



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional
y de Posgrado del Colegio de Ciencias
y Humanidades

Caracterización genética de la resistencia
al metilamonio en Escherichia coli K12.

T E S I S

Que para optar al grado de
Doctor en Investigación Biomédica Básica
p r e s e n t a

LUIS SERVIN GONZALEZ

Centro de Investigación sobre Ingeniería
Genética y Biotecnología

1 9 8 7.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INTRODUCCION

4. REGULACION DE LA ASIMILACION DE COMPUESTOS NITROGENADOS EN «ESCHERICHIA COLI»

F. Bastarrachea, L. Servin-Gonzalez y A.A. Covarrubias

Introducción. La glutamin-sintetasa, enzima clave del metabolismo nitrogenado

Regulación de la biosíntesis de la glutamin-sintetasa y otros sistemas Ntr
Organización molecular de la región glnA de E. Coli
Bibliografía

INTRODUCCION. LA GLUTAMIN-SINETASA. ENZIMA CLAVE DEL METABOLISMO NITROGENADO

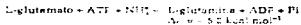
Muchas de la larga trayectoria evolutiva recorrida, los seres vivos han incorporado en su patrimonio genético la información necesaria que les permite utilizar, de manera eficaz y versátil, los recursos nitrogenados que se encuentran en el medio. Los microorganismos procariontes poseen la facultad de utilizar el amonio como fuente orgánica como fuente de nitrógeno celular.

En las enterobacterias, la asimilación del amonio ocurre mediante dos vías conocidas una que se debe a la participación de la dosificación glutámica, que cataliza la formación de glutámico a través de la amination reductiva del 2-oxoglutarato por el amonio, y la otra que ocurre gracias a la formación de glutamina a partir de amonio y glutamato, en una reacción, dependiente de ATP, catalizada por el enzima glutamin-sintetasa. Las reacciones de estos enzimas, suñadas a la actividad de la glutamino-sintetasa, encargada de la síntesis de glutamato por la transaminación reductiva del 2-oxoglutarato, donde la glutamina funciona como donador de su grupo amido, se encuentran articuladas dentro de un sistema coordinado de asimilación de amonio y producción de glutamato y glutamina.

Dado que la formación de glutamina ocurre exclusivamente por una vía enzimática, el enzima responsable de

esta función, la glutamin-sintetasa, reviste importancia crucial en la fisiología bacteriana, en virtud de participar en el primer paso de una vía metabólica, profusamente ramificada, que conduce al glutamato. Instancia a la sintetasa, se cast cada las macromoléculas lipídicas, azúcares y la célula.

Investigaciones en *Escherichia coli* (1) han permitido caracterizar la glutamin-sintetasa como un enzima oligomérico, constituido por 12 subunidades idénticas, con actividad catalítica independiente y que se encuentran dispuestas en dos unidades idénticas en un dímero, a la otra. Cada subunidad tiene la facultad de catalizar la siguiente reacción:



El holoenzima tiene un peso molecular de 500 000 daltons y es dependiente de la presencia de cationes divalentes como Mg^{2+} o Mn^{2+} .

