDHs de diversos orígenes son aun poco comprendidas. Por ello, es benéfico poder manipular y trabajar con los genes aislados provenientes de diferentes especies, con el fin de poder realizar un extenso estudio comparativo.

El trabajo que se presenta en esta tesis está enfocado a la caracterización física del gene que codifica para la GDH de *E. coli*, lo que facilitará el entender mejor, o llevar a cabo, diversos estudios a nivel molecular, fisiológico, genético y biotecnológico.

Este trabajo forma parte de un proyecto muy grande que se realiza en colaboración con el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, de la UNAM, enfocado a esclarecer los mecanismos de asimilación y metabolismo del nitrógeno en diferentes organismos.

RESUMEN DEL TRABAJO REALIZADO

A continuación se anexan las publicaciones en las que la autora de esta tesis participó y se enlista el trabajo con el que colaboró en ellas:

1. Construcción del pRSP5 +
2. Purificación de la GDH y obtención de anticuerpos es específicos dirigidos contra ella +
3. Todos los experimentos que condujeron a la demostración de la presencia del gene estructural para la GDH en el plásmido pRSP5 (y en el pSAE4) +
4. Construcción del pSAE1 y pSAE4 (y algunos otros plásmidos no mencionados en esta tesis)
5. Construcción de los derivados del pSAE4 (pSAE41, pSAE42, pSAE421 y pSAE422)
6. Todos los experimentos que condujeron a las evidencias de la posible localización del promotor(es) y dirección de transcripción del gene gdh
7. Determinación de la secuencia nucleotídica del fragmento HpaI-PstI del pSAE4, localización de los sitios de restricción en esa región de DNA, inferencia de la secuencia aminoacídica de la proteína y comparación de ésta con la región amino-terminal de otras GDHs.

+ En colaboración con Ray Sánchez Pescador.

RESULTADOS

Antecedentes:

El plásmido pRSP1 fue aislado de un banco de genes de E. coli (11, 15, 16) y mostró complementar la mutación gdh-1 en la cepa PA340. Este plásmido contiene aproximadamente 4.6 Md de DNA cromosomal de E. coli K-12.

Para localizar la región de DNA cromosomal clonado en el pRSP1 que complementa dicha mutación, se construyeron varios derivados de él.

A. LOCALIZACION DE LA REGION CROMOSOMAL DEL PLASMIDO pRSP1 QUE COMPLEMENTA LA MUTACION gdh-1 EN LA CEPA PA340

1. Construcción de los derivados del pRSP1

De acuerdo con el mapa de restricción del plásmi do pRSP1 realizado previamente en nuestro laboratorio (Fig. 1, Sánchez Pescador et al, 1982), se subclonaron diversos fragmentos de este plásmido en el vehículo molecular pBR322.

1.1 El plásmido pRSP4 se obtuvo subclonando la re gión EcoRI-BglII del pRSP1 (coordenadas 5.1 a 6.9) (Fig. 1, Sánchez Pescador et al, 1982) en el pBR322, restringido con las enzimas EcoRI y BamHI. Este nuevo plásmido recombinante no mostró complementar la auxotrofia por ácido glutámico de la ce pa PA340. Además, el análisis electroforético de las proteínas codificadas por él, no mostraba la presencia de alguna proteí na que correspondiera al peso molecular (PM) del monómero de la GDH purificada de E. coli (dato no mostrado).

1.2 El plásmido pRSP5 se construyó al subclonar en el pBR322 el fragmento EcoRI-PstI del pRSP1 (coordenadas 5.1 y 9.2/0) (Fig. 1, Sánchez Pescador et al, 1982). Este plásmido

si fue capaz de complementar la auxotrofia por ácido glutámico de la cepa PA340.

Otro plásmido, el pRSP7, lleva el fragmento EcoRI-SalI (coordenadas 5.1 y 5.7 del pRSP1) (Fig.1, Sánchez Pescador et al, 1982) y tampoco fue capaz de complementar la auxotrofia por glutamato de la cepa mencionada (tabla II, Sánchez Pescador et al, 1982).

2. Construcción de los derivados del pRSP5

De acuerdo con los resultados mencionados, había dos posibles localizaciones para el gene gdh (ver sección B de resultados) en el pRSP1; una que el sitio reconocido por BglII formara parte del gene y la otra, que el gene se localizara entre los sitios de restricción de BglII y PstI (coordenadas 6.9 a 9.2/0) en el pRSP1 (Fig. 1, Sánchez Pescador et al, 1982).

2.1 Para discernir entre estas posibilidades, se mutagenizó "in vitro" el DNA del pRSP5 en el sitio de restricción de BglII por inserción de un oligonucleótido. Para ello se linearizó el pRSP5 con la enzima BglII, que genera extremos cohesivos, y se trató con nucleasa SI y con el fragmento Klenow de la polimerasa I de DNA para producir extremos rasurados. Se insertó en ese lugar un decanucleótido sintético cuya secuencia es reconocida por la enzima EcoRI. De esta manera se construyó el pSAE1 (Fig. 2, Sánchez Pescador et al, 1982; Fig.2, Sanvicente et al, 1983), que lleva dos sitios de EcoRI.

2.2 Por recircularización del fragmento grande de DNA producido por la digestión con EcoRI del pSAE1, se obtuvo el pSAB4 (Fig. 2, Sánchez Pescador et al, 1982; Fig. 2, San-

vicente et al, 1983). Este plásmido contiene aproximadamente 2.3 Md de DNA cromosomal.

Tanto el pSAE1 como el pSAE4 complementan la mutación gdh-1 de la cepa PA340 (tabla II, Sánchez Pescador et al, 1982), lo que localiza al gene estructural que codifica para la GDH (ver sección B de resultados) entre los sitios de restricción de BglII y PstI (coordenadas 6.9 y 9.2/0) en el pRSP1 (Fig. 1, Sánchez Pescador et al, 1982).

B. NATURALEZA DE LA REGION CLONADA QUE COMPLEMENTA LA MUTACION gdh-1 EN LA CEPA PA340

Con el fin de conocer si la región de DNA cromosomal clonada en el pRSP1, y por consiguiente en el pRSP5, pSAE1 y pSAE4, que complementa la auxotrofia por glutamato en la cepa PA340 era el gene estructural que codifica para la GDH de E. coli, además de determinar la actividad específica enzimática, se realizaron diversos ensayos bioquímicos con las proteínas codificadas por estos plásmidos (sintetizadas en un sistema de minicélulas).

3. Determinación de la actividad específica de GDH

En la tabla II (Sánchez Pescador et al, 1982) se muestran las actividades específicas de GDH encontradas en los extractos celulares de la cepa PA340 portando los diversos plásmidos construidos. Con los plásmidos pRSP1, pRSP5, pSAE1 y pSAE4, se observó un aumento de aproximadamente 2.5 veces en la actividad específica comparada con la encontrada en la cepa silvestre CS520.

4. Electroforesis de las proteínas codificadas por los plásmidos.

Para analizar las proteínas codificadas por los plásmidos pRSP1, pRSP5, pSAE1 y pSAE4, se transformó con cada uno de ellos la cepa productora de minicélulas, P678-54, y de igual manera con los plásmidos que sirvieron como vehículos moleculares. Las minicélulas purificadas de cada transformante se utilizan para sintetizar proteínas en presencia de ³⁵S-metionina.

4.1 Electroforesis en una dimensión

Las proteínas sintetizadas por las minicélulas se analizaron electroforéticamente en base a sus PMs, y se encontró que tanto el pRSP1, como el pRSP5, pSAE1 y pSAE4, codifican para un polipéptido de aproximadamente 50 000 d que comigra con el monómero purificado de GDH (Figs. 3A y 3B, Sanvicente et al, 1983).

4.2 Electroforesis en dos dimensiones

Para analizar también en base a su punto isoeléctrico a los polipéptidos codificados por estos plásmidos, se efectuó una electroforesis en dos dimensiones (siguiendo la técnica descrita por O'Farrel) de los extractos radioactivos de las minicélulas correspondientes, encontrándose que también aquí existe un polipéptido que comigra con el monómero purificado de GDH (Fig. 4, Sanvicente et al, 1983)

5. Inmunoprecipitación específica de la GDH

5.1 Inmunoprecipitación cualitativa

Para verificar que el polipéptido de 50 000 d codificado por los plásmidos pRSP1, pRSP5, pSAE1 y pSAE4 es

realmente el monómero de GDH, se llevó a cabo una inmunoprecipitación de la GDH codificada por estos plásmidos. Se utilizaron los extractos radioactivos de minicélulas y anticuerpos específicos anti-GDH. Se observó que sólo el polipéptido de 50 000 d inmunoprecipita específicamente (Fig. 5, Sanvicente et al, 1983; se muestra sólo un dato representativo).

5.2 Nivel de GDH producida por la cepa PA340 sola y portando los diferentes plásmidos recombinantes: inmunoprecipitación electroforética cuantitativa

Con el fin de detectar si la cepa PA340 sintetiza algún antígeno que cruce con los anticuerpos específicos anti-GDH, y si dicha cepa transformada con los diversos plásmidos sintetiza más antígeno GDH que la cepa silvestre CS520, se llevaron a cabo experimentos de inmunolectroforesis cuantitativa utilizando los extractos celulares correspondientes. Se observó que el extracto de la cepa silvestre presenta un nivel de antígeno GDH menor, aproximadamente del 30%, del nivel presentado por las cepas PA340/pRSP5 y PA340/pSAE4. Interesantemente, el extracto de la cepa PA340 presentó un nivel antigénico similar al de la cepa silvestre (Fig. 6, Sanvicente et al, 1983).

G. LOCALIZACION DE LA REGION DE INICIACION DE LA TRANSCRIPCION DEL GENE gdh Y DETERMINACION DE LA DIRECCION DE TRANSCRIPCION DE ESTE GENE

De acuerdo con los resultados anteriores, se ha localizado al gene gdh en un fragmento de DNA de aproximadamente 2.3 MB en el plásmido pSAE4, flanqueado por los sitios de restricción

de EcoRI y PstI (coordenadas 6.9 y 9.2/0 en el pRSP1). El mapa de restricción de este fragmento en el plásmido pSAE4 se muestra en la figura 3 (Sánchez Pescador et al., 1982). Este comprende dos sitios de HpaI, uno de ClaI y otro de PvuI.

Con el fin de localizar la región de iniciación de la transcripción del gene gdh y conocer también su dirección de transcripción, se contruyeron varios derivados del plásmido pSAE4.

6. Construcción de los derivados del pSAE4

6.1 El plásmido pSAE41 se construyó subclonando el fragmento EcoRI-ClaI del pSAE4 (de 1 000 pb en promedio) en el plásmido pBR322, digerido con las mismas endonucleasas (Fig. 3, Sánchez Pescador et al., 1982). Este plásmido no fue capaz de complementar la mutación gdh-1 en la cepa PA340 ni indujo la síntesis de algún polipéptido de origen cromosomal (línea b, Fig. 4C, Sánchez Pescador et al., 1982).

6.2 El plásmido pSAE42 se obtuvo al deletar el fragmento HpaI (de aproximadamente 1 300 pb) del pSAE4 (Fig. 3, Sánchez Pescador et al., 1982). Este plásmido tampoco logró complementar la auxotrofia por glutamato de la cepa PA340. El análisis electroforético de las proteínas codificadas por este plásmido muestra un polipéptido de aproximadamente 9 000 d, codificado por el DNA cromosomal, que no sintetiza el plásmido padre pSAE4 (líneas d y c, Fig. 4C, Sánchez Pescador et al., 1982). Esto sugiere que dicho polipéptido esté codificado por el gene gdh truncado, lo que hace localizar la región donde se inicia la transcripción del gene a aproximadamente 300 pb de uno de los dos sitios de HpaI presentes en el pSAE4 (Fig. 3, Sánchez Pescador et al., 1982).

Para discernir entre estas dos posibles localizaciones de la región donde se inicia la transcripción del gene gdh, se construyeron plásmidos derivados del pSAE42.

7. Derivados del pSAE42

7.1 Por delección de la región comprendida entre los sitios de HpaI y PstI del pSAE42, se construyó el plásmido pSAE421 (Fig. 3, Sánchez Pescador et al, 1982). Para ello se linearizó el DNA del pSAE42 con la endonucleasa PstI, tratándolo después con nucleasa SI para eliminar los extremos cohesivos generados. Se digirió posteriormente con la enzima HpaI y el fragmento grande de DNA se recircularizó usando ligasa de DNA de T_4 .

7.2 El plásmido pSAE422 es, por otra parte, una delección del fragmento HpaI-EcoRI del plásmido pSAE42 (Fig. 3, Sánchez Pescador et al, 1982). Este plásmido se obtuvo después de recircularizar el fragmento grande de DNA obtenido al tratar el plásmido padre, pSAE42, con las enzimas EcoRI, nucleasa SI y HpaI, en ese orden.

De estos dos derivados del pSAE42, sólo el pSAE422 fue capaz de codificar para un polipéptido de origen cromosomal que gruesamente comigra con el polipéptido codificado por el plásmido padre (líneas d, e y f, Fig. 4C, Sánchez Pescador et al, 1982).

De acuerdo con estos resultados, la región donde se inicia la transcripción del gene gdh se encontraría localizada a aproximadamente 300 pb del sitio de HpaI cercano a PstI en el pSAE4, y la dirección de transcripción sería en el sentido de PstI hacia EcoRI en el pSAE4 (Fig.3, Sánchez Pescador et al, 1982).

D. DETERMINACION DE LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL FRAGMENTO HpaI-PstI DEL PLASMIDO pSAE4

8. Determinación de la secuencia nucleotídica

Para demostrar enteramente la localización del DNA donde se inicia la transcripción y la dirección de transcripción del gene gdh, se decidió determinar la secuencia nucleotídica del fragmento PstI-HpaI, de 610 pb en promedio, del pSAE4 (coordenadas 3.5 y 2.9) (Fig. 1, Valle et al, 1983). Para ello se clonó este fragmento, eliminando previamente los extremos cohesivos generados por la digestión con PstI, en el sitio de SmaI del bacteriófago M13mp8, en las dos orientaciones posibles. La secuencia nucleotídica del fragmento se determinó analizando las dos cadenas complementarias mediante el método descrito por Sanger. De esta manera se obtuvo la secuencia del DNA de la región reguladora del gene gdh de E. coli y de la región que codifica para el amino terminal de la proteína.

9. Análisis y características de la secuencia nucleotídica obtenida

La secuencia obtenida se muestra en la figura 2 (Valle et al, 1983). En ella se localizaron los sitios de restricción reconocidos por diversas endonucleasas. Se infirió la secuencia de aminoácidos perteneciente al amino terminal de la proteína GDH y se localizaron tres posibles promotores (por comparación con la secuencia consenso) y algunas otras zonas de interés (Fig. 2, Valle et al, 1983).

**E. COMPARACION DE LA REGION AMINO TERMINAL DE LA GDH DE
E. COLI CON OTRAS GDHs**

10. La secuencia inferida de los primeros 102 amino ácidos de la GDH de E. coli, se comparó con las secuencias conocidas de otras proteínas homólogas (obtenidas por secuenciación protéica), las pertenecientes a Neurospora crassa, bovino y pollo. En la figura 3 (Valle et al, 1983) se muestra esta comparación (se omitió la secuencia de la GDH de pollo por ser igual a la GDH bovina salvo en algunos residuos). En esta comparación se observa que las GDHs de E. coli y N. crassa son más similares entre sí que las GDHs de N. crassa y bovino (ambos eucariotes).

PUBLICACIONES

Recombinant plasmids carrying the glutamate dehydrogenase structural gene from *Escherichia coli* K-12

(Nitrogen metabolism; plasmid pBR322; restriction mapping)

Ray Sánchez-Pescador, Elvira Sanvicente, Fernando Valle and Francisco Bolívar

Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70228, 04510 México, D.F. (México)

(Received July 27th, 1981)

(Accepted September 11th, 1981)

SUMMARY

Plasmid pRSPI, isolated from the *Escherichia coli* gene bank of Clarke and Carbon (1975), has been shown to complement the *gdh*-1 mutation that affects the synthesis of glutamate dehydrogenase (GDH) in the *E. coli* strain PA340. The GDH structural gene of *E. coli* is present on a 2.3-Md DNA fragment from the hybrid plasmid pRSPI and certain of its derivatives. Polypeptides synthesized by minicells carrying some of these plasmids, enabled us to make a preliminary determination of the direction of transcription of the *gdh* gene on the cloned fragments.

INTRODUCTION

In *E. coli*, glutamate is predominantly synthesized by two enzymes, GDH and GOGAT (Tyler, 1978). Enteric bacteria lacking GDH do not require glutamate for growth. Such mutants grow like wild-type strains when either high or low concentrations of ammonia are used as a sole nitrogen source (Brenchley and Magasanik, 1974; Pahel et al., 1978). Mutant strains lacking GOGAT can only grow without glutamate when glucose-minimal medium is supplemented with

excess of ammonia. Double mutants lacking GDH and GOGAT activities cannot utilize either high or low concentrations of inorganic nitrogen and require glutamate for growth (Berberich, 1972).