En lo que respecta a la regulación de la actividad catalítica de la glutamin-sintetasa, se han descrito tres mecanismos diferentes de control (2): a) inhibición por retroalimentación ejercida por algunos productos terminales del metabolismo de la glutamina, b) influencia de la disponibilidad ambiental del tipo de cationes divalentes, y c) un sistema de suavisé bilógico (22) integrado por algunos enzimas controlados por metabolitos y pequeñas proteínas reguladoras, que por medio de interacciones alóstericas y con sustratos modulan la amentación y desamentación de la glutamin-sintetasa y determinan su potencial catalítico. Este sistema consta de dos tipos enzimáticos estrechamente ligados. En un ciclo, las subunidades de la glutamin-sintetasa se van continuamente adeniladas y desadeniladas por el enzima adenil-transferasa (ATase). La adenilación de algunas subunidades de la glutamin-sintetasa produce la inactivación catalítica de dicha subunidad, de modo que la actividad global de la proteína se ve inversamente proporcional a la fracción media de subunidades que están adeniladas (22). En el otro ciclo, la proteína reguladora P₁ es sintetizada y desadenilada continuamente, quita por el mismo enzima, la uridil-transferasa (UTase). Ambos ciclos, uridilación y adenilación, están ligados a una única forma no uridilada de la proteína reguladora (P₁) que ayuda a promover la adenilación de la glutamin-sintetasa (22). Así, cuando la ATase, mientras que la configuración uridilada de la proteína P₁ (P₁U) estimula la actividad desadeniladora de la ATase. Además de lo antes citado, que el 2-oxoglutarato y la glutamina, en oposición uno a la otra, son los metabolitos más importantes que producen efectos reguladores sobre las reacciones de adenilación y desadenilación de la glutamin-sintetasa (22). Así, cuando *Escherichia coli* crece en un medio con exceso de amonio, los niveles intracelulares de glutamina se incrementan y se activa la adenilación de su glutamato, a estas, simultáneamente, aunque en forma indirecta, se inhibe la desadenilación, en virtud de bloquearse la uridilación de la proteína P₁. Cuando el amonio se reduce su concentración limitante, el incremento de los niveles intracelulares del 2-oxoglutarato activa la desadenilación e inhibe la reacción adeniladora (2). En conclusión, se ha observado (20) que el estado medio de adenilación de la glutamin-sintetasa se correlaciona positivamente con las concentraciones intracelulares y la relación 2-oxoglutarato:intr glutamina.

REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE LA GLUTAMIN-SINTETASA Y OTROS SISTEMAS Ntr

La disponibilidad de nitrógeno en el medio no sólo regula la actividad catalítica de la glutamin-sintetasa, sino también la concentración intracelular de la proteína (27). En condiciones limitantes de nitrógeno, la actividad enzimática es de cinco a diez veces mayor que en condiciones de exceso de nitrógeno. En *E. coli*, la actividad enzimática se ve afectada por el Metabolito γ -Tubulina (28) que es un Donador de grupos Metilados y se encuentra asociada a una concentración por encima de los niveles de actividad particular de la glutamin-sintetasa, y los niveles de RNA mensajero de *glnA*, el gen estructural de la glutamin-sintetasa (6). Así, resulta evidente que el control de la síntesis del enzima se hace, en primer término, a nivel de transcripción.

La biosíntesis de la glutamin-sintetasa está sujeta a una regulación estricta a partir del gen estructural y de las subunidades oligoméricas. Este gen, llamado *glnA*, está localizado en el minuto 60 del mapa de ligamiento de *E. coli*.

Este sistema regula y se manifiesta como una actividad enzimática de glutamin-sintetasa alta en condiciones de limitación de nitrógeno en el medio y como una actividad enzimática de glutamin-sintetasa baja en condiciones de exceso de nitrógeno en el medio (29). Para que el control genético de la síntesis de *glnA* se efectúe se requiere la participación de varios genes reguladores. La investigación actual sobre este sistema trata de llegar a comprender con exactitud cuál es el papel que desempeña cada uno de estos genes reguladores y sus productos en el control de la expresión de *glnA*. Un hecho importante es que el transporte (30, 31) y la utilización de fuentes alternativas de nitrógeno tales como aminoácidos (prolina, arginina, ornitina, etc) dependen también del mismo sistema genético que regula la expresión de *glnA* (13, 24). Es decir, dicho sistema genético no es específico para regular la biosíntesis de glutamin-sintetasa, sino también controla la asimilación de las otras compuestas nitrogenadas. Dicha capacidad de utilizar fuentes alternativas de nitrógeno se conoce como el sistema Ntr. El complejo regulador Ntr también incluye a la proteína del sistema que transporta el ion NH₄ en *E. coli* (32) y el sistema que sintetiza el complejo de nitrógenoasa (*nif* genes) (33) y el nitrógeno fijador (34).

La hipótesis de una regulación autógena por glutamin-sintetasa en su propia biosíntesis, así como en la expresión de otros genes, se puede ahora considerar como Ntr, ha sido descartada (35). La proposición concreta consistía en que para la expresión de estos sistemas existía requerimiento por niveles elevados de glutamin-sintetasa, en adelante, como activador de la transcripción y bajo niveles de glutamin-sintetasa adecuada como represor. Pruebas definitivas en contra de dicha proposición emergieron al hacerse evidente la existencia de genes reguladores asociadamente con la expresión de *glnA* y de otros sistemas Ntr.

Actualmente se sabe que existen el menos dos genes que son necesarios en la regulación de la glutamin-sintetasa y para que una cepa sea Ntr⁺. Estos genes son el gen *glnE* (minuto 60) y el gen *glnC*, que se encuentra en el minuto 65 del mapa de ligamiento. El gen *glnE*, como adelante, forma parte de un operón en el que, aparte *glnA* y *glnC*, se encuentra otro gen regulador, *glnD*, con

el sentido de transcripción *glnA* → *glnE* → *glnC* (operón: *glnAGC*) (16).

La evidencia de que *glnE* es necesario para la activación procede de cepas con mutaciones en el gen *glnE* (7); estas cepas son incapaces de producir glutamin-sintetasa, ya que la expresión a partir de *glnA* es frecuentemente completamente reprimida. En los tipos estas cepas son incapaces de glutamina (*Gln*⁻) y Ntr⁻.

Los estudios de reversión (*Gln*⁺ de cepas *glnE*⁻) es bastante elevada (del orden de 10⁻⁶ a 10⁻⁷), pero las reversiones se ha encontrado que poseen una segunda mutación asociada en el gen *glnC* (16, 17). Esta segunda mutación permite al ser lo sistema de glutamin-sintetasa, pero el enzima no recupera niveles normales de regulación normal, sino que ahora la expresión de *glnE* es muy baja y no responde a condiciones de exceso de limitación de nitrógeno. Estas reversiones constitutivas bajas de glutamin-sintetasa eliminan la auxotrofia por glutamina, aun cuando las mutantes *GlnE*⁺ continúan siendo Ntr⁻. Curiosamente, al reversionar un gen *glnE* funcional, conservando la mutación asociada en *glnC*, se sigue manteniendo el fenotipo de constitutividad baja de glutamin-sintetasa. Además, mutaciones por inserción de un transposón en *glnE* modifican el mismo fenotipo, independientemente de la presencia o ausencia de un gen *glnE* funcional (31). Si sea la célula no puede activar o regular normalmente la síntesis de glutamin-sintetasa ni activar los sistemas Ntr para la utilización de fuentes alternativas de nitrógeno sin carecer del producto de *glnE* o del producto de *glnC*, este mismo suceso si la célula carece de ambos productos, lo cual significa que ambos son requeridos para activar *glnA*. Sin embargo, si la célula carece solamente del producto de *glnE*, no existe expresión ni siquiera basal, a partir de *glnA*. Esta reprimición aparente es eliminada cuando tampoco existe el producto de *glnC* funcional, lo cual ha sido interpretado como evidencia de que el producto de *glnE* tiene un papel dual en la regulación, en ausencia del producto de *glnC*, el producto de *glnE* funciona como un represor, impidiendo la expresión de *glnA*. Si no existiera un producto de *glnE* que reprime únicamente a los mutaciones en *glnC* también, permitiría activar *glnA*, lo que parece indicar que el producto de *glnE*, también, forma parte de un complejo de la expresión de *glnA*, pero únicamente si está el producto de *glnC* (37).

Como se mencionó anteriormente, existe otro gen regulador, *glnD*, que se encuentra en el minuto 65 del mapa del operón *glnAGC* (14). Las mutaciones de dicho gen pueden producir fenotipos diferentes, según el grado de polaridad que se produce sobre la expresión de *glnC*. Si la mutación es polar sobre *glnC*, se producirá una glutamin-sintetasa constitutiva baja y un fenotipo Ntr⁻, es decir, que si la mutación no es polar, se producirá un fenotipo constitutivo por glutamin-sintetasa, es decir, *glnA* se expresará a niveles elevados, aun en presencia de un exceso de nitrógeno en el medio. Este ha sido interpretado como evidencia de que el producto de *glnD* es importante para poder reprimir la expresión de *glnA*. Actualmente existe controversia acerca de la manera por la cual el producto de *glnD* interfiere con la expresión de *glnA*. Una posibilidad es que el producto de *glnD* funcione como un represor. Por lo tanto, no solamente el producto de *glnE* reprimiría, como se mencionó anteriormente, sino también el producto de *glnD*, o ambos lo harían formando un complejo represor. Otra posibilidad es que el producto de *glnD*, no sea un

verdadero represor o parte de un represor, sino que funciona como un activador, esto lo haría implicando la interacción entre los productos de *glfF* y *glfG* que forman el activador, y quedaría el producto de *glfG* solo, el cual funcionaría como un represor.