To study the *in vitro* and *in vivo* expression and the regulation of the *gdh* gene, we have isolated a hybrid plasmid from an *E. coli* gene bank of Clark and Carbon (1975), that complemented chromosomal mutations affecting GDH activity in the *E. coli* strain PA340. Plasmid pRSPI not only complemented the GDH defect but increased the specific activity of the enzyme approximately 2.5-fold.

Various restriction enzyme-generated DNA fragments from pRSPI were cloned in pBR322. Using different biochemical techniques we were able to demonstrate the presence of the *gdh* gene in pRSPI

Abbreviations: Ap^r, ampicillin resistance; bp, base pairs; GDH, glutamate dehydrogenase; GOGAT, glutamate synthase; kb or Kb, kilobase pairs; Md, megadaltons; SDS, sodium dodecyl sulfate; Tc^r, tetracycline resistance.

and certain derivative plasmids. Some of these plasmids were used in minicell experiments to obtain preliminary information concerning the relative position and the direction of transcription of the *gdh* gene in pRSP1.

MATERIAL AND METHODS

(a) Bacterial strains and growth conditions

The genotypes of the bacterial strains used in this work are listed in Table I. CSS20, obtained from J. Carbon, was the *E. coli* strain used for the construction of the gene bank (Clarke and Carbon, 1975). For most experiments the NN minimal medium was used (Covarrubias et al., 1980). Cultures for DNA extractions were grown on M9 medium (Miller, 1972). Transformations were performed as described by Cohen et al. (1972).

(b) Plasmid DNA purification and enzyme reaction conditions

Plasmid DNA was prepared by the method of Betlach et al. (1976). The reaction conditions for the

various restriction enzymes have been previously reported (Bolivar et al., 1977a).

DNA ligations were carried out in 66 mM Tris · HCl pH 7.6, 6.6 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol and 0.5 mM ATP, at 12°C for 12–24 h. S1 nuclease was utilized as previously described (Ullrich et al., 1977). *Eco*RI linkers (dCCGAATTCGG), were ligated to blunt-ended DNA fragments as described by Bolivar and Backman (1979).

(c) GDH activity assays and enzyme purification

The ammonia-dependent activity of GDH was determined as described by Covarrubias et al. (1980). GDH purification was carried out as reported by Sakamoto et al. (1978).

(d) Incorporation of radioactively labeled amino acids into minicells

Minicells were isolated by three subsequent sucrose gradient centrifugations (Meagher et al., 1977). 2 ml of the minicell suspension were incubated at 37°C in the presence of a mixture of 19 amino acids (no methionine) and ³⁵S-labeled L-methionine for 30 min with shaking.

TABLE I

List of strains

Strain	Genotype	Source or Ref.
CSS20	HfrC <i>trpA58 metB1 glyV50 supF58 relA1</i>	Clarke and Carbon (1975)
PA340 ^a	F ⁻ <i>leuB6 gdh-1 hisG1 gltB31 argH1 thi-1 ara-14 lacY1 gal-6 malA1 xyl-7 met-2 tonA2 λ^{lys} rpsL9 supE44</i>	B.J. Bachmann
P678-54	F ⁻ <i>thr leu thi-1 supE lacY tonA gal mal xyl ara nil min</i>	R. Tait
MX729	Same as PA340 but carrying pRSP1	Covarrubias et al. (1980)
MX7291	Same as PA340 but carrying pRSP4	This paper
MX7292	Same as PA340 but carrying pRSP5	This paper
MX7293	Same as PA340 but carrying pRSP7	This paper
MX7294	Same as PA340 but carrying pSAE1	This paper
MX7295	Same as PA340 but carrying pSAE4	This paper
MX7296	Same as PA340 but carrying pSAE41	This paper
MX7297	Same as PA340 but carrying pSAE42	This paper
MX7298	Same as PA340 but carrying pSAE421	This paper
MX7299	Same as PA340 but carrying pSAE422	This paper

^a Strain PA340 is the same as CB100 from B.D. Sanwal's laboratory which has been shown to contain both *gltB* and *gdh* mutations (Berberich, 1972). PA340 reverts to glutamate prototrophy at a frequency of 10⁻⁸ per cell (Pahel et al., 1978).

RESULTS

(a) Cloning into pBR322 of various restriction-generated DNA fragments derived from pRSP1

Covarrubias et al. (1980) have reported the isolation of three ColE1-hybrid plasmids that comple-

mented *glnA*, *gltI* and *gltB* mutations. One of these plasmids, pRSP1, complemented the *gltI* mutation in the strain PA340. A restriction map of this plasmid is shown in Fig. 1.

To localize the region of the cloned chromosomal DNA segment from pRSP1 that complements the

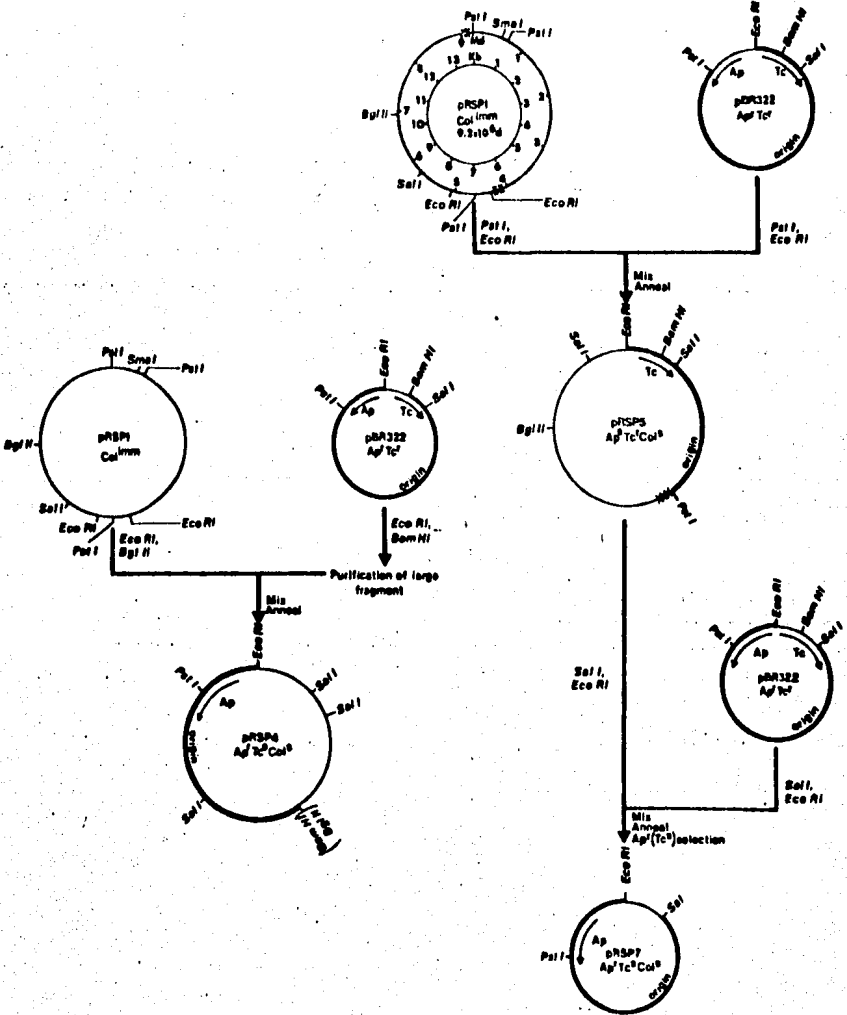


Fig. 1. Diagrammatic representation of the construction of pRSP1 derivatives. The positions of the various restriction sites are drawn to scale. XX or XXX symbols represent the poly(AT) linker region on pRSP1.

TABLE II

GDH specific activities determined by plasmid pRSP1 and derivatives

Strain ^a	Plasmid present	GDH specific activity ^b
CS520	—	184.1
PA340	—	2
MX729	pRSP1	448.6
MX7291	pRSP4	2
MX7292	pRSP5	450
MX7293	pRSP7	2
MX7294	pSAE1	460
MX7295	pSAE4	455.5
MX7296	pSAE41	3.1
MX7297	pSAE42	1.5

^a Cultures of 100 ml were grown to a density of 6×10^8 cell/ml on glucose-NN medium with 30 mM NH_4Cl as the nitrogen source for strains CS520, MX729, MX7292, MX7294 and MX7295. Strains PA340, MX7291, MX7293, MX7296 and MX7297 were grown in the same medium supplemented with 2 mg/ml glutamate.

^b μmol of oxidized NADPH/mg protein/min.

gdh-1 mutation in strain PA340, different pRSP1 DNA fragments were cloned into the plasmid vehicle pBR322 (Bolivar et al., 1977b). One of these recombinant plasmids, pRSP4, was constructed by cloning the *EcoRI-BglIII* fragment (coordinates 5.1 to 6.9) from pRSP1 into pBR322 (*EcoRI-BamHI* digested). This recombinant plasmid was not able to complement the *gdh-1* mutation from PA340. On the other hand, plasmid pRSP5, obtained by cloning the 4.1-Md *EcoRI-PstI* fragment from pRSP1 (Fig. 1), was able to complement the *gdh-1* mutation from PA340 (Table II). Another plasmid, pRSP7, a derivative of pRSP5 that carries the *EcoRI-SalI* fragment that spans from coordinate 5.1 to 5.7 in pRSP1 was unable to complement the *gdh-1* mutation from strain PA340 (Table II).

(b) Derivatives of pRSP5

According to the above results there were two possible locations for the *gdh* gene in pRSP1. In one location, the *gdh* gene could overlap the *BglIII* site of pRSP1. Alternatively, the entire *gdh* gene could be located between the *BglIII* and *PstI* sites (coordinates 6.9 to 9.2).

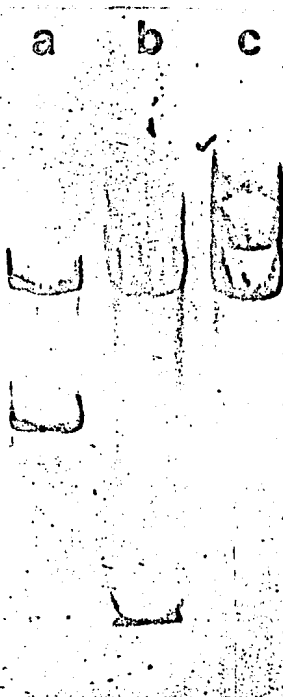


Fig. 2. Agarose slab gel electrophoresis of pRSP5 DNA cleaved with *BglIII* and *EcoRI* (lane a). The gel also shows the *EcoRI*-digestion patterns of pSAE1 (lane b) and pSAE4 (lane c, partial digestion).

To distinguish between these two alternatives, we decided to in vitro mutagenize pRSP5 DNA by the insertion of a synthetic decanucleotide *EcoRI* "linker" into the unique *BglIII* site. The pRSP5 DNA was linearized with *BglIII* endonuclease and the resulting DNA was then digested with *S1* nuclease to eliminate the *BglIII* cohesive ends. To increase the efficiency of blunt-end linker addition, the *S1*-digested DNA was treated with *E. coli* DNA polymerase I (Klenow fragment). *EcoRI* linkers were ligated, and the resulting DNA was used to transform *E. coli* PA340 cells. From this experiment we isolated plasmid pSAE1. As can be seen in Fig. 2 (lane b), this plasmid carried two *EcoRI* sites; however, the smaller *EcoRI*-generated fragment did not have the expected M_r of approx. 1.8×10^6 (the original size for the

*Bgl*III-*Eco*RI DNA fragment present in pRSP5, lane a). We believe that this deletion was the result of excessive S1 nuclease digestions of the *Bgl*III-linearized pRSP5 DNA. Finally, by recircularizing the largest *Eco*RI DNA fragment from pSAE1, we obtained plasmid pSAE4 (lane c).

Since both pSAE1 and pSAE4 plasmids complemented the *gdh*-1 mutation in PA340 we concluded that the structural portion of the *gdh* gene is located between the *Bgl*III and the *Pst*I sites (coordinates 6.9 to 9.2) in pRSPI.

(c) Derivatives of pSAE4

Since the *GDH* structural gene is located in the 2.3-Md *Eco*RI-*Pst*I fragment carried by plasmid pSAE4, we used a collection of restriction endonucleases to further characterize this DNA fragment. As can be seen in Fig. 3, there are two *Hpa*I, one *Clal* and one *Pvu*I endonuclease substrate sites in the *Eco*RI-*Pst*I DNA segment. No *Xho*I, *Xma*I, *Bst*E, *Hind*III or *Pvu*II sites were found. Two derivatives of pSAE4 were constructed using these data. One of them, plas-

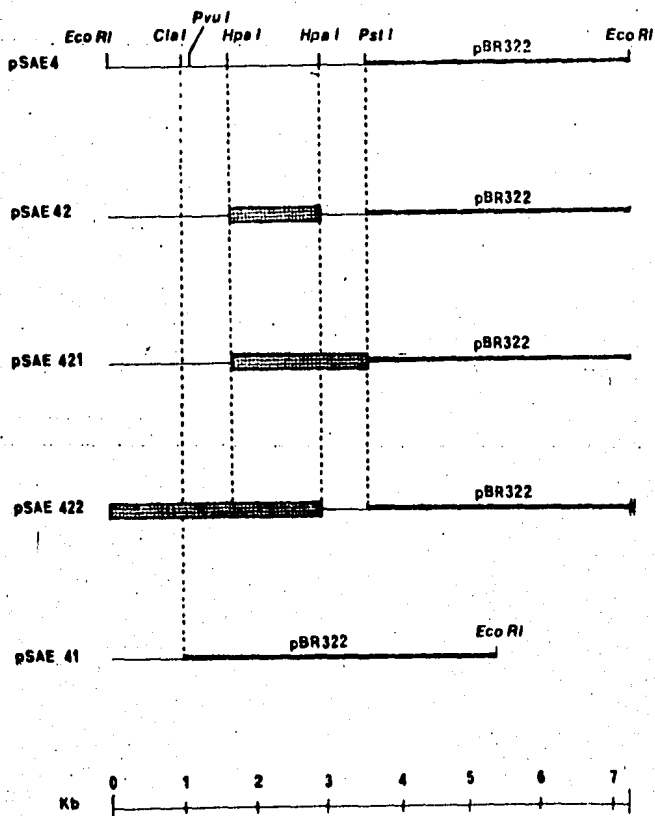


Fig. 3. Restriction map of pSAE4 and derivatives. The position of the different endonuclease substrate sites are drawn to scale. The heavy lined region of the plasmids represents the pBR322 vector. Deletions are represented by dotted rectangles.

mid pSAE41, was engineered by inserting the *EcoRI*-*ClaI* fragment from pSAE4 (coordinates 0 to 1, Fig. 3) into pBR322 previously digested with the same two endonucleases. Plasmid pSAE42 was constructed by recircularizing the large *HpaI* fragment from pSAE4. None of these recombinant molecules was able to complement the *gdh-1* mutation from PA340.

As shown in Fig. 3, two other plasmids were derived from pSAE42. One of these, named pSAE421, was constructed by digesting pSAE42 with the restriction enzyme *PstI*, treating the resulting linear DNA with *S1* nuclease followed by a digestion with *HpaI*. The largest DNA fragment was recircularized using T4 DNA ligase. The other plasmid derived from pSAE42, named pSAE422, was obtained after digesting the parental plasmid with the *EcoRI* endonuclease. The linear DNA was treated, as in the previous case, with *S1* nuclease and then with *HpaI*. The largest DNA fragment was also recircularized.

(d) Specific GDH activities from cells carrying pRSP1 and derivative plasmids

The GDH-specific activity was determined in cell extracts from the PA340 strain carrying one of the various constructed plasmids (Table II). GDH activity measured in strain MX729, as well as in PA340 cells carrying either pRSP5, pSAE1 or pSAE4, was approx. 2.5-fold higher than that observed for the wild-type strain CS520. The GDH activities of PA340 cells carrying pRSP4, pRSP7, pSAE41 or pSAE42 were as low as those found in plasmid-free PA340 cells.