Para tratar de definir si alguna de estas dos posibilidades es correcta, resulta conveniente analizar los fenotipos que se pueden producir por mutaciones puntuales dentro de los genes *glfI* y *glfII*. Ha sido posible aislar mutaciones en el gen *glfC* (*glfC*⁰) que provocan un fenotipo *Glif*⁺, ya que son incapaces de sintetizar glutamín-sintetasa (12, 27), esto aparentemente se debe a que el producto de *glfC* aún presenta función únicamente como un represor, a pesar de que exista un gen *glfI* funcional, es decir, el producto de *glfC* de estas cepas mutantes no puede funcionar en la activación de *glfA*, como ocurre en una cepa silvestre. Hasta la fecha no se han comunicado mutaciones en el gen *glfI*, que produzcan este mismo fenotipo, lo cual parece indicar que el verdadero represor del sistema no es el producto de *glfI*, sino el producto de *glfC*. Sin embargo, algunas mutaciones en *glfI* no parecen sobre *glfC* son capaces de suprimir el fenotipo *Glif*⁺ provocado por una mutación en *glfC*, a pesar de la presencia del producto de *glfC* (3). Esta observación no se podría explicar si el producto de *glfI*, fuera simplemente un activador que impide la interacción de los productos de *glfI* y *glfC*, más bien parece indicar que el producto de *glfI*, aun no siendo el verdadero represor, es capaz de interactuar con el producto de *glfC* para que este pueda funcionar como represor y no como activador. Probablemente, las mutaciones en *glfC* expuestas antes (*glfC*⁰), que provocan el fenotipo *Glif*⁺, determinan que el producto de *glfI*, no sea ya necesario para mantener al producto de *glfC* en su forma represora. La alternativa de que el producto de *glfC* solo no puede activar ni reprimir, no que requiere interactuar con el producto de *glfF* para funcionar como un activador y con el producto de *glfI*, para funcionar como represor, aun continua vigente.

Anteriormente se mencionó que cepas con mutaciones en los genes *glfC* y *glfF* provocan el fenotipo *Nit*⁺, por lo que aparentemente los productos de dichos genes son necesarios no solamente para la regulación de la expresión de *glfA*, sino también para poder activar los sistemas *Nit* encargados de la utilización de fuentes alternativas de nitrógeno. Cabe mencionar que muchas mutaciones en *glfA* también producen un fenotipo *Nit*⁺, pero este podría explicarse sobre la base de la polaridad que dichas mutaciones ejercen sobre el gen *glfC* (1, 3).

Aunque actúan de manera opuesta, existe duda acerca de la necesidad de los productos de *glfF* y *glfG* para activar los sistemas *Nit*, existen datos contradictorios acerca de su papel que puede demostrar el producto de *glfI*. Existen datos que indican la existencia de mutaciones no polares sobre *glfG* que provocan el fenotipo *Nit*⁺ y son incapaces de suprimir mutaciones en *glfF*, estas mutaciones se han encontrado aisladas en una región específica del gen (12). Esto parece sugerir que una parte de la molécula codificada por *glfG* no está involucrada en la activación, sino que desempeña el control de los sistemas *Nit*. Otros autores han encontrado que el producto de *glfI*, es dispensable para la activación de los sistemas *Nit*, y para cualquier activación de otro tipo, basta con que existan los productos de *glfF* y *glfC* (2).

Finalmente, cabe mencionar que Masasani ha postulado interferencia del producto del gen *glfII*, la proteína

Pil, en la activación del operón *glfAIG* y de otros sistemas *Nit* por interacción, supuestamente, con el producto del gen *glfI*.

ORGANIZACION MOLECULAR DE LA REGION *glfA* DE *E. COLI*

Otro de los aspectos que se han seguido para tratar de entender la regulación de la expresión de *glfA*, y de los genes relacionados ha sido el estudio de la organización de estos utilizando técnicas de clonación.

A partir de la clonación de la región *glfA*, la cual incluye los genes *glfA*, *glfI* y *glfC* en *E. coli* (1, 4), se ha llegado a la conclusión de que estos se encuentran organizados en un operón (5, 6, 7). Sin embargo, su organización no corresponde a la de un operón clásico, ya que existen pruebas que demuestran la existencia de, al menos, un promotor diferente que se localiza entre los genes *glfA* y *glfI* (28). Experimentos realizados en nuestro laboratorio han demostrado la existencia de una región de DNA entre *glfI* y *glfC*, que es capaz de unirse a RNAspolimerasa de manera específica (3). Lo cual sugiere la presencia de un posible promotor también para *glfC*. Estos datos se ven apoyados por el hecho de que un plasmidio que contiene solo *glfG* y el extremo 3' de *glfI*, es capaz de complementar mutaciones cromosómicas en *glfC* tanto para la regulación normal de glutamín-sintetasa como para el fenotipo *Nit*⁺. La posibilidad de que en este caso *glfI* se transcriba de un promotor del plasmido en el que fue insertado ha sido descartada. Por otro lado, la secuencia reguladora de las regiones de unión entre el vehículo molecular y el fragmento clonado no muestra ninguna región que presente homología con un promotor, el cual se hubiera podido formar durante la construcción del plasmido en cuestión.

Aun cuando cepas con mutaciones polares en *glfA* o *glfI*, no muestran expresión de *glfC* independientemente del promotor de *glfA* o del de *glfI* (9, 12, 17, 18, Urbina, J. C., y Bastarachea, F., datos no publicados), es posible que en las condiciones utilizadas el promotor de *glfC* funcione a niveles muy bajos.

Se ha propuesto que la expresión diferencial de los genes que constituyen el operón *glfAIG* ocurre como si fuera en condiciones de limitación de nitrógeno, el producto de *glfC* y el *glfI* activan el inicio de la transcripción a partir del promotor del *glfA* sintetizándose un RNAm. troncador. En estas condiciones, el promotor de *glfI*, se encuentra sujeto a represión por el mismo producto de *glfI* en tanto que en condiciones de exceso de nitrógeno, tanto *glfI*, como *glfC* se transcriben a partir del promotor de *glfI*. Estas condiciones dan lugar a una represión por el producto de *glfC* sobre el promotor de *glfA* y a un efecto de autoactivación a través de los productos de *glfI* y *glfII* (proteína *Pil*). De esta manera, en condiciones de activación existen niveles altos de glutamín-sintetasa y del producto de *glfC*, en tanto que en condiciones de represión tanto la glutamín-sintetasa como el producto de *glfC* se sintetizan a niveles bajos, ya que se transcribe el producto de *glfC* sobre el promotor de *glfA* y a un efecto de autoactivación a través de los productos de *glfI* (28). Aun cuando algunos datos apoyan el modelo de regulación antes descrito, quedan algunos puntos que no han sido bien definidos, como sería la manera como el producto de *glfI* participa en la regulación de la expresión de *glfA* en condiciones de exceso de nitrógeno, así como la función de este producto en la ex-

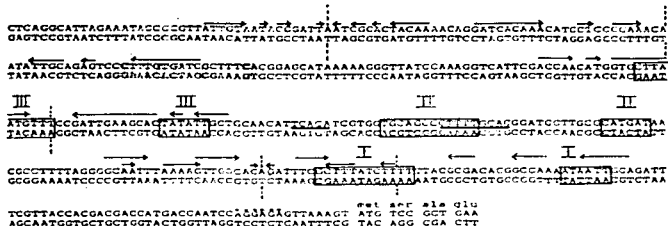


Fig. 1. Secuencia nucleotídica de la región de control del gen estructural para glutamín-sintetasa. En esta figura se muestran algunas características relevantes de esta región reguladora. Las secuencias encerradas en rectángulos muestran las regiones -35 y -10 de los posibles promotores marcados como I, II y III. Las líneas horizontales señalan el probable sitio de unión a ribonucleos. anterior al inicio de *glnA*; las flechas indican las regiones palindrómicas con su centro de simetría respectivo marcado por líneas puntuadas y vertical; la secuencia subrayada con líneas gruesas muestra las secuencias que se conservan en los diferentes promotores sujetos a control por nitrogenoso, y la región sombreada señala el probable sitio de unión al complejo proteína CRP-CAMP.

presión de otros genes involucrados en el metabolismo de nitrógeno de la bacteria. Por otro lado, existen otras acciones que sugieren la existencia de mecanismos adicionales que regulan los niveles de tal producto.