(e) Synthesis of GDH in minicells

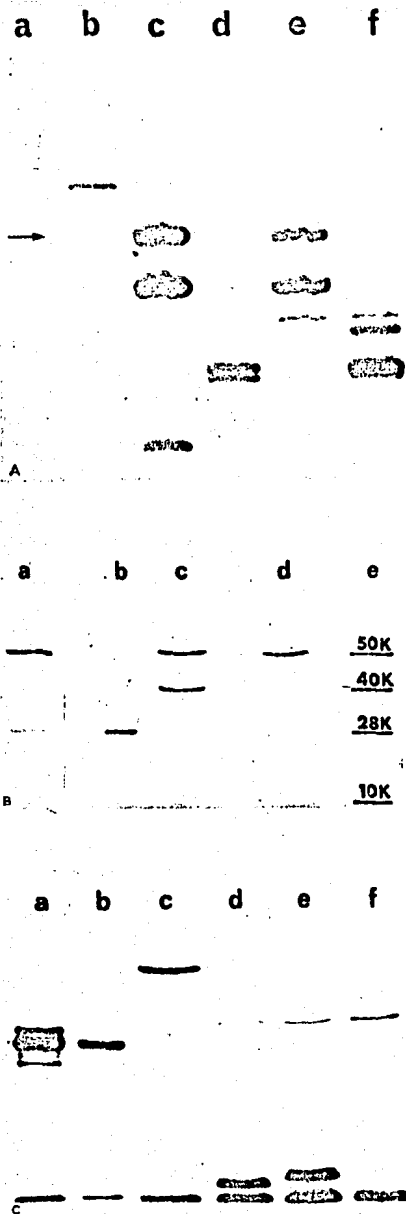
To prove that the complete structural gene for glutamate dehydrogenase was present in pRSP1, pRSP5, pSAE1 and pSAE4 but not in the other mentioned plasmids, protein synthesis in the *E. coli* minicell system was studied. The minicell-producing strain P678-54 was transformed with each of these plasmids as well as with ColE1 and pBR322. Purified minicells from stationary-phase cultures of each P678-54 transformant were allowed to synthesize proteins in the presence of [³⁵S]methionine. Minicells were lysed with SDS and proteins were separated electrophoretically in a SDS-polyacrylamide slab gel. ³⁵S-labeled proteins were then identified by autoradiography. The results from these experiments (Fig.

4A), show that minicells carrying pRSP1 (lane c) and pRSP5 (lane e) synthesized two heavily labeled polypeptides. One polypeptide ($M_r = 50\,000$) comigrated with the purified GDH monomer (lane a), while the other migrated as an $M_r = 40\,000$ polypeptide. Plasmid pRSP1 also encoded for a polypeptide of approx. $M_r = 15\,000$ that was not specified by pRSP5. It is interesting to mention that minicells carrying pRSP4 did not synthesize the $M_r = 50\,000$ peptide. Instead, a polypeptide of approx. $M_r = 40\,000$ appeared in the gels (data not shown). On the other hand, pRSP7 did not synthesize any detectable chromosomally coded polypeptide (lane d). Plasmid pSAE1 coded for two polypeptides, one of which is the $M_r = 50\,000$ GDH comigrating product (Fig. 4B, lane a). Its *EcoRI* recircularized product, pSAE4, coded for only one polypeptide that also comigrated with purified GDH monomer (Fig. 4B lane d). Finally, Fig. 4C shows the polypeptides synthesized by minicells carrying plasmids pSAE4 and its derivatives, pSAE41, pSAE42, pSAE421 and pSAE422.

These results suggested that the $M_r = 50\,000$ polypeptide specified by pRSP1, pRSP5, pSAE1 and pSAE4 is the GDH monomer. However, to confirm this unequivocally, the plasmid-coded GDH-like polypeptide was examined by two-dimensional gel electrophoresis and by its immunological properties. Radioactive extracts from minicells carrying pRSP5 or pSAE4, were subjected to a two-dimensional O'Farrell-type gel electrophoresis. This experiment showed that one ³⁵S-labeled polypeptide synthesized from either plasmid, comigrated with GDH purified monomer (data not shown). Therefore, the plasmid-encoded polypeptide is similar to purified GDH in both molecular weight and charge. Furthermore, when radioactive minicells extracts carrying pRSP5, pSAE4 and pBR322 plasmids were independently treated with rabbit antiGDH gamma globulin only the $M_r = 50\,000$ ³⁵S-labeled protein from pSAE4 and pRSP5 extracts, which again comigrated with purified GDH monomer, was precipitated (data not shown). We concluded from these results that the $M_r = 50\,000$ plasmid-encoded protein corresponds to the GDH monomer.

DISCUSSION

The evidence we have presented demonstrates that



the structural gene for the glutamate dehydrogenase monomer from *E. coli* is carried by recombinant plasmids pRSP1, pRSP5, pSAE1 and pSAE4. As shown in Fig. 4, plasmid pRSP1 carries a chromosomal DNA fragment of approx. 5 Md that directs the synthesis of GDH and two smaller polypeptides. Plasmid pRSP5 also directs the synthesis of GDH and one of the two polypeptides ($M_r = 40000$) coded by pRSP1. Finally, plasmid pSAE4 only directs the synthesis of the GDH polypeptide. The fact that the two smaller polypeptides coded by pRSP1 are not present in extracts from minicells carrying pSAE4 and that these polypeptides are not immunoprecipitated by antiserum against GDH, rules out the possibility that these polypeptides are degradation products of GDH.

On the basis of the results presented in Figs. 2, 3 and 4, we have been able to localize the GDH structural gene within the 2.3 Md *BglII-PstI* DNA fragment (coordinates 6.9-9.2) in pRSP1, that can be isolated as an *EcoRI-PstI* DNA fragment from pSAE4.

The results shown in Fig. 4C lane d, demonstrated that plasmid pSAE42, a *HpaI* deletion of approx. 1300 bp derived from pSAE4, did not synthesize a GDH comigrating product. Instead, a new polypeptide of approx. M_r 9000 appeared. Since no other chromosomally coded polypeptides are present in pSAE4 and pSAE42, it seems reasonably possible that this new polypeptide is being coded by a truncated *gdh* gene. In agreement with these results, the promoter for the *gdh* gene should be located about 250 bp from one of the two *HpaI* sites present in pSAE4 (Fig. 3). As shown in Fig. 4C, lane f, plasmid pSAE421, a deletion derivative of pSAE42 that lacks the DNA region between the *HpaI* and the *PstI* sites from pSAE42 (Fig. 3), does not synthesize this M_r 9000 polypeptide present in pSAE42. However, the polypeptide pattern of minicells carrying pSAE422, a deletion derivative of pSAE42 that lacks the *HpaI-EcoRI* region (Fig. 3), shows the presence of a polypeptide that roughly comigrates with the M_r 9000

Fig. 4. Autoradiographs of SDS-polyacrylamide gels from minicells carrying various plasmids: (A) Lane b: Co1E1; lane c: pRSP1; lane d: pRSP7; lane e: pRSP5; lane f: pBR322. The arrow in lane a shows the position of purified GDH monomer. (B) Lane a: pSAE1; lane b: pBR322; lane c: pBRSP5; lane d: pSAE4. Lane e shows the position of molecular weight markers. (C) Lane a: pBR322; lane b: pSAE41; lane c: pSAE4; lane d: pSAE42; lane e: pSAE422; lane f: pSAE421.

polypeptide. We believe that these results indicate that the promoter of the GDH structural gene might be located about 250 bp from the *HpaI* site close to *PstI* (coordinate 3, Fig. 3) in the pSAE4 restriction map. This conclusion is supported by the fact that RNA polymerase binds to the *HaeIII* restriction fragment that carries the *PstI* site of pSAE4 (unpublished results). The difference in the molecular weight between the small ($M_r \approx 9000$) proteins coded by pSAE42 and pSAE422 could be explained by the fact that translation of the products might terminate in different positions in these two plasmids.

Although the relaxed replicating plasmid pBR322 is normally present in 15–20 copies per cell (Covarrubias et al., 1981), strains carrying *gdh*⁺ derivatives of pBR322 have GDH levels only about 2.5-fold higher than normal strains, which corresponds to the increase in antigen concentration as determined by quantitative immunoelectrophoresis (data not shown). This disproportionate increase in enzyme activity and antigen level with gene dosage could suggest that the expression of *gdh* might be subjected to positive regulation by a factor present in limiting amounts. We plan to investigate this and other possibilities by using a coupled in vitro transcription and translation system in hope of identifying this factor(s).

Finally, it is interesting to mention that detectable levels of GDH antigen were synthesized by the *E. coli* strain PA340 *gluB31 gdh-1*. The level of this antigen was approximately the same as the wild type strain used as control (data not shown). This result indicates that the *gdh-1* mutation in the *E. coli* strain PA340 is a structural mutation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Alejandra Covarrubias for technical advice and valuable criticism of the manuscript. We would also like to thank Irma Vichido for technical assistance. We thank Ma. del Carmen González for the typing of the manuscript.

This work was supported by Grant PCCBNAL 790179 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

REFERENCES

Berberich, M.A.: A glutamate-dependent phenotype in *E. coli* K-12; the result of two mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47 (1972) 1498–1503.

- Betlach, M., Hershfield, V., Chow, L., Brown, W., Goodman, H.M. and Boyer, H.W.: A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the *EcoRI* restriction and modification of DNA. *Fed. Proc.* 35 (1976) 2037–2046.
- Bolivar, F., Rodríguez, R.L., Betlach, M.C. and Boyer, H.W.: Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistance derivatives of the plasmid pMB9. *Gene* 2 (1977a) 75–93.
- Bolivar, F., Rodríguez, R., Greene, P.J., Betlach, M., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Cross, J. and Falkow, S.: Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2 (1977b) 95–113.
- Bolivar, F. and Backman, K.: Plasmids of *E. coli* as cloning vehicles, in R. Wu (Ed.), *Methods in Enzymology*, 1979, Vol. 68. Academic Press, New York, pp. 245–267.
- Brenchley, J. and Magasanik, B.: Mutants of *Klebsiella aerogenes* lacking glutamate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 117 (1974) 544–550.
- Clarke, L. and Carbon, J.: Biochemical construction and selection of hybrid plasmids containing specific segments of the *Escherichia coli* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 4361–4365.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. and Hsu, L.: Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E. coli* by R factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69 (1972) 2110–2114.
- Covarrubias, A.A., Sánchez-Pescador, R., Osorio, A., Bolivar, F. and Bastarrachea, F.: ColE1 hybrid plasmid containing *Escherichia coli* genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine. *Plasmid* 3 (1980) 150–164.
- Covarrubias, L., Cervantes, L., Covarrubias, A., Soberón, X., Vichido, I., Blanco, A., Kupersztoch-Portnoy, Y.M. and Bolivar, F.: Construction and characterization of new cloning vehicles V. Mobilization and coding properties of pBR322 and several deletion derivatives including pBR327 and pBR328. *Gene* 13 (1981) 25–35.
- Meager, R.B., Tait, R.C., Betlach, M. and Boyer, H.W.: Protein expression in *E. coli* minicells by recombinant plasmids. *Cell* 10 (1977) 521–536.
- Miller, J.: Experiments in Molecular Genetics, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1972.
- Pahel, G., Zelenetz, A.D. and Tyler, B.M.: *gluB* gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 133 (1978) 139–148.
- Sakamoto, N., Kotre, A.M. and Savegeou, M.A.: Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: Purification and properties. *J. Bacteriol.* 124 (1975) 775–783.
- Tyler, B.: Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 47 (1978) 1127–1162.
- Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pickett, R., Fischer, E., Rutter, W. and Goodman, H.M.: Rat insulin gene: Construction of plasmids containing the coding sequences. *Science* 196 (1977) 1313–1321.

Communicated by W. Szybalski.

EVIDENCIAS BIOQUÍMICAS DE LA PRESENCIA DEL GENE ESTRUCTURAL DE LA DESHIDROGENASA GLUTÁMICA DE *E. COLI* K-12 EN PLASMIDOS RECOMBINANTES.

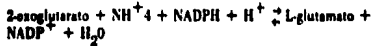
ELVIRA SANVICENTE, RAY SÁNCHEZ PESCADOR
FERNANDO VALLE, FRANCISCO BOLÍVAR

*Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación
sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, UNAM
04510 México, D. F.*

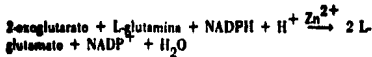
INTRODUCCIÓN

En *Escherichia coli* y otras enterobacterias, tres enzimas desempeñan un papel crucial en la asimilación de amonio en glutamato y glutamina (19); estas enzimas son:

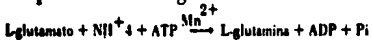
- 1) Deshidrogenasa glutámica (GDH), (L-glutamato: NADP⁺ oxidoreductasa, EC 1.4.1.4.), que cataliza reversiblemente la reacción:



- 2) Glutamato sintasa (GOGAT), (L-glutamato: NADP⁺ oxidoreductasa, EC 1.4.1.3.), que cataliza irreversiblemente la reacción:



- 3) Glutamino sintetasa, (GS), (L-glutamato: amonio ligasa, EC 6.3.12.), que cataliza la siguiente reacción:



Las bacterias entéricas que carecen de GDH no necesitan ácido glutámico para crecer. Tales mutantes crecen también, como la cepa silvestre en concentraciones altas y bajas, de amonio (5, 15). Mutantes que care-

cen de GOGAT sólo pueden crecer sin ácido glutámico cuando el medio mínimo está suplementado con exceso de amonio. Las dobles mutantes que carecen de GDH y GOGAT no pueden utilizar nitrógeno inorgánico y requieren glutamato para crecer (1).

Covarrubias *et al* (8) aislaron de un banco de genes de *E. coli* (6), un plásmido híbrido, el pRSP1, que mostró complementar la auxotrofia por glutamato de la cepa pA340 de *E. coli*. Este plásmido contiene un fragmento de DNA cromosomal de aproximadamente 4.6 Md.

Se construyeron varios derivados de este plásmido (18), de los cuales pRSP5, pSAE1 y pSAE4 complementan dicha auxotrofia. El pRSP5, se construyó subclonando en el vehículo pBR322 (3, 4), el fragmento comprendido entre los sitios de *Eco* RI y *Pst* I (coordenadas 5.1 y 9.2/0) del pRSP1 (Fig. 1). El plásmido pSAE1 se obtuvo al insertar un oligonucleótido sintético que contiene el sitio para la enzima *Eco* RI en el sitio reconocido por la endonucleasa *Hg* II presente en el plásmido pRSP5.

A su vez, el plásmido pSAE1 se obtuvo recircularizando el fragmento mayor obtenido de la digestión con *Eco* RI del DNA del pSAE1. El plásmido pSAE4 contiene un fragmento de DNA cromosomal de aproximadamente 2.3 Md (18) (Fig. 2).

Utilizando diferentes técnicas bioquímicas demostramos, en este trabajo, la presencia del gene estructural para la GDH en dichos plásmidos recombinantes.

Abreviaciones: Deshidrogenasa glutámica: GDH; Glutamato sintasa: GOGAT; Glutamino sintetasa: GS; daltones: d; megadaltones: Md; pares de bases: pb; dodecil sulfato de sodio: SDS.

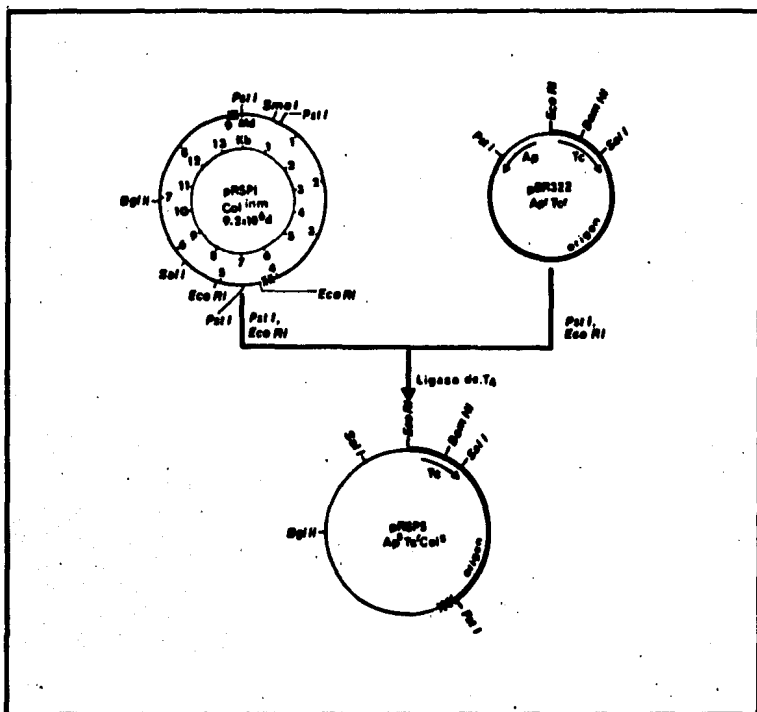


Fig. 1. Mapa del pRSP1 y obtención del pRSP3.