Cuando se muestran los datos de ensayos de la potencia de promotores de plásmidos que controlan los genes *glnA*, *glnB*, y *glnC*, se observa que la cantidad del producto de *glnB* (36 K) siempre es menor a la cantidad del producto de *glnC* (57 K). Esto se ha explicado por los resultados obtenidos de un análisis de las proteínas sintetizadas en una cepa que contiene un plásmido en donde tanto *glnB* como *glnC* se encuentran bajo el control de un promotor muy eficiente, como es *P_{lac}*, el promotor derecho del fago lambda. Se ha podido observar que en ciertas condiciones ocurre una subproducción del producto de *glnC*, lo cual no sucede con el producto de *glnB*; estos datos sugieren que el producto de *glnB* es una proteína sumamente inestable e sujeta a degradación específica, o bien, que existe algún mecanismo que no permite una traducción eficiente de su RNA mensajero.

El análisis de la secuencia de la región de control de *glnA* muestra características que controlan, asimismo, y aún sobre los mecanismos involucrados en la regulación de este operón. Algunas de las características son las siguientes (Fig. 1a): Tres regiones que presentan homología a *cis*; la secuencia consenso para un promotor funcional, cada uno de los cuales podría responder a diferentes condiciones metabólicas. b) Una región que presenta homología con la secuencia consenso de unión al complejo CRP-CAMP, y que se localiza aproximadamente a 50 pares de bases hacia arriba del promotor más lejano al inicio de *glnA*. Este sitio es congruente con la comunicación de Preiner y cols. (10) en donde sus resultados sugieren que tanto la glutamín-sintetasa como la glutamato desidrogenasa se encuentran sometidas a control positivo por AMP-ciclizo. c) Tres regiones palin-

dromicas de las cuales una comprende el posible sitio de unión a CRP; otra se encuentra superpuesta al promotor más lejano al inicio de *glnA* y la tercera es superpuesta al promotor más cercano al inicio de este gen. Cuando efectuamos la funcionalidad de estas regiones, es probable que, de acuerdo con su posición, correspondan a sitios de unión para algunas proteínas reguladoras. Cuando esta región de control se comparo con los regiones reguladoras de otros genes involucrados en el metabolismo de nitrógeno, como *argT*, *dhuaA*, *nhl*, y el mismo *glnA* de *Salmonella typhimurium*, se encontró una secuencia que se conserva en todas ellas (10). Es posible que esta secuencia este relacionada con la región de reconocimiento del producto de *glnG* y/o *glnB*, ya que ambas se requieren para iniciar la transcripción de estos genes (Fig. 2). Resulta evidente que para demostrar la funcionalidad de estas regiones se hace necesario el aislamiento de mutaciones que produzcan una alteración de la regulación de la expresión de *glnA*.

La mutagenesis in vivo usando mutagenos que provocan mutaciones puntuales a partir de cepas con fondos genéticos adecuados y utilizando los métodos de selección adecuados, resulta una herramienta muy útil para estos fines. Así, a partir de una cepa con una mutación por inserción del trasposón Tn5 en *glnG* (MX002) se aislaron cepas con actividad de glutamín-sintetasa se encontró mutaciones alterada (13). La caracterización genética y fisiológica de una de estas mutantes llevó a la conclusión de que la secuencia modificada se encontraba en la región reguladora de *glnA*. Las actividades de glutamín-sintetasa obtenidas en diferentes condiciones de crecimiento de cepas que contienen el alelo mutado *gln-79* apoyan hipótesis respecto a la existencia de un promotor para *glnA*, ya que parece que la mutación sólo afecta uno de ellos (el que podría usarse en condiciones de exceso de nitrógeno), en tanto que el otro se mantiene inalterado (uno de estos parece funcional).

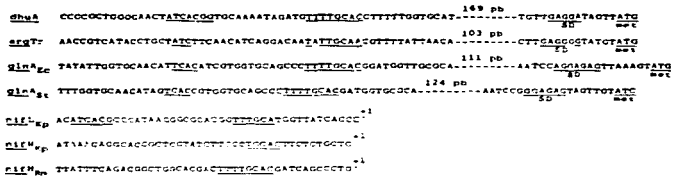


Fig. 2. Comparación de las regiones control de algunos genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno. Las secuencias nucleotídicas mostradas aquí corresponden a las regiones control de diversos genes que están involucrados en el metabolismo nitrogenado de *E. coli*. **glnA**, **glnA₂**, **glnA₃**, **glnE**, **glnH** y **glnJ**. Las secuencias que presentan cierta homología entre sí son aquellas que se acumulan sobre regiones con la misma función en los mapas publicados en la literatura en un parámetro de base más que los otros marcados. El símbolo Δ indica un sitio de unión a ribosomas más indicado como SD (Shine-Dalgarno). El código de iniciación ATC, correspondiente a la primera metionina de la proteína. El sitio de iniciación de transcripción se indica con Δ y el código Δ indica el sitio que se conoce Kp. **Kp**: *Klebsiella pneumoniae*. **Rm**: *Rhodospirillum rubrum*. **S**: *Salmonella typhimurium*. **E. coli**: *Escherichia coli*.

en condiciones de limitación de nitrógeno). Los resultados obtenidos sugieren que la mutación *gln-79* no sólo afecta uno de los promotores, sino que simultáneamente altera la respuesta represora (operador) que pudiera estar superpuesta al promotor afectado. Cabe mencionar que el método de selección para este mutante permite suponer que la alteración ocurrida en el promotor, ya que la cepa de donde se partió (MX1002) carece tanto de activador como de represor. El enfoque de obtener los mutantes delecidos a partir de una mutación en un sitio resulta más directo que en el caso de conocerse la secuencia nucleotídica de la región que hay que estudiar, ya que ofrece ciertas ventajas y permite seleccionar la región que debe mutagenizarse. En la actualidad estamos llevando a cabo experimentos de mutagénesis dirigida utilizando oligonucleótidos sintéticos con homología a las regiones mencionadas anteriormente.

Los datos aportados durante los últimos años demuestran que la expresión de *glnA* y los de los genes involucrados en el metabolismo nitrogenado bacteriano se encuentran sometidos a un control común, lo cual resulta lógico si se considera que los enzimas requeridos para la conversión de una fuente potencial de nitrógeno a aminoácidos podrán llevar a cabo su función si existe suficiente glutamín-sintetasa disponible para assimilar el amonio que aquellas proporcionen, sin embargo, aún se requiere mayor experimentación que permita definir con claridad tanto las funciones de cada uno de los reguladores como el patrón de expresión de cada uno de estos genes en diferentes condiciones de crecimiento.

Las designaciones genéticas *glnF*, *glnI* y *glnG* utilizadas en E. coli (12, 13, 15, 18) se han designado, respectivamente, *nraA*, *nraB* y *nraC* en *Salmonella* (14, 22).

BIBLIOGRAFÍA

1. Beckman, K., Chen, Y., y Magesani, B. (1981): Physical and genetic characterization of the *glnA/glnC* region of the *Escherichia coli* chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3745-3747.
 2. Beckman, K. C., Chen, Y., Ueno-Nishio, S., y Magesani, B.