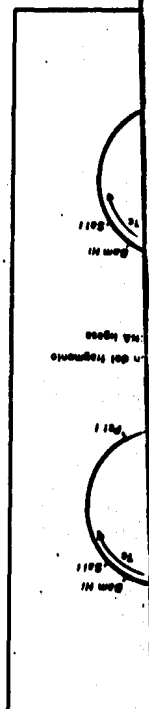


Fig. 2. Construcción de

MATERIAL Y MÉTODOS

a. Cepas bacterianas

Los genotipos de las cepas bacterianas utilizadas se enlistan en el cuadro 1.

b. Medios y condiciones de crecimiento

El medio Luria (13), modificado por la omisión de glucosa, se usó como medio líquido rico. En los experimentos de complementación, se usó medio mínimo NN (8). Para medios sólidos, se añadió agar a una concentración final de 1.5%. Los antibióticos se adicionaron a una concentración final de

30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en el caso de tetraciclina y de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en el de estreptomycin. Para purificar el plásmido y para crecer la cepa productora de minicélulas se utilizó el medio

CUADRO 1

38	
CEPA	GENOTIPO
CS520	HfrC <tryp 58="" a="" glyv50<br="" metb1=""></tryp> supF58 relA1
PA340	F ⁺ thr-1 leuB6 gdh-1 hisC1 gltB31 argH1 thi-1 ara-14 lacY1 gal-6 malA1 xyl-7 mlr-2 ton A2 W ^R W ⁺ rpsL9 supE44
P678-54	F ⁺ thr leu thi-1 sup E lacY tonA gal mal xyl ara mlr min

mínimo M9 (13).
llevaron a cabo a
rpm).

c. Procedimientos

La transformación
el método descri

d. Purificación de

La purificación d
efectuó por el mét

e. Ensayos de acti

La actividad de d

bin. tes en la cepa

pl P5, pSAE1 y la uxotrofia por A340 de E. coli. Se específica de GDH la pa PA340 con plásmidos y mostró 2.5 veces más alta cepa silvestre CS520

en minicélulas

construcción de la cepa recombinantes se diseña estructural para ser estudiada por el A en un sistema de red de mini- armó independi- no de estos plásmi- 3322, que sirvieron ala b. A las mini- los cultivos en fase inactivante y de la se les permitió

pRSP1 y DERIVADOS.

GDH
184.1
2
0.6
450
0
5.5

el mínimo NN con 15

min- ang de proteína.

sintetizar proteínas en presencia de ³⁵S metionina. Las minicélulas se lisaron con SDS y las proteínas se separaron electroforéticamente en un gel de poliacrilamida -SDS. Las proteínas marcadas con ³⁵S se localizaron por autorradiografía.

Los resultados muestran (Fig. 3A) que las minicélulas que llevan el pRSP1 (línea c) y el pRSP5 (línea d) sintetizan dos polipéptidos, uno de los cuales (50000d) comigra con el monómero purificado de GDH (línea a); el otro polipéptido posee un peso molecular más pequeño (aproximadamente 40000d). El plásmido pRSP1 también codifica para un polipéptido de 15000d que no se encuentra en el pRSP5.

El plásmido pSAE1 codifica para dos polipéptidos, uno de los cuales es el producto de

50000d que comigra con el monómero de GDH y el otro es un peso molecular aproximado de 27000d que probablemente proviene del gene truncado que codifica para la proteína de 40000d. El plásmido pSAE4, producto de la recirculación del fragmento mayor de Eco RI del plásmido pSAE1, codifica solamente para un polipéptido que también comigra con el monómero purificado de GDH (Fig. 3B, líneas a y d).

a b c d e

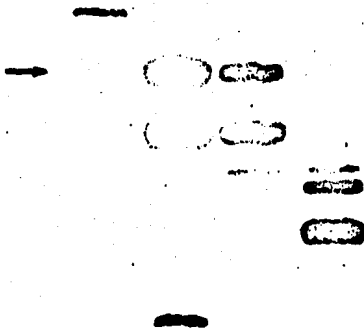
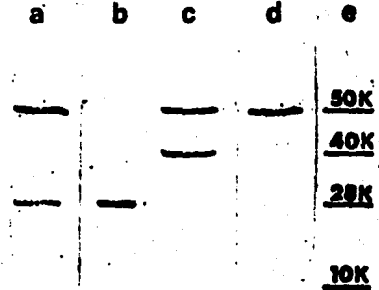


Fig. 3. Autorradiografía de geles de poliacrilamida-SDS que muestran proteínas marcadas con ³⁵S-metionina sintetizadas en minicélulas que llevan diferentes plásmidos. A. ColE1 (línea b), pRSP1 (línea c), pRSP5 (línea d), pBR322 (línea e). La línea e muestra la posición del monómero purificado de GDH. B. pSAE1 (línea a), pBR322 (línea b), pRSP5 (línea c), pSAE4 (línea d). La línea e muestra los correspondientes pesos moleculares en daltons.



Para demostrar conclusivamente que el polipéptido de 50000d codificado por los plásmidos pRSP1, pRSP5, pSAE1 y pSAE4 es realmente el monómero de GDH, se realizaron dos experimentos diferentes.

C. Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas codificadas por los plásmidos

Extractos radioactivos de minicélulas que llevan el pRSP5 o el pSAE4 se sometieron a una electroforesis en dos dimensiones. En este experimento (Fig. 4), se muestra que el polipéptido marcado con ³⁵S, sintetizado por cualquiera de los dos plásmidos comigra con el monómero purificado de GDH.

D. Inmunoprecipitación específica de la GDH codificada por el pRSP5

Extractos radioactivos de minicélulas que llevan los plásmidos pRSP5 y pBR322, se trataron independientemente con gamma

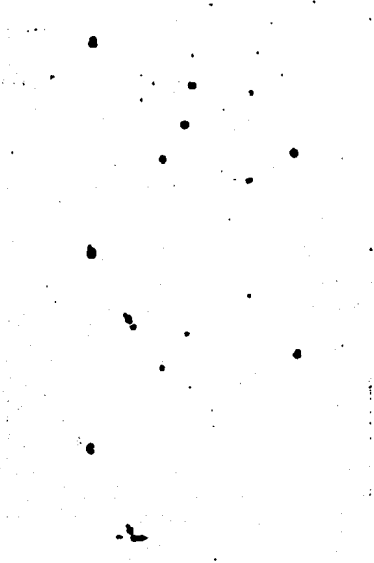


Fig. 4. Electrophoresis en gel en dos dimensiones de: a) Extracto de minicélulas que llevan el pRSP5 teñido con azul de coomassie. b) lo mismo que en a) pero adicionado 2mg del monómero puro de GDH, indicado por la flecha y teñido con azul de coomassie. c) Autorradiografía de b). La flecha indica la posición del monómero purificado de GDH.

globulina de conejo anti-GDH. Estos anticuerpos específicos sólo precipitaron el polipéptido de 50000d marcado con ^{35}S de los extractos, el cual comigró nuevamente con el monómero purificado de GDH (Fig. 5). Los anticuerpos anti-GDH también precipitaron el polipéptido marcado de 50000d proveniente de los extractos de minicélulas que llevaban el pSAE4.

E. Inmunolectroforesis cuantitativa

Con el fin de investigar si la cepa PA340 de *E. coli* es capaz de sintetizar algún antígeno que cruce con los anticuerpos específicos

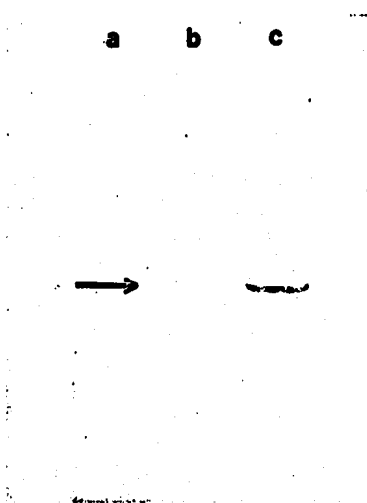


Fig. 5. Inmunoprecipitación específica de la GDH sintetizada de novo.

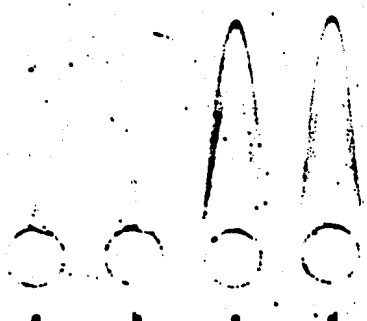


Fig. 6. Inmunolectroforesis cuantitativa.

La inmunolectroforesis cuantitativa de GDH se llevó a cabo en extractos (1mg de proteína total) de las cepas PA340, CS520, PA340/pRSP5 y PA340/pSAE4. El antígeno GDH se cuantificó usando una curva estándar de concentración de proteínas contra el área de inmunoprecipitación. El pozo a muestra el extracto de la CS520; el pozo b muestra el extracto de la PA340. Los extractos de las cepas PA340/pRSP5 y PA340/pSAE4 se muestran en los pozos c y d respectivamente.

anti-GDH, y si las cepas PA340/pRSP5 y PA340/pSAE4 sintetizan más antígeno GDH que la cepa silvestre (CS520), hicimos experimentos de inmunolectroforesis

cuantitativa u:
ferentes cepas
en la figura 6.
CS520 (línea
GDH aproxim
presentado
PA340/pRSP5
respectivamen
las células de
(línea b) sint:
antígeno GDH

DISCUSION

La evidencia
gene estructu
dehidrogenas:
presente en l
pRSP1, pRSP

Como se m
plásmido pRSE
DNA cromoso.
Md. dirige la s:
polipéptidos r
pRSP5 tambié
de uno de los c
cados por el pR
pSAE4 sólo dir
de GDH. El he
dos pequeños c
están presente
células que llev
lipéptidos no s
anticuerpos cor
lidad de que e
ducto de la deg

De acuerdo a
en la figura 3,
en dicha figura
gene estructura
GDH en el frag
entre los sitios
madamente 2.3
das 6.9-9.2).

El gene que
de 40000d en el

cuantitativa utilizando extractos de estas diferentes cepas de *E. coli*. Como puede verse en la figura 6, el extracto de la cepa silvestre CS520 (línea a) tiene un nivel de antígeno GDH aproximadamente del 30% del nivel presentado en los extractos de la PA340/pRSP5 y PA340/pSAE4 (línea c, d, respectivamente). Es interesante notar que las células de la PA340 (*gdh*-1 *gluB31*) (línea b) sintetizan niveles detectables de antígeno GDH comparable al de la CS520.

DISCUSION

La evidencia presentada muestra que el gene estructural para el monómero de la deshidrogenasa glutámica de *E. coli* está presente en los plásmidos recombinantes pRSP1, pRSP5, pSAE1 y pSAE4.

Como se muestra en la figura 3A, el plásmido pRSP1, que lleva un fragmento de DNA cromosomal de aproximadamente 4.6 Md, dirige la síntesis de GDH y de otros dos polipéptidos más pequeños. El plásmido pRSP5 también dirige la síntesis de GDH y de uno de los otros dos polipéptidos codificados por el pRSP1. Finalmente el plásmido pSAE4 sólo dirige la síntesis del polipéptido de GDH. El hecho de que los dos polipéptidos pequeños codificados por el pRSP1 no están presentes en los extractos de minicélulas que llevan el pSAE4 y que estos polipéptidos no son inmunoprecipitables por anticuerpos contra GDH, elimina la posibilidad de que estos polipéptidos sean producto de la degradación de GDH.

De acuerdo a los resultados presentados en la figura 3, y otros datos no mostrados en dicha figura, hemos podido localizar el gene estructural que codifica para la enzima GDH en el fragmento de DNA comprendido entre los sitios de *Bgl* II y *Pst* I de aproximadamente 2.3 Md en el pRSP1 (coordenadas 6.9-9.2).

El gene que codifica para el polipéptido de 40000d en el pRSP1 está localizado entre

los sitios de *Eco* RI y *Bgl* II (coordenadas 5.1 y 6.9); y el gene, o parte de él, que codifica para el polipéptido más pequeño en el pRSP1, está localizado entre la unión del vehículo molecular y el DNA cromosomal (coordenada 4.2) y el sitio de *Eco* RI localizado en la posición de 5.1 Md. Además, la dirección de transcripción del gene que codifica para la proteína de 40000d en el pRSP1 deberá proceder desde el sitio de *Eco* RI (coordenada 5.1) hacia el sitio de *Bgl* II (coordenada 6.9) en el pRSP1.

Al igual que los plásmidos de replicación relajada, el pBR322 está presente en 15-20 copias por célula (9). Sin embargo, las células que llevan plásmidos *gdh*⁺ derivados del pBR322 poseen un menor número de copias por célula (R. L. Rodríguez, comunicación personal) y presentan niveles de GDH (cantidad de antígeno y actividad específica), alrededor de 2.5 veces más altos que la cepa silvestre. Un aspecto interesante es investigar si el nivel de GDH corresponde o no a la dosis génica.

El hecho de que la cepa PA340 de *E. coli* también sintetice un antígeno capaz de cruzar con los anticuerpos específicos anti-GDH, sugiere que la mutación *gdh*-1, presente en esta cepa, sea una mutación en el gene estructural de GDH, de tal manera que la proteína sintetizada esté modificada probablemente en un sólo aminoácido que nulfique su actividad como enzima pero que conserve sus propiedades antigénicas.

RESUMEN

Utilizando pruebas de complementación, electroforesis en una y dos dimensiones e inmunoprecipitación específica, fue posible demostrar la presencia del gene estructural que codifica para la enzima deshidrogenasa glutámica de *E. coli* en ciertos fragmentos de DNA del plásmido pRSP1 y en algunos de sus derivados.

Fig. 6. Antígeno GDH sintetizado

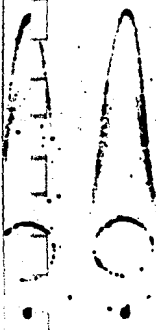


Fig. 6. Antígeno GDH sintetizado en los cepas PA340, CS520, pRSP1 o GDH se cuantificó por inmunoprecipitación de proteína contra el antígeno GDH. Los extractos de las cepas PA340/pRSP5 y PA340/pSAE4 se muestran en las lanes c y d, respectivamente.

Fig. 6. Antígeno GDH sintetizado en las cepas PA340/pRSP5 y PA340/pSAE4 se muestran en las lanes c y d, respectivamente. CS520, hicimos un electroforesis

SUMMARY

Plasmid pRSP1, isolated from the Clarke and Carbon *E. coli* gene bank, has been shown to complement the *gdh-1* mutation that affects the synthesis of glutamate dehydrogenase in the *E. coli* strain PA340.

Evidence is presented (slab gel electrophoresis in the presence of SDS, two dimension electrophoresis and specific immunoprecipitation) which demonstrates the presence of the GDH structural gene from *E. coli* in certain DNA fragments of the hybrid plasmid pRSP1 and some of its derivatives.

REFERENCIAS

- 1 BRENNER, M. A. A glutamate-dependent phenotype in *E. coli* K-12; the result of two mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47: 1498-1503, 1972.
- 2 BETLACH, M., HERSHFIELD, V., CHOW, L., BROWN, W., GOODMAN, H. M., BOYER, H. W. A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the *Eco* RI restriction and modification of DNA. *Fed. Proc.* 35: 2037-2046, 1976.
- 3 BOLÍVAR, F., RODRIGUEZ, R. L., BETLACH, M. C., BOYER, H. W. Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistance derivatives of the plasmid pMB9. *Gene* 2: 75-93, 1977.
- 4 BOLÍVAR, F., RODRIGUEZ, R., GREENE, P. J., BETLACH, M., HEYNEKER, H. L., BOYER, H. W., CROSA, J., FALKOW, S. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95-113, 1977.
- 5 BRENCHELEY, J., MACASANIK, B. Mutants of *Klebsiella aerogenes* lacking glutamate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 117: 554-550, 1974.
- 6 CLARKE, L., CARBON, J. Biochemical construction and selection of hybrid plasmids containing specific segments of the *Escherichia coli* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 4361-4365, 1975.
- 7 COHEN, S. N., CHANG, A. C. Y., HSU, L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E. coli* by R factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 2110-2114, 1972.
- 8 COVARRUBIAS, A. A., SÁNCHEZ-PESCADOR, R., OSORIO, A., BOLÍVAR, F., BASTARRACHEA, F. ColE1 hybrid plasmid containing *Escherichia coli* genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine. *Plasmid* 3: 150-164, 1980.
- 9 COVARRUBIAS, L., CERVANTES, L., COVARRUBIAS, A., SOBERÓN, X., VICIHO, I., BLANCO, A., KLIPERSZTOCH-PORTNOY, Y. M., BOLÍVAR, F. Construction and characterization of new cloning vehicles. V. Mobilization and coding properties of pBR322 and several deletion derivatives including pBR327 and pBR328. *Gene* 13: 25-35, 1981.
- 10 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London), 227: 680-685, 1970.
- 11 LOZOYA, E., SÁNCHEZ-PESCADOR, R., COVARRUBIAS, A., VICIHO, I., BOLÍVAR, F. Tight linkage of the genes that encode the two glutamate synthase subunits of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 144: 616-621, 1980.
- 12 MEAGHER, R. B., TAIT, R. C., BETLACH, M., BOYER, H. W. Protein expression in *E. coli* minicells by recombinant plasmids. *Cell* 10: 521-536, 1977.
- 13 MILLER, J. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, New York, 1972, pp. 6-20.
- 14 OFARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021, 1975.
- 15 PAHEL, C., ZELENETZ, A. D., TYLER, B. M. *glbB* gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 133: 139-148, 1978.
- 16 PALACIOS, R., CAMPOMANES, M., QUINTO, C. *Neurospora crassa* glutamine synthetase. *J. Biol. Chem.* 252: 3028-3034, 1977.
- 17 SAKAMOTO, N., KOTRE, A. M., SAVEGEU, M. A. Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: Purification and properties. *J. Bacteriol.* 124: 775-783, 1975.
- 18 SÁNCHEZ-PESCADOR, R., SANVICENTE, E., VALLE, F., BOLÍVAR, F. Recombinant plasmids carrying the glutamate dehydrogenase structural gene from *Escherichia coli* K-12. *Gene* 17: 1-8, 1982.
- 19 TYLER, B. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 1127-1162, 1978.
- 20 WEEKE, B. Rocket immunoelectrophoresis. En: N. N. Axelsen, J. Krolland y B. Weeke (Eds.) *A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis*. Universitetsforlaget, Oslo, 1973, p. 3743.

INTEN

INTRODUCTION

Mediating cli: determine whi: to unleash sui: observed that: of persons a: suicide have t: disorders. Thi: between 20 ar: discrepancy betw: due largely to: normality and: (38) and in th: population are: tions, many: mental disorde: risk of suicide

The mental found as a bar: depressive illne: the catamnestic: years showed t:

¹ This study was a: (Stiftung Volkswagen-

² Paper presented: Suicide Prevention an: WHO-Collaborative: Mental Health, Direct

³ For definition purp: of "suicidal behavior" presentation in the sev: (28). At this confer: suicide ideas, attempts here suicide ideas.

Nucleotide sequence of the promoter and amino-terminal coding region of the glutamate dehydrogenase structural gene of *Escherichia coli*

(DNA sequencing; protein sequencing; protein homology; CRP binding site; bacterial promoters; ammonia fixation)

Fernando Valle, Elvira Sanvicente, Peter Seeburg*, Alejandra Covarrubias, Raymond L. Rodriguez** and Francisco Bolivar

Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, 04510 México, D.F. (México) Tel. (905) 550-3893, * Genentech, Inc., 460 Point San Bruno Boulevard, South San Francisco, CA 94080 (U.S.A.) Tel. (415) 952-1000, and ** Department of Genetics, University of California, Davis, CA. 95616 (U.S.A.) Tel. (916) 752-3263

(Received February 5th, 1983)

(Revision received April 1st, 1983)

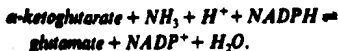
(Accepted April 5th, 1983)

SUMMARY

A 610-bp DNA fragment carrying the promoter and amino-terminal coding regions of the glutamate dehydrogenase (GDH) structural gene from *Escherichia coli* has been sequenced. The amino-terminal sequence of the enzyme was also determined to help localize the transcriptional and translational signals for this gene. Three possible promoters and a CRP binding site were identified by consensus criteria. The sequence of 102 amino acids at the amino terminus of the enzyme is compared with the amino acid sequence from other GDH enzymes.

INTRODUCTION

GDH (EC 1.4.1.2-4) catalyses the interconversion of α -ketoglutarate and L-glutamic acid:



Abbreviations: ATZ, anilino-thiazolinone; bp, base pairs; CRP, cAMP receptor protein; DTT, dithiothreitol; GDH, glutamate dehydrogenase; kb, kilobase pairs; P, promoter; PTH, phenylthiohydantoin; RBS, ribosome-binding site; SDS, sodium dodecyl sulfate.

This enzyme is important because of the central position in metabolism occupied by glutamate and α -ketoglutarate and their ability to enter into many types of metabolic pathways. GDH and glutamine synthetase provide a unique route for the incorporation of ammonia into organic compounds, thus linking carbohydrate and amino acid metabolism.

We have recently reported the construction of recombinant plasmids carrying the GDH structural gene (*gdh*) from *E. coli* K-12. The use of minicells carrying these plasmids enabled us to make the preliminary determination of the direc-

tion of transcription of the *gdh* gene on the cloned fragment (Sánchez-Pescador et al., 1982). We now describe the detailed mapping of the *gdh* gene and the nucleotide sequence of its promoter and amino-terminal coding regions.

MATERIAL AND METHODS

(a) Bacterial strains and plasmids

All bacterial strains were derivatives of *E. coli* K-12. A *recA*⁻ derivative of RRI (F⁻ *pro*, *leu*, *thi*, *lacY*, *ara-14*, *galK2*, *xyl-5*, *mtl*, *supE44*, *endA*⁻, *rpsL20*, *hsdR*, *hsdM*) and P678-54 (F⁻, *thr*, *leu*, *thi-1 supE*, *lacY*, *tonA*, *min*, *mtl*, *xyl*, *ara*) have been previously described (Rodríguez et al., 1976). Bacteriophage M13mp8 and the permissive host JM101 [*thi*, *supE*, Δ (*proA/B-lac*) F' (*traD36*, *proA/B lacZM15*, *lacI*^q)] were obtained from J. Messing. Plasmids pBR322, pBR327, pSAE4 and pSAE422 have been described (Bolívar et al., 1977; Soberón et al., 1980; Sánchez-Pescador et al., 1982).

(b) Enzymes and radiochemicals

*Pst*I endonuclease and T4 DNA ligase were purified as described by Greene et al. (1978) and Tait et al. (1980). Other restriction enzymes (*Sma*I, *Hpa*II, *Hpa*I, *Clal*, *Taq*I) were obtained from Bethesda Research Laboratories, Inc. S1 nuclease and *E. coli* RNA polymerase were obtained from Boehringer/Mannheim. [α -³²P]CTP and [³⁵S]methionine were obtained from the Radiochemical Centre (Amersham). Enzymes and radiochemicals employed for DNA sequencing have been described (Messing et al., 1981).

(c) Molecular cloning procedures

Digestion of plasmids and phage DNA with restriction endonucleases was carried out as described by Bolívar et al. (1977). Ligation of DNA fragments containing cohesive ends, transformation and transfection of competent cells were carried out as described by Davis et al. (1980) and Messing et al. (1981).

(d) Plasmid encoded proteins: synthesis in minicells

Minicells were isolated by three subsequent sucrose gradient centrifugations (Meagher et al., 1977). 2 ml of the minicell suspension (0.2 $A_{620\text{nm}}$) were incubated at 37°C in the presence of a mixture of 19 amino acids (no methionine) and 2 μ l of [³⁵S]methionine (927 Ci/mmol), for 30 min with shaking. Minicells were harvested by centrifugation, and frozen at -20°C.

Minicells were resuspended in 50 μ l of sample buffer [10% glycerol, 2.3% SDS, 0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8), 5% β -mercaptoethanol] and boiled 2 min before subjecting 15 μ l aliquots to 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis. ³⁵S-labeled plasmid-coded proteins were identified by autoradiography.

(e) In vitro transcription using restriction fragments as templates

Plasmid pSAE4 DNA was digested to completion with *Hpa*II and subjected to electrophoresis on a 7.5% polyacrylamide slab gel. The 361-bp *Hpa*II fragment containing the *gdh* promoter region was electroeluted from gel slices.

The transcription mixture (25 μ l) contained 20 mM Tris pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 5% glycerol, 0.6 μ g RNA polymerase and 0.25 pmol of DNA fragment. Incubations were carried out for 10 min at 37°C. Reactions were arrested by adding 5 μ l of formamide dye mix: 10 mM Na₂ EDTA, 0.1% xylene cyanole, 0.1% bromophenol blue and 95% deionized formamide. Samples were immediately loaded on a polyacrylamide 7 M urea slab gel and subjected to electrophoresis, followed by autoradiography.

(f) DNA sequencing

The procedure described by Heidecker et al. (1980) was used to determine the nucleotide sequence of the 610-bp *Pst*I-*Hpa*I fragment obtained from plasmid pSAE4. This fragment was cloned into the *Sma*I site of the bacteriophage M13mp8.

(g) Protein sequence

The first seven amino-terminal amino acids of the GDH previously purified as described by

Sakamoto et al. (1978), were determined by means of an automated sequence analyzer Beckman Model 890c, using the program 122974, with 1 M Quadrol. The ATZ derivatives were converted to PTH and identified in a Hewlett Packard 1084A using a RP-18 column developed with 0.01 M sodium acetate pH 4.03 and a 90% methanol gradient.

RESULTS

(a) Amino acid sequence determination of the amino terminus of GDH

The GDH was purified to homogeneity according to the procedure of Sakamoto et al. (1978). The protein was subjected to automatic Edman degradation from the amino terminus, and the

following sequence was obtained: Met-Asp-Gln-Thr-Tyr-Ser-Leu. By converting this amino acid sequence into a corresponding nucleotide sequence, we were able to identify the amino-terminal coding region of *gdh* and establish its reading frame (see below).

(b) Nucleotide sequence analysis of the *gdh* promoter and amino terminal coding regions

Previous studies have shown that the 3.5-kb *Pst*I-*Eco*RI fragment present in plasmid pSAE4 contains the GDH structural gene. We have also demonstrated that the gene is transcribed from *Pst*I to *Eco*RI, as shown in Fig. 1 (Sánchez-Pescador et al., 1982). This 3.5-kb DNA fragment was mapped more extensively to facilitate nucleotide sequencing studies.

We have also previously demonstrated that the promoter of the GDH structural gene is located

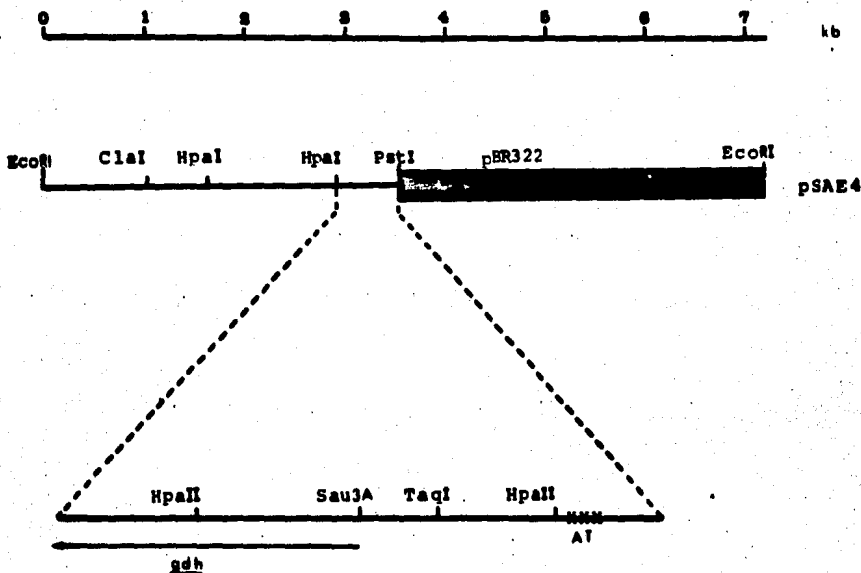


Fig. 1. Restriction map of recombinant plasmid pSAE4 (Sánchez-Pescador et al., 1982). The positions of the different restriction enzyme cleavage sites are drawn to scale. The black box represents the pBR322 vector. The expanded section details the 610-bp *Hpa*I-*Pst*I fragment cloned and sequenced in M13mp8. The arrow denotes the direction of transcription of the *gdh* gene. The symbol XXX represents the poly(AT) region that was originally incorporated into plasmid pRSPI, the precursor of pSAE4, during the construction of the *E. coli* gene bank by Clarke and Carbon (1975) (Sánchez-Pescador et al., 1982).

about 250–300 bp from the *HpaI* site proximal to the *PstI* site (coordinate 3.2, Fig. 1), in the pSAE4 restriction map (Sánchez-Pescador et al., 1982). Therefore, to obtain the nucleotide sequence of the regulatory elements and the amino acid terminal coding region of the *gdh* gene, we determined the nucleotide sequence of the *PstI-HpaI* fragment (coordinates 3.5 and 2.9) from pSAE4. For this purpose, the *PstI* cohesive ends were removed with *S1* nuclease and the fragment was cloned by blunt-end ligation into the *SmaI* site of the M13mp8, in the two possible orientations.

The nucleotide sequence of the fragment was determined, by sequencing the two complementary strands; the resulting sequence is shown in Fig. 2. Sequencing from the *HpaI* end of the restriction fragment revealed the beginning of the coding region of the *gdh* gene, approx. 300 bp from this end of the fragment. On the basis of the known *M_r* of GDH (Sakamoto et al., 1975), this places the *HpaI* site in the first third of the gene. As expected, the segment carries the original poly(A) region near the *PstI* site that was created during construction of plasmid pRSP5, from which the *gdh* gene was obtained (data not shown) (Clarke and Carbon, 1976; Covarrubias et al., 1980; and Sánchez-Pescador et al., 1982).

As indicated in Fig. 2, the amino acid sequence, previously determined, agrees with the deduced amino acid sequence for the amino terminal coding region. Preceding the translational initiation

codon (ATG, position +1) is the sequence TAAGG centered at position -13. This site shows similarities to a consensus RBS sequence (Stormo et al., 1982) that is complementary to the 3' end of the 16S ribosomal RNA (Shine and Dalgarno, 1974).

Upstream from the RBS there are several areas of interest that contain many direct repeat sequences (Fig. 2), and a palindromic sequence (5'ATTAAT) located at positions -21 and -128. Other regions of interest are three possible promoters, *P1*, *P2* and *P3*, and their associated -35 binding regions. Table I shows the sequence of these regions and the consensus nucleotide sequence for the bacterial promoters. The consensus nucleotide sequence for the CRP binding site (Adhya et al., 1982) and a possible CRP sequence for *gdh* located between positions -76 and -90, are also shown in Table I.

(c) Amino acid comparison with other glutamate dehydrogenases

GDH is one of the most evolutionarily conserved enzymes in nature (Smith et al., 1975). Therefore, we compared the sequence of the first 102 amino acids of the *E. coli* enzyme, determined by nucleotide sequence, with the sequence of other GDH enzymes. The comparison is presented in Fig. 3.

TABLE I

Consensus sequence comparison for three promoters.

P1, *P2* and *P3* are promoter-like sequences located at the 5' end of the *gdh* gene (Fig. 2). A + T percentages were calculated between bases -40 to +5 for each promoter, with position +1 being the putative start point for *gdh* mRNA (see Vollenweider et al., 1979). The consensus CRP binding region (Adhya et al., 1982) and a similar region in the *gdh* regulatory sequence are shown at the bottom of the Table.

Promoter	-35 binding region	Pribnow's box	% (A + T)				
<i>P1</i>	ATGACA - 19 bp	- CGTATT	73.3				
<i>P2</i>	TAGTCG - 17 bp	- TGACAT	66.6				
<i>P3</i>	TTGCTT - 19 bp	- TATAGT	62.2				
Consensus	TTGACA - 14-17bp	- TATAAT					
Consensus CRP binding region;	TG	---	A-C	---	ACA ₅ TGT	--	-8-
<i>gdh</i> ;	TG	---	A-C	---	ACATTCT	--	A-G

B Ala Asp Arg Glu Asp Asp Pro Asp Phe Phe Lys Met Val
 E Met Asp Gln Thr Tyr Ser Leu Glu Ser Phe Leu Asn His Val Gln
 N

Glu Gly Phe Phe Asp Arg Gly Ala Ser Ile Val Glu Asp Lys Leu
 Lys Arg Asp PRO Asn Gln Thr Glu Phe Ala Gln Ala Val Arg Glu
 Ser Asn Leu PRO Ser Glu Phe Glu Phe Glu Gln Ala Tyr Lys Glu

Val Glu Asp Leu Lys Thr Arg Gln Thr Gln Glu Gln Arg Asn
 Val Met Thr Thr Leu Trp Pro Phe Leu Glu Gln Asn PRO
 Leu Ala Tyr Thr Leu Glu Asn Ser Ser Leu Phe Gln Lys His PRO

Arg Val Arg Gly Ile Leu Arg Ile Ile Lys Pro Cys Asn
 Lys Tyr Arg Gln Met Ser Leu Leu Glu Arg Leu Val Glu PRO Glu
 Glu Tyr Thr Ala Leu Thr Val Ala Ser Ile PRO Glu

His Val Leu Ser Leu Ser Phe Pro Ile Arg Arg Asp Asp Gly Ser
 Arg Val Ile Gln Phe Arg Val Val Trp Val Asp Asp Arg Asn
 Arg Val Ile Gln Phe Arg Val Val Trp Glu Asp Asp Asp Gly Asn

Trp Glu Val Ile Glu Gly Tyr Arg Ala Gln His Ser His Gln
 Gln Ile Gln Val Asn Arg Ala Trp Arg Val Gln Phe Ser Ser Ala
 Val Gln Val Asn Arg Gly Tyr Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala

Arg Thr PRO Cys Lys Gly Gly Ile Arg Tyr Ser Thr Asp Val Ser
 Ile Gly Pro Tyr Lys Gly Gly Met Arg Phe His Pro Ser Val Asn
 Leu Gly Pro Tyr Lys Gly Gly Leu Arg Leu His Pro Ser Val Asn

Fig. 3. Amino acid sequence comparisons of the amino-terminal region of bovine (B), *E. coli* (E) and *N. crassa* (N) GDH enzymes. Identical residues are enclosed in boxes. Alignment of bovine and *N. crassa* amino acid residues are those reported by Blumenthal et al. (1975).

(d) *In vitro* transcription of restriction fragments carrying the 5' non-coding region of the *gdh* operon

To determine if transcription was originating from the 5' non-coding region of the *gdh* operon,

in vitro transcription experiments were performed using different restriction fragments. Fig. 4, lane b shows the *in vitro* transcription pattern of the *HpaII-HpaII* (-192 to +169, Fig. 2) fragment. Lane c shows the transcription of the same frag-

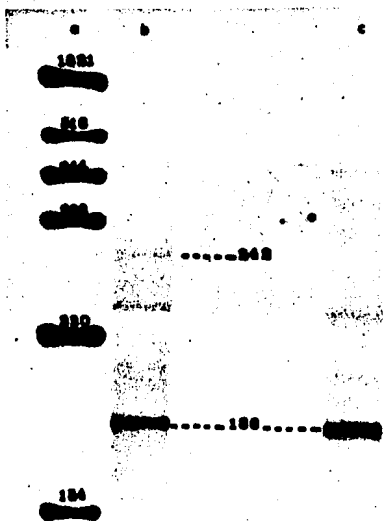


Fig. 4. In vitro transcription using restriction fragments derived from pSAE4. Lane a: 32 P-labeled *Hinf*I fragments of pBR327 used as M_r markers (sizes in bp). Lane b: RNA products obtained from transcribing a 361-bp *Hpa*II fragment derived from pSAE4. Lane c: RNA products obtained by transcribing the same fragment but previously digested with *Taq*I. Length of transcripts (186 and 242) is specified in nucleotides.

ment previously digested with the endonuclease *Taq*I (position -71, Fig. 2). In both lanes, a prominent transcript corresponding to an RNA molecule of approx. 186 bases was observed. This molecule has the expected size for an RNA transcript originating from the *P*₁ promoter (Fig. 2). In the case of lane c, a transcript of about 242 bases is missing. This suggests that this RNA is being initiated at or near the *Taq*I cleavage site. Fig. 4 also reveals two other minor transcripts corresponding to RNA molecules of 206 bases and 228 bases in length. Neither of these transcripts is affected by *Taq*I digestion of the *Hpa*II restriction fragment.

(e) Synthesis of truncated GDH polypeptides in minicells

To determine if restriction fragments such as those examined above could direct the synthesis of truncated *gdh* polypeptides in minicells, the *Hpa*II-*Hpa*II (-192 to +169, Fig. 2) and the *Taq*I-*Clal* fragments (-71, Fig. 2 to +330 of pSAE422 (not shown)), were cloned in both orientations in the *Clal* site of pBR327 using the advantage that the three enzymes leave the same ends. The resulting plasmids, pH1, pH2, pT10 and pT20 (Fig. 5A), were then used to transform the minicell-producing strain P678-54. Plasmids pBR327 and pSAE422, a derivative of pSAE4 that codes for a truncated GDH product of approx. M_r 13000 (Sánchez-Pescador et al., 1982) were also used to transform P678-54.

Fig. 5B shows that minicells carrying pH1 and pH2 (lanes e and f, respectively) synthesized a polypeptide of approx. M_r 7000, not present in cells carrying pBR327 (lane a). It is important to emphasize that the *Hpa*II-*Hpa*II fragment is capable of directing the synthesis of a truncated GDH polypeptide of the expected molecular mass (M_r 7000) in both orientations. Also important is the fact that cells carrying pH2 synthesize a more heavily labeled polypeptide than cells carrying pH1; we believe that this difference is due to the presence of the strong "anti-tet" promoter (Stüber and Bujard, 1981; West et al., 1982) that should increase transcription in pH 2 (Fig. 5A).

The results of pT10 and pT20 are shown in lanes c and d, respectively. It can be seen that, while pT20 directs the synthesis of a polypeptide of the expected molecular mass (M_r 13000), pT10 does not direct the synthesis of a similar polypeptide. These results indicate that the information located between positions +1 and -71 (the *Taq*I site) is not sufficient to promote GDH synthesis. The polypeptide seen in lane d (pT20) is possibly the result of transcription initiating from the anti-tet promoter. There is, however, a significant difference between the very strong band seen in Fig. 5B, lane d and the much weaker one seen in Fig. 5B, lane f. If both bands are the result of transcription initiating from the anti-tet promoter, the difference in intensity could be explained by the possibility that some of these truncated polypeptides are unstable.

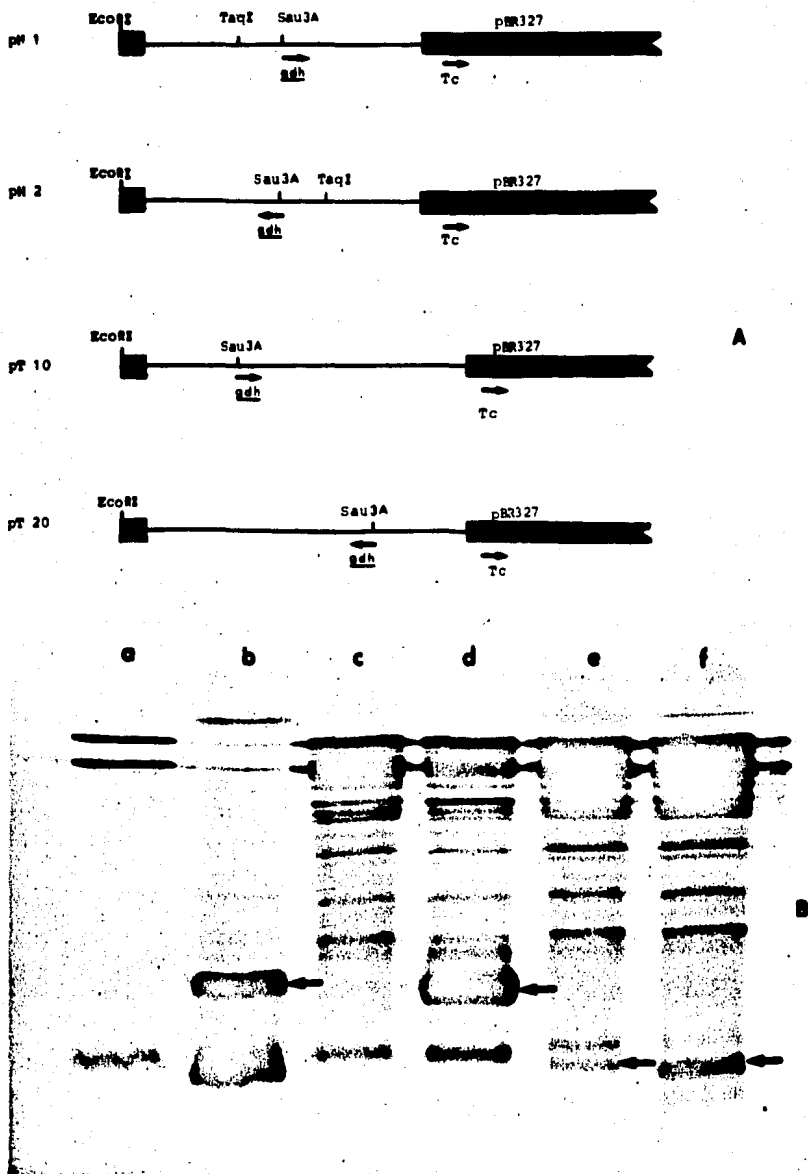


Fig. 3. Restriction maps of the recombinant plasmids and their polypeptide products. (A) Restriction map of hybrid plasmids carrying restriction fragments derived from plasmids pSAE4 and pSAE422. Plasmids pH1 and pH2 carry the 361-bp *HpaII* fragment from pSAE4 cloned in both orientations at the *ClaI* site of pBR327. Plasmids pT10 and pT20 carry a 415-bp *TaqI-ClaI* fragment from pSAE422 cloned in both orientations at the same site of the vector. Heavy line indicates the pBR327 portion of the plasmid. Arrows indicate the direction of transcription. *Tc*, tetracycline-resistance determinant. (B) Autoradiograph of an SDS-polyacrylamide gel showing plasmid-encoded proteins obtained from minicells. Lane a: pBR327; lane b: pSAE422; lane c: pT10; lane d: pT20; lane e: pH1; lane f: pH2. The arrows indicate the position of the expected polypeptides (see RESULTS, section d).

DISCUSSION

We have previously reported the construction of several recombinant plasmids that carry the complete or different sections of the *gdh* gene. These plasmids allowed us to determine the direction of transcription and the general location of the promoter region of this gene. In this report, we describe the cloning and sequencing of a DNA fragment that contains the promoter(s) as well as the amino-terminal region of the *gdh* gene.

The initiation codon for *gdh* is located approx. 300 bp from the poly(A) region that was generated during the construction of the *E. coli* gene bank by Clarke and Carbon (1975) (Covarrubias et al., 1980; Sánchez-Pescador et al., 1982). A DNA sequence resembling the consensus RBS can be found 13 bp from the initial ATG (position -13, Fig. 2; Shine and Dalgarno, 1981; Stormo et al., 1982). At positions -28, -52 and -77, we were able to identify three sites that meet the minimum criteria for prokaryotic promoters. These criteria are the Pribnow box, the -35 region and the purine nucleotide at the point of transcriptional initiation. Furthermore, all three sites were rich in A + T base pairs; over 60% of A + T is also characteristic of bacterial promoters (Table 1). On the basis of consensus sequence comparison, we have tentatively designated these sites as promoter 1 (P1), promoter 2 (P2), and promoter 3 (P3), respectively.

A comparison of the promoter sequences shown in Fig. 3 and the results of the in vitro transcription experiments provide some interesting possibilities regarding the transcriptional control of the *gdh* gene. For example, the smallest and predominant runoff transcript seen in Fig. 4 corresponds to an RNA molecule of approx. 186 bases, initiating from position -17 (Fig. 2). Initiation of a transcript from this position is consistent with putative promoter, P1. Furthermore, there are three minor transcripts whose estimated sizes are 206 bases, 228 bases and 242 bases. The 5' end of the smallest of these transcripts corresponds to position -39. This places the 206-base transcript in front of the Pribnow sequence for P2. The two largest of the minor transcripts have estimated lengths of 228 bases and 242 bases, which places their 5' ends at positions -59 and -73, respec-

tively. In this instance, the two transcripts are not placed appropriately with respect to the Pribnow box for P3. The 228-base transcript would have to initiate 12 bp in front of the Pribnow box while the 242-base RNA would originate within the Pribnow box itself. These inconsistencies can be explained in at least two ways. First, the estimates of all in vitro transcripts may vary by ± 5 bases. Second, the sequence of the 5' region of the *gdh* gene may harbor promoters not identifiable by consensus sequence comparison. However, it should be remembered that all transcripts originate from a 56-bp region (positions -17 to -73) within the 5' noncoding sequence and that the 242-base RNA is not transcribed from the *TaqI-HpaII* subfragment (Fig. 4, lane c). S1 nuclease mapping experiments are currently underway to determine which of these transcripts is actually synthesized in vivo.

It has been reported that cyclic AMP regulates the level of GDH and glutamine synthetase (Prusiner et al., 1972). It should be noted that a possible CRP-binding site, which shows strong similarity with the consensus CRP binding (Adhya et al., 1982) can be found between positions -76 and -99 (Fig. 2). The presence of such a site suggests that transcriptions from one or more of the putative promoters could be under carbon metabolism control.

The results presented in this paper do not allow us to define which of the putative promoters is responsible for transcription of the *gdh* gene. However, considering the important role played by GDH at the "metabolic cross-roads" where nitrogen is assimilated into organic compounds, it is not difficult to imagine the expression of GDH being governed by a complex regulatory mechanism. Such mechanism could involve a system of multiple promoters, where each promoter is subject to a different mode of regulation, depending on the metabolic conditions of the cell.

GDH is one of the few enzymes capable of fixing ammonia into organic compounds. Therefore, it is not surprising that GDH enzymes from different organisms show some degree of conservation of amino acid sequence. However, as can be seen in Fig. 3, the first 102 amino acids of the GDH enzyme from *E. coli* show only 18% homology to bovine GDH. On the other hand, *Neuro-*

spora and *E. coli* enzymes show approx. 56% homology with the highest degree of homology (80%) beginning at the proline residue at position 56. The recent work of Mattaj et al. (1982) reported the amino acid sequence of *E. coli* GDH from residues 56 to 164. They, too, identified a strong amino acid sequence homology (79%) between *E. coli* and *Neurospora* in this region. Their comparison of the *E. coli* GDH to bovine GDH revealed only 17% homology. This clearly indicates that the *E. coli* and *Neurospora* enzymes are more homologous to each other than either is to the bovine enzyme.

ACKNOWLEDGEMENTS

We should like to thank Lourival Possani, Guillermo Ramirez and Herbert Heyneker for technical advice and valuable criticism of the manuscript. We also thank Maria del Carmen Gonzalez and Christal DiModica for their assistance in typing this manuscript. This work was supported by a grant (PCCBNAL 790179) from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia, México, and by a UC:MEXUS Program Award to R.L.R. and F.B.

REFERENCES

- Adhya, S. and Gargus, S.: How cyclic AMP and its receptor protein act in *Escherichia coli*. *Cell* 29 (1982) 287-289.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Cross, J.H. and Falkow, S.: Construction and characterization on new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2 (1977) 95-113.
- Blumenthal, K.M., Moon, K. and Smith, E.L.: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific glutamate dehydrogenase of *Neurospora*. *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 3644-3654.
- Clarke, L. and Carbon, J.: Biochemical construction and selection of hybrid plasmids containing specific segments of the *Escherichia coli* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 4361-4365.
- Covarrubias, A.A., Sánchez-Pescador, R., Osorio, A., Bolivar, F. and Basterrechea, F.: ColE1 hybrid plasmid containing *Escherichia coli* genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine. *Plasmid* 3 (1980) 150-164.
- Davis, R.W., Botstein, D. and Roth, J.R.: *Advanced Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1980, pp. 140-141.
- Greene, P.J., Heyneker, H.L., Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Betlach, M.C., Covarrubias, A.A., Backman, K., Russel, D. Tait, R.C. and Boyer, H.W.: A general method for the purification of restriction enzymes. *Nucl. Acids Res.* 5 (1978) 2373-2380.
- Heidecker, G., Messing, J. and Gronenborn, B.: A versatile primer for DNA sequencing in the M13mp7 cloning system. *Gene* 10 (1980) 69-73.
- Mattaj, I.W., McPherson, M.J. and Wootton, J.C.: Localization of a strongly conserved section of coding sequence in glutamate dehydrogenase genes. *FEBS Lett.* 147 (1982) 21-25.
- Meager, R.B., Tait, R.C., Betlach, M.C. and Boyer, H.W.: Protein expression in *E. coli* minicells by recombinant plasmids. *Cell* 10 (1977) 521-536.
- Messing, J., Crea, R. and Seeburg, P.H.: A system for DNA sequencing. *Nucl. Acids Res.* 9 (1981) 309-321.
- Prusiner, S., Miller, R.E. and Valentine, R.C.: Adenosine 3'-cyclic monophosphate control of glutamine metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69 (1972) 2922-2926.
- Rodriguez, R.L., Tait, R.C., Shine, J., Bolivar, F., Heyneker, H.L., Betlach, M.C. and Boyer, H.W.: Characterization of tetracycline and ampicillin resistant plasmid cloning vehicles, in Scott W.A. and Werner R. (Eds.) *Molecular Cloning of Recombinant DNA*. Academic Press, New York, 1977, pp. 73-84.
- Rosenberg, M. and Court, D.: Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.* 13 (1979) 319-353.
- Sakamoto, N., Kotre, A.M. and Savageau, M.A.: Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: Purification and properties. *J. Bacteriol.* 124 (1975) 775-783.
- Sánchez-Pescador, R., Sanvicente, E., Valle, F. and Bolivar, F.: Recombinant plasmids carrying the glutamate dehydrogenase structural gene from *Escherichia coli* K-12. *Gene* 17 (1982) 1-8.
- Shine, J. and Dalgarno, L.: The 3' terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 1342-1346.
- Smith, F., Austen, B., Blumenthal, K.M. and Nyc, J.: Glutamate dehydrogenases. in Boyer, P.D. (Ed.) *The Enzymes*, Vol. XI. Academic Press, New York, 1975, pp. 293-367.
- Soberón, X., Covarrubias, L.R., and Bolivar, F.: Construction and characterization of new cloning vehicles. IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325. *Gene* 9 (1980) 287-305.
- Stormo, G.D., Schneider, D.T. and Gold, L.M.: Characterization of translational initiation sites in *E. coli*. *Nucl. Acids Res.* 10 (1982) 2971-2996.
- Stüber, D. and Bujard, H.: Organization of transcriptional signals in plasmids pBR322 and pACYC184. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 167-171.
- Tait, R.C., Rodriguez, R.L. and West, R.W.: The rapid purification of T4 DNA ligase from a AT4/lig lysogen. *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 813-814.
- Vollenweider, H.J., Fianchi, M. and Szybalski, W.: A relation-

ship between DNA helix stability and recognition sites for RNA polymerase. *Science* 205 (1979) 508-511.

West J., R.W. and Rodriguez, R.L.: Construction and characterization of *Escherichia coli* promoter probe plasmid

vectors, III. pBR322 derivatives with deletions in the tetracycline-resistance promoter region. *Gene* 20 (1982) 299-304.

Communicated by W. Szybalski.

DISCUSION

Covarrubias et al (15, 16) reportaron el aislamiento y caracterización preliminar de tres plásmidos híbridos de ColEI (pACR1, pRSP1 y pRSP20) provenientes del banco de genes de E. coli construido por Clarke y Carbon (11). El plásmido pACR1 complementó dos diferentes mutaciones en glnA, mientras que el pRSP1 y el pRSP20 complementaron las mutaciones gdh-1 y gltB31, respectivamente, en la cepa PA340 de E. coli (ambas mutaciones son necesarias para producir un auxótrofo de glutamato) (6). Se encontraron altos niveles de actividad específica enzimática en las cepas complementadas. Las cepas merodiploides que llevan los plásmidos pRSP1 y pRSP20 poseen una actividad específica para la GDH y la GOGAT, respectivamente, aproximadamente 2.5 veces más alta que la que presenta la cepa silvestre GS520. Evidencias posteriores demostraron conclusivamente que los plásmidos pACR1 y pRSP20 contenían los genes estructurales para las enzimas GS y GOGAT, respectivamente (12, 14, 29).

Para el caso del plásmido pRSP1, con el fin de eliminar la posibilidad de que alguna otra región de DNA cromosomal diferente del gene gdh silvestre complementara la mutación (trans-dominancia), además de las pruebas de complementación y determinación de la actividad específica, se llevaron a cabo experimentos de electroforesis en una y dos dimensiones e inmunoprecipitación específica de las proteínas codificadas por los plásmidos en un sistema de minicélulas. Estos ensayos bioquímicos nos demuestran claramente que el gene estructural para la GDH de E. coli está presente en el pRSP1 (en un fragmento de DNA cromosomal de aproximadamente 4.6 Md). Lo

mismo es cierto para algunos derivados de este plásmido: pRSP5, pSAE1 y pSAE4. En estos derivados también se observa que el incremento en la actividad específica de la enzima es de 2.5 veces aproximadamente (Sanvicente et al, 1983).

Aunque no hemos determinado el número de copias de plásmido por célula, suponemos que estos plásmidos híbridos se presentan en la célula en un número de copias similar al que presenta el vehículo molecular del cual provienen (15-20 copias/célula) (13). Esto nos hablaría entonces de una desproporción entre dosis génica y actividad específica, lo que nos lleva a pensar en un sistema de regulación positiva mediado por un factor presente en cantidades limitantes.

Por experimentos de inmunolectroforesis cuantitativa, se observa que el nivel de actividad específica correlaciona con la cantidad de enzima producida por la célula mutante portadora del plásmido gdh⁺. Por otro lado, también fue posible detectar en la cepa PA340, la presencia de un antígeno que cruza con los anticuerpos específicos anti-GDH y que además es producido en cantidades similares al correspondiente antígeno en la cepa silvestre CS520. Esto sugiere que la mutación gdh-1, hasta entonces completamente desconocida, cae dentro del gene estructural, anulando la actividad enzimática de la proteína codificada pero conservando sus propiedades anti-génicas (Sanvicente et al, 1983).

El gene gdh se localiza en un fragmento de aproximadamente 2.3 Md en el plásmido pSAE4, flanqueado por los sitios de restricción de EcoRI (antes BglII en el pRSP1 y pRSP5) y PstI. Este fragmento representa un poco más del doble del

DNA necesario para contener al gene.

Con el fin de encontrar la posición exacta del gene en ese fragmento, localizar la región donde se inicia la transcripción y determinar su dirección, se llevó a cabo un análisis con enzimas de restricción (mapeo físico) del pSAE4, lo que nos permitió construir varios derivados de este plásmido (pSAE41, pSAE42, pSAE421 y pSAE422) (Sánchez Pescador et al, 1982). Al observar las proteínas codificadas por estos plásmidos en un sistema de minicélulas, y por experimentos de unión de polimerasa de RNA a fragmentos de DNA, se pudo inferir la dirección de transcripción del gene y la posición donde se inicia el gene estructural. Con estos datos se propuso que la transcripción se iniciaría a unas 300 pb, aproximadamente, del sitio de HpaI (coordenada 3, Fig. 3, Sánchez Pescador et al, 1982) hacia PstI y que la transcripción procede desde PstI hacia EcoRI en el pSAE4. Para corroborar esta suposición, se decidió secuenciar el fragmento de HpaI a PstI de 610 pb en promedio, de dicho plásmido.

Para este fragmento se obtuvo una secuencia de 498 pb, el resto comprende la región de poli AT que se incorporó al construir el banco de genes (11).

El análisis de la secuencia nucleotídica obtenida presenta las siguientes características:

Se buscaron y encontraron en esta secuencia 4 ATGs, y sólo la fase de uno de ellos no presenta ningún codón de terminación. La comparación de los primeros aminoácidos codificados en esta fase con la secuencia obtenida de los primeros 7 aminoácidos pertenecientes al amino terminal de la

proteína GDH de E. coli (efectuado en el laboratorio del Dr. L. Possani del IIBM de la UNAM), resultó ser completamente homóloga. Esto indica que el codón de iniciación del gene gdh se localiza a 193 pb de la región poli A (Fig. 2, Valle et al., 1983). La secuencia de los aminoácidos inferidos en esta fase se muestra también en la misma figura. Las otras secuencias inferidas son las siguientes (los números en paréntesis se refieren al primero y último nucleótido del codón):

1. (-149 a -84) Met-Arg-Leu-Leu-Ser-Leu-Leu-Ile-Cys-Phe-Pro-Gly-Ser-Phe-Phe-Ser-Cys-Leu-Pro-Ser-His-Ser
2. (-81 a -76) Met-Val
3. (-53 a -48) Met-Thr

Por comparación con las secuencias consenso, pudieron detectarse en la región que antecede al ATG inicial (región reguladora), un sitio probable de unión a ribosoma, tres posibles promotores (P1, P2 y P3) y un posible sitio de unión a CRP. Se encontraron también en esa región, secuencias repetidas directas rodeando a los presuntos promotores (Fig. 2, Valle et al., 1983).

El estudio de la región reguladora del gene gdh, tanto de E. coli como de otros organismos, es importante por varias razones:

1) Determinar si la expresión de este gene está regulada por un mecanismo similar al de atenuación de la transcripción que se presenta en otros operones de biosíntesis de aminoácidos,

ii) Identificar las probables secuencias nucleotídicas

involucradas en el control por nitrógeno, un paso importante para intentar comprender los mecanismos de este control a ni vel molecular,

iii) Identificar algún otro mecanismo regulador alternati vo involucrado.

El análisis de la región reguladora de gdh se está lle- vando a cabo en el laboratorio, sin embargo, es interesante comentar que el análisis nucleotídico de esta región no mos- tró contener ninguna de las características típicas de las regiones reguladoras de los operones de biosíntesis de amino ácidos:

1. No contiene una secuencia típica de atenuación de la transcripción (no se encontraron secuencias repetidas inver- tidas donde el DNA o el RNA pudieran formar estructuras se- cundarias de tallo y asa),

2. Aunque existen tres secuencias que potencialmente pu- dieran codificar para pequeños polipéptidos (péptidos líder) es improbable que alguna de estas secuencias sea de importan- cia en regulación, ya que

a. Todas ellas poseen un codón de terminación antes del ATG inicial,

b. Dos de ellas (1 y 2) están localizadas hacia el extremo 5' de los tres probables sitios de iniciación de la transcripción, por lo tanto, no serían transcritas ni tradu- cidas,

c. La tercera de las secuencias se encuentra después del probable promotor P₃, pero es muy corta, únicamente posee dos residuos de aminoácidos, y

d. Ninguno de estos péptidos contiene codones para glutamato.

Esto indica que la atenuación, mediada por la terminación prematura de la transcripción, no es el mecanismo por el cual la expresión de este gene está regulada.

Por otro lado, Higgins y Ames (23) proponen que las secuencias con simetría de imagen en el espejo identificadas en la región reguladora de glnA, argTr y dhuA de S. typhimurium, están involucradas en el mecanismo de regulación por nitrógeno (sistema gln) (los genes que están bajo el control de estas tres regiones están sujetos a la regulación por nitrógeno). En E. coli se ha observado que el gene gdh no está bajo el control del sistema gln. Sin embargo, en la secuencia obtenida de la región reguladora de este gene, gruesamente se puede observar una simetría de imagen en el espejo (-24 a -41 y -90 a -102), que pudiera también considerarse en el contexto de un cierto control, diferente al que presenta glnA.

Particularmente interesante sería la comparación entre las regiones reguladoras de los genes para GDH y asparagina sintetasa NH_4^+ dependiente de E. coli, ya que ambas enzimas presentan ciertas semejanzas fisiológicas, como lo es asimilar amonio cuando éste se encuentra en altas concentraciones. También lo es la comparación de la región reguladora del gene gdh de E. coli con la del correspondiente gene en otras enterobacterias, como S. typhimurium (que tampoco presenta regulación por el sistema gln) o K. aerogenes (que si la presenta).

En S. typhimurium existe además otro aspecto interesante. Los datos arrojados por los estudios preliminares mues-

tran que existen marcadas diferencias con E. coli en la expresión de estos genes en células mutantes portadoras de plásmidos híbridos gdh⁺: en S. typhimurium la actividad específica enzimática se incrementa 30-100 veces, y en E. coli sólo 2.5 veces, con respecto al nivel de las células haploides (33). Al momento desconozco si en la mutante de S. typhimurium portadora del plásmido gdh⁺, correlaciona el nivel de actividad específica con cantidad de enzima, como sucede en el caso de E. coli, y si el número de copias de plásmido por célula es semejante o mayor al que se presenta en E. coli (ambos plásmidos híbridos gdh⁺ son derivados del pBR).

Haciendo el estudio comparativo más extenso, pueden compararse con el gene gdh de E. coli otros genes que no se encuentren bajo el control por el sistema gln (del mismo y otros microorganismos) u otros operones de biosíntesis de aminoácidos. Esto se facilitaría con las técnicas computarizadas.

En el laboratorio se está llevando a cabo el estudio, tanto "in vivo" como "in vitro", de la función de los posibles promotores P1, P2 y P3; transcripción de fragmentos de DNA, fuerza del promotor(es), análisis de la expresión y regulación de genes (Cm^R, Tc^R) que se encuentran bajo control del promotor(es) de gdh probando diferentes fuentes de nitrógeno y de carbono.

Claramente, el significado funcional de todas las secuencias interesantes encontradas en la región reguladora, aguarda a ser resuelto. En un futuro se pretende analizarlas en detalle, por ejemplo, buscando posibles proteínas reguladoras y efectuar con ellas estudios sobre interacción pro-

teína-DNA, aislando mutantes apropiadas, estableciendo el modo de regulación del sistema ANPc-CRP, etc.

Será posible también hacer modificaciones o substituciones en la región reguladora de gdh para ciertos fines específicos:

Methilophilus methilotropus es un organismo que se utiliza industrialmente en la producción de proteína unicelular a partir de metanol, carece naturalmente de GDH y sintetiza ácido glutámico a través de la vía GS-GOGAT (45). Se pretende introducir el gene gdh de E. coli en M. methilotropus para ahorrarle un gasto de energía en la biosíntesis de glutamato y de esta manera incrementar la producción de proteína unicelular, aumentando su rendimiento. Empleando esta biotecnología, la Compañía ICI ha logrado un aumento del 5% en el rendimiento. (40). Más aun, en el laboratorio se pretende aumentar la fuerza de transcripción del gene gdh dada por el promotor(es) natural(es) sustituyéndolo por otros promotores.

Generalizando, el análisis comparativo de la región de control (y también estructural) de gdh de E. coli con otras enterobacterias primero, y con otros organismos después, así como las diferencias y semejanzas en fisiología que presentan dichos organismos, el aislamiento y estudio de proteínas reguladoras (silvestres y mutantes), la observación del comportamiento de diversas cepas mutantes, etc., nos llevará al conocimiento fino de la regulación de dicho gene en cada especie particular.

Otro tipo de información interesante que se puede obtener del análisis de la secuencia nucleotídica de este gene, es la que se refiere a la estructura primaria de esta enzima (y gracias al esclarecimiento de la estructura primaria, es posible realizar algunos estudios a nivel molecular).

La GDH es una de las pocas proteínas capaces de fijar amonio en compuestos orgánicos. Por tanto, no es sorprendente que exista un alto grado de similitudes entre las GDHs de diversos organismos en lo que respecta, por ejemplo, a peso molecular, estructura del oligómero, inmunoquímica, composición y secuencia de aminoácidos, estructura, etc.

En general, la composición de aminoácidos entre varias GDHs analizadas es extraordinariamente similar (y distinta de la composición de aminoácidos de la mayoría de otras deshidrogenasas), por ejemplo, la proporción de arginina a lisina es relativamente alta. Hasta el momento no se han detectado puentes disulfuro en ninguna GDH (no es claro el papel catalítico de los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína en la actividad de la enzima) (41).

Por secuenciación de la región de DNA (y su transcripción al RNAm correspondiente) que codifica para la porción amino terminal de la GDH de E. coli, hemos inferido la secuencia de los primeros aminoácidos de la proteína (Valle et al., 1982).

Por secuenciación de fragmentos peptídicos, se ha determinado el orden de aminoácidos de las GDHs de hígado bovino, de hígado de pollo y las dos de N. crassa (1, 8, 22).

En este trabajo hemos comparado las secuencias de dichas

proteínas, por lo que es conveniente revisar un poco sobre ellas.

En las enterobacterias E. coli y S. typhimurium, se han detectado GDHs muy similares en sus propiedades moleculares. En su forma nativa, la GDH de E. coli tiene un $PM \approx 300\ 000$ d y la de S. typhimurium de $280\ 000$ d, y ambas constituyen un oligómero (hexámero) formado por subunidades idénticas (aproximadamente $50\ 000$ y $46\ 700$ d por subunidad, respectivamente) (41).

La GDH de hígado de bovino posee un $PM \approx 332\ 000$ d y con tiene también seis cadenas polipeptídicas idénticas ($55\ 390$ d por subunidad). La GDH de hígado de pollo tiene tres residuos adicionales en el amino terminal de su cadena polipeptídica (41).

En N. crassa, la GDH-NADP posee 48 residuos menos que la enzima bovina y está también constituida en un hexámero de unidades idénticas. Sin embargo, el tamaño de la GDH-NAD ($480\ 000$ d) del mismo organismo, es muy diferente de los mencionados; esta enzima está conformada en un tetrámero de subunidades idénticas (1, 22, 41).

Las enzimas de pollo y bovino exhiben una homología muy grande: en 500 aminoácidos que ambas enzimas poseen en común (que son el total de aminoácidos de la subunidad de GDH bovina), existen sólo 27 aminoácidos diferentes.

Aunque la GDH-NADP de N. crassa es más corta que las enzimas de vertebrados (bovino y pollo), existe una considerable homología entre estas proteínas, dependiendo en algún

grado de la presencia de cierto número de deslizamientos de una proteína con respecto a la otra. Los residuos que por modificación química han mostrado influenciar la unión de reguladores alostéricos en la GDH bovina, han sido todos encontrados en la región carboxilo terminal. Ya que la GDH-NADP de N. crassa no exhibe las respuestas alostéricas a ADP y GTP que exhiben las GDHs de los vertebrados, es lógico suponer que las diferencias en secuencia deben ser más pronunciadas en esta región. Los datos proporcionados por la comparación de las secuencias de aminoácidos confirman esta suposición: esta comparación revela que existe una significativa homología particularmente dentro de los primeros 220 residuos de la cadena de Neurospora (donde se encuentran 55 residuos idénticos en un segmento de 82 residuos). La homología es menos sorprendente en el resto de la molécula, existiendo cortas regiones de identidad. Dentro de los límites impuestos por el alineamiento, la homología entre las GDHs de N. crassa (NADP dependiente) y de los vertebrados pollo y bovino es de 18.3%, y los aminoácidos diferentes que representan cambio de una sola base en su codón, constituyen el 41.8% (41).

El examen de la naturaleza de los residuos conservados en la GDH-NADP de N. crassa y las enzimas de los vertebrados (21 glicinas, 10 lisinas, 8 alaninas, 8 valinas, etc.), indica que al menos 2/3 partes de los residuos idénticos deben ser críticos para mantener la conformación protéica más que para la catálisis (41).

Además de estas identidades aminoacídicas, se observa un gran número de substituciones altamente conservativas, por ejemplo, retienen cadenas laterales similares, lo que también.

los hace suponer importantes para los efectos conformacionales más que para los catalíticos.

De esta manera, la información concerniente a las estructuras primaria y terciaria de las proteínas, ha indicado que la conservación de la estructura tridimensional entre enzimas relacionadas es tal vez más importante que la retención estricta de la secuencia (2, 41). Esta estructura tridimensional debe estar involucrada en la función, constituyendo así un dominio, el cual a su vez puede estar subdividido en regiones (21).

Estudios sobre variabilidad de la función enzimática por modificación química de residuos, protección a ésta por unión a sustrato o coenzima, reemplazamientos de aminoácidos en mutantes y sus revertantes, etc., proporcionan una definición clara del papel de ciertos residuos. Todas las GDHs mencionadas contienen un residuo de lisina activa (número 126 en bovino, 129 en pollo y 113 en Neurospora) que se asocia con unión a sustrato; este residuo está localizado en la parte de la secuencia que exhibe la mayor homología, en el dominio de unión a sustrato (41).

Es sorprendente que no se encuentren coincidencias de residuos de cisteína, metionina, histidina y triptofano entre las GDHs de Neurospora y de vertebrados. Esto no excluye, de ninguna manera, que tales residuos estén localizados en el sitio activo o participen en la actividad catalítica en estas enzimas homólogas. Ya que las cadenas polipeptídicas son de diferentes longitudes, los residuos pueden asumir la misma posición en la estructura tridimensional a pesar de las diferencias en secuencia (41).

En esta tesis solamente se presenta la secuencia de 102 aminoácidos, pertenecientes al amino terminal, de la GDH de E. coli. Teniendo en cuenta que el PM por subunidad es de 50 000 d en promedio, y asignando a cada aminoácido un promedio de 110 d, esta subunidad enzimática constaría aproximadamente de 430 residuos de aminoácidos, lo que significa que se ha determinado cerca de la cuarta parte de la secuencia de la proteína. Para esta región hemos encontrado una gran homología con las GDHs de pollo y bovino y con la GDH-NADP de N. crassa (Valle et al, 1983). El análisis comparativo se ha clasificado en tres tipos y los resultados se resumen en la siguiente tabla (E = E. coli, N = N. crassa, B = bovino):

IDENTIDAD	NO IDENTIDAD		DISCREPANCIA
	cambio de una base	carga o estructura semejante	
EN	57%	23%	14%
NB	23%	33%	30%
EB	20%	40%	30%

En la tabla se observa que al analizar los tres aspectos simultáneamente, se presenta un porcentaje mayor al 100%, ya que ciertos elementos se han contado dos veces, por cambio de una sola base en su codón y por su polaridad o cadena la teral.

Por otra parte, las diferencias en longitud de segmentos internos que se observan al comparar estas proteínas, reflejan inserciones o deleciones de nucleótidos en los genes correspondientes, que debieron haber ocurrido durante el proceso evolutivo.

Es interesante notar que, por lo menos en esa región de 102 aminoácidos, existe mayor homología entre las GDHs de E. coli y N. crassa, que entre Escherichia y bovino o Neurospora y bovino. Estos resultados deben tomarse con mucha cautela ya que no se están comparando las secuencias completas de las proteínas, sino sólo una parte de ellas. Sin embargo, coinciden con el hecho de que tanto la GDH de E. coli como la de N. crassa son NADP dependientes, y la GDH bovina tiene una especificidad dual por la coenzima (puede funcionar tanto con NAD como con NADP) (41).

Por analogía con las secuencias conocidas de GDH, es permisible suponer que la de E. coli posea también un residuo activo de lisina. En este trabajo no se logró determinar la secuencia de aminoácidos alrededor de este residuo (residuo número 113 en Neurospora), pero se espera que la homología siga presentándose fuertemente a lo largo de unos 100 residuos más.

Mediante el análisis comparativo adecuado de las proteínas de diferentes organismos, pueden establecerse las relaciones genéticas (evolutivas) existentes entre ellos, ya que aquéllas constituyen el producto directo de traducción de material genético. (Sin embargo hay que recordar que este análisis no es el único criterio para establecer las relaciones genéticas).

Son útiles varios aspectos comparativos de la estructura proteica: ensayos inmunológicos de reactividad cruzada, determinación de diferencias en movilidad electroforética, y para el caso particular de enzimas, especificidad de substra

to, de coenzima, de modificadores alostéricos; pero el aspecto más directo es la composición y secuencia de aminoácidos (estructura primaria) (19).

De esta manera, todo un programa de evolución de los organismos puede desarrollarse sobre bases proteicas. Estos estudios le conciernen a la paleogenética química, una nueva disciplina.

Siendo las proteínas sustancias complejas raramente son idénticas, pero en la mayoría de las proteínas homólogas estudiadas, se ha observado que las estructuras terciarias se conservan, aun cuando sus secuencias contienen gran número de sustituciones de aminoácidos (19, 41). Tal similitud de estructuras es un testimonio impresionante hacia la evolución de todos los organismos a partir de un ancestro(s) común(es), confirmando los criterios clásicos de evolución (morfológicos, embriológicos, estudios sobre fósiles) (19). Resulta improbable que dos organismos no relacionados hubieran manufacturado independientemente tales estructuras similares y preservarlas a través de la selección natural. Por otro lado, la evolución gradual a partir de un ancestro común, a través de millones de generaciones, proporciona una explicación convincente para las similitudes y diferencias entre las secuencias de aminoácidos de una misma proteína.

En el caso particular de GDH, se ha observado que todas las GDHs de estructura tridimensional conocida, poseen conformaciones similares para el dominio de unión a coenzima (41), implicando un origen (gene ancestral) común para esta clase de enzima a pesar de las diferencias en especificidad de sustrato y estructura de la subunidad.

Hasta el momento no hemos realizado estudios sobre estructura secundaria y terciaria de la GDH de E. coli. Chou y Fasman (17) desarrollaron una fórmula que se utiliza para calcular la estructura secundaria más probable de una proteína cuya secuencia es conocida. Aunque el conocimiento de la estructura primaria proporciona información respecto a las posibles relaciones evolutivas, es conveniente aplicar estas reglas empíricas de predicción.

El grado de diferencia entre las especies presentes y el orden de su derivación a partir de ancestros comunes, generalmente están representados por un árbol filogenético. Es posible derivar tal árbol de los datos de secuencia de proteínas.

A fin de explotar las posibilidades en este campo, en el laboratorio intentamos establecer un programa de computadora para analizar las relaciones evolutivas entre proteínas. Nosotros utilizamos como modelo el de las GDHs. Este es el trabajo que esencialmente llevó a cabo Jaime Lagúnez. Se utilizó un sistema similar al de Fitch y Margoliash para detectar la relación filogenética.

Se logró detectar automáticamente los deslizamientos (que representan deleciones o inserciones en el genoma) de una proteína con respecto a la otra con el fin de encontrar máxima identidad. Se determinó la distancia mínima de mutación entre las diferentes secuencias comparadas. Esta se define como el número de bases que requieren ser reemplazadas para que una secuencia quede transformada en otra. Se encontró que la distancia mínima de mutación entre E. coli y N. crassa es 30% menor que la de Neurospora y bovino. Sin embargo, para poder establecer un árbol filogenético más o

menos real y preciso, es necesario contar con la secuencia completa no de una, sino de varias proteínas, y tener en cuenta que lo que se calcula es la distancia mínima de mutación y no la real; tampoco hay que olvidar que la velocidad de mutación difiere entre diferentes ramas filogenéticas.

En resumen, el estudio de la secuencia de aminoácidos de una proteína es parte de una serie de investigaciones sobre estructura, función y regulación, tanto como sus relaciones evolutivas.

El hecho de que las cadenas polipeptídicas de las GDHs de diferente origen tienen sitios de unión específicos y distintos para coenzimas, substratos, ADP y GTP, representa un interesante desafío en la resolución de dichos problemas. El gran número de otros tipos de compuestos, por ejemplo hormonas, que pueden unirse a la GDH e influenciar su actividad enzimática (41) también son problemas interesantes, aunque el papel fisiológico de muchas de estas sustancias está obscuro todavía.

Ya que la GDH de E. coli, de N. crassa y de algunos otros organismos no exhiben la respuesta reguladora de las enzimas de vertebrados con los nucleósidos purínicos di y tri fosfatados, pueden servir como un modelo simplificado para el estudio de características estructurales importantes para mantener la conformación y la actividad enzimática.

Con la secuencia completa del gene gdh y de la proteína de E. coli podrán realizarse los estudios correspondientes, tanto evolutivos como de conformación proteica, identificación de dominios y residuos activos, etc.

CONCLUSION

Gracias a las técnicas de Ingeniería Genética, ha sido posible aislar y clonar el gene gdh de E. coli. Uno de los objetivos de este proyecto es conocer la regulación a la que está sujeta dicho gene. En el laboratorio se empieza ya a trabajar en este punto. Los estudios de regulación se harán en colaboración con el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno.

En vista de la gran identidad observada entre las GDHs de E. coli y de N. crassa, podrá ser posible el aislamiento del gene estructural para la GDH-NADP de Neurospora utilizando como detector (un fragmento de) el gene de E. coli. De hecho, estos experimentos se han estado realizando ya por miembros del citado Centro. Como en E. coli, el aislamiento del gene gdh de Neurospora facilitará y completará los estudios fisiológicos y genéticos que conducirán a la comprensión de su función y su comportamiento.

Todo esto contribuirá, junto con los estudios llevados a cabo con otros genes del metabolismo nitrogenado, al esclarecimiento de los mecanismos de asimilación y flujo de nitrógeno a través de las diferentes vías metabólicas.

BIBLIOGRAFIA

1. Austen, B.M., Haberland, M.E., Nyc, J.F., Smith, E.L. 1977
J. Biol. Chem. 252: 8142-8149
2. Austen, B.M., Haberland, M.E., Smith, E.L. 1980
J. Biol. Chem. 255: 8001-8004
3. Ausubel, F.M., Bird, S.C., Durbin, K.J., Janssen, K.A.,
Margolskee, R.F., Peskin, A.P. 1979
J. Bacteriol. 140: 597-606
4. Bender, R.A., Macaluso, A., Magasanik, B. 1976
J. Bacteriol. 127: 141-148
5. Bender, R.A., Magasanik, B. 1977
J. Bacteriol. 132: 106-112
6. Berberich, M.A. 1972
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47: 1498-1503
7. Bloom, R.R., Streicher, S.L., Tyler, B. 1977
J. Bacteriol. 138: 983-990
8. Blumenthal, K.M., Moon, K., Smith, E.L. 1975
J. Biol. Chem. 250: 3644-3654
9. Brenchley, J.E., Baker, C.A., Patil, L.G. 1975
J. Bacteriol. 124: 182-189
10. Brenchley, J.E., Prival, M.J., Magasanik, B. 1973
J. Biol. Chem. 248: 6122-6128

11. Clarke, L., Carbon, J. 1975
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 4361-4365
12. Covarrubias, A.A., Bastarrachea, F. 1983
Mol. Gen. Genet. 190: 171-175
13. Covarrubias, L., Cervantes, L., Covarrubias, A., Soberón, X., Vichido, I., Blanco, A., Kupersztoch-Portnoy, Y.M., Bolivar, F. 1981
Gene 13: 25-35
14. Covarrubias, A.A., Rocha, M., Bolivar, F., Bastarrachea, F. 1980 a
Gene 11: 239-251
15. Covarrubias, A., Sánchez Pescador, R., Lozoya, E., Bastarrachea, F., Bolívar, F. 1980
En "Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation", eds. J. Mora y R. Palacios, pp. 123-137, New York, Academic Press.
16. Covarrubias, A., Sánchez Pescador, R., Osorio, A., Bolivar, F., Bastarrachea, F. 1980b
Plasmid 3: 150-164
17. Chou, S.Y., Fasman, G.D. 1979
Biophys. J. 26: 367-384
18. Darrow, R.A. 1980
En "Glutamine: Metabolism; Enzymology and Regulation", eds. J. Mora y R. Palacios, pp. 139-166, New York, Academic Press

19. Dayhoff, M.O. 1969
Sci. Am. Julio 86-95
20. Dendinger, S.M., Patil, L.G., Brenchley, J.E. 1980
J. Bacteriol. 141: 190-198
21. Haberland, M.E., Chen, Ch-W, Smith, E.L. 1980
J. Biol. Chem. 255: 7993-8000
22. Haberland, M.E., Smith, E.L. 1980
J. Biol. Chem. 255: 7984-7992
23. Higgins, C.F., Ames, G. F-L. 1982
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 1083-1087
24. Hummelt, G., Mora, J. 1980
Biochem. Biophys. Res. Commun. 92: 127-133
25. Kustu, S., Burton, D., Garcia, E., McCarter, L., McFarland, N. 1979
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4576- 4580
26. Lehninger, A.L. 1975
Biochemistry, 2nd ed., Worth Publ. In., New York, USA
27. Leonardo, J.M., Goldberg, R.B. 1980
J. Bacteriol. 142: 99-110
28. Liang, A., Houghton, R.L. 1981
J. Bacteriol. 146: 997-1002
29. Lozoya, E., Sánchez Pescador, R., Covarrubias, A., Vichi
do, I., Bolivar, F. 1980
J. Bacteriol. 144: 616-621

30. Magasanik, B. 1982
Ann. Rev. Genet. 16: 135-168
31. Magasanik, B.M., Prival, M.J., Brenchley, J.E., Tyler, B. M., DeLeo, A.B., Streicher, S.L., Bender, R.A., Paris, C. G. 1974
En "Current Topics in Cellular Regulation", eds. B.L. Ho recker y E.R. Stadtman, vol. 8, pp. 119-138, Academic Press Inc., New York
32. Magasanik, B., Rothstein, D.M. 1980
En "Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation" eds. J. Mora y R. Palacios, pp. 61-68, New York, Academic Press
33. Miller, E.S., Brenchley, J.E. 1982
Fed. Proc. 41: 758
34. Nagatani, H., Shimizu, M., Valentine, R.C. 1971
Arch. Microbiol. 79: 164-175
35. Pahl, G., Zelenetz, A.D., Tyler, B. 1978
J. Bacteriol. 133: 139-148
36. Prusiner, S., Miller, R.E., Valentine, R.C. 1972
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2922-2926
37. Rosenfeld, S.A., Dendinger, S.M., Murphy, C.H., Brenchley, J.E. 1982
J. Bacteriol. 150: 795-803
38. Sales, M., Brenchley, J.E. 1982
Mol. Gen. Genet. 186: 263-268

39. Senior, P.J. 1975
J. Bacteriol. 123: 407-418
40. Senior, P.J., Windass, J. 1980
Biotech. Lett. 2: 205-210
41. Smith, E.L., Austen, B.M., Blumenthal, K.M., Nyc, J.F.
1975
En "The Enzymes", ed. P.D. Boyer, vol. XI, parte A,
pp. 293-367
42. Streicher, S.L., DeLeo, A.B., Magasanik, B. 1976
J. Bacteriol. 127: 184-192
43. Tyler, B. 1978
Ann. Rev. Biochem. 47: 1127-1162
44. Umbarger, H.E. 1978
Ann. Rev. Biochem. 47: 533-606
45. Windass, J.D., Worsey, M.J., Pioli, E.M., Pioli, D., Barth,
P.T., Atherton, K.T., Dart, E.C., Byron, D., Powell, K.,
Senior, P.J. 1980
Nature 287: 396-401