(1983): The product of *glnI* is not essential for regulation of bacterial nitrogen assimilation. *J. Bacteriol.*, **154**, 516-519.
 3. Covarrubias, A. A., y Bacterucha, R. (1982): Nucleotide sequence of the *glnA* control region of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **190**, 371-374.
 4. Covarrubias, A. A., Canales-Paredes, R., Osorio, A., Bolívar, F., y Bacterucha, R. (1984): *glnA* hybrid plasmids containing *Escherichia coli* genes involved in the biosynthesis of glutamine and glutamate. *Environ. 3*, 150-164.
 5. Chen, Y., Beckman, A., y Magesani, B. (1982): Characterization of a *glnE* gene product of which is involved in the regulation of nitrogen utilization in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **150**, 214-220.
 6. Daniels, A. R., y Magesani, B. (1974): Identification of the structural gene for glutamine synthase in *Escherichia Coliformis*. *J. Bacteriol.*, **122**, 313-319.
 7. Garcia, E., Benoit, R., Pines, P., y Kustu, S. (1972): The synthesis of a newly identified gene, *glnF*, is required for production of glutamine synthase in *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1962-1964.
 8. Ginsburg, A., y Gosterman, E. R. (1973): Regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. En *Primeres y segundos Acetámidos*. Prentice-Hall, Nueva York.
 9. Guterman, S. R., Roberts, G., y Gosterman, E. R. (1972): Polarity in the *glnA* gene of *Escherichia coli*. *Phylogenetic relationships*. *J. Bacteriol.*, **130**, 1314-1321.
 10. Kustu, S., G. Nickerson, G. L., S. P. Farmer, B., y Ames, G. F. (1974): Nitrogen control in *Salmonella typhimurium*: coregulation of synthesis of glutamine synthase and amino acid transport systems. *J. Bacteriol.*, **119**, 218-224.
 11. Kustu, S. G., Barton, D., Green, E., McCarter, L., y McFarland, N. (1979): Nitrogen control in *Salmonella*: regulation by the *glnA* and *glnF* gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 458-462.
 12. McNell, T., Roberts, G. P., y Gosterman, E. R. (1962): The products of *glnA* and *glnE* are differential regulatory proteins. *Mol. Gen. Genet.*, **100**, 235-252.
 13. Magesani, B. (1962): Genetic control of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Genet.*, **10**, 125-168.
 14. McFarland, N., McCarter, L., Arts, S., y Kustu, S. (1981): Nitrogen regulatory locus regulation in *Escherichia coli*: independent control of glutamine and *nraC* identification of a *glnE* gene product. *Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2135-2139.
 15. Osorio, A., V. Servín-González, L., Rocha, M., Covarrubias, A. A., y Bacterucha, R. (in press): glutamine synthetase constitutive mutants of *Escherichia coli*. Independent control by the *glnC* and *glnF* products. *Mol. Gen. Genet.*, in press.
 16. Orr, D. W., Sundaresan, V., Rothenstein, D. M., Brown, S. E., y Ausubel, F. M. (1982): Promoters regulated by the *glnG* (*nraC*)

- and mRNA gene products share a heptamer consensus sequence in the -10 region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 60, 3324-3328.
17. Pehel, G., y Tyler, B. (1973) A new *glnA*-linked regulatory gene for glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 4344-4348.
 18. Pehel, G., Reihardt, D. M., y Magasanik, B. (1982) Complex *glnA* promoter structure of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 155, 202-213.
 19. Frautner, S., Miller, K. E., y Valentine, R. C. (1972) Adenosine 3'-5' cyclic monophosphate control of the enzymes of glutamine metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 2621-2625.
 20. Senig, J. J. (1973) Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*: studies with continuous culture technique. *J. Bacteriol.*, 125, 407-416.
 21. Bernikowicz, E., y Hatzizacharias, F. Nitrogen regulation of synthesis of the high affinity methylammonium transport system of *Escherichia coli*. *C. R. Microbiol., en curso de publicacion*.
 22. Stadiman, E. R., Mura, U., Chiu, P. H., y Klee, S. G. (1982) The interconvertible enzyme *Lasaid* that regulates glutamine synthetase activity. In Mura, U., y Palacios, R. (eds) *Glutamine metabolism, biosynthesis and regulation*, 41-56. Academic Press, Nueva York.
 23. Sundaresan, V., Ose, D. W., y Asatani, F. M. (1982) Activation of *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti* nitrogenase promoters by *gln* [nif] regulatory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 4030-4034.
 24. Tyler, B. (1978) Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Ann. Rev. Biochem.*, 47, 1127-1162.
 25. Iino-Nishio, S., Beckman, K. L., y Magasanik, B. (1983) Regulation of the *gln*-operator-promoter of the complex *glnA*LC operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 153, 1247-1251.
 26. Weglanski, P., y Tyler, B. (1972) Regulation of *glnA* messenger ribonucleic acid synthesis in *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.*, 124, 880-887.
 27. Wei, C. R., y Kustu, S. (1983) Glutamine auxotrophy with mutations in a nitrogen regulatory gene, *nifC*, that is near *glnA*. *Mol. Gen. Genet.*, 182, 392-394.
 28. Woodfolk, C. A., Shapiro, H. M., y Stadiman, E. R. (1966) Regulation of glutamine synthetase. I. Purification, and properties of glutamine synthetase of *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 118, 177-192.

Actualmente tenemos una visión más completa del funcionamiento del sistema regulador Ntr, debido a varios estudios genéticos y moleculares.

Como se mencionó anteriormente, se había establecido, por medio de datos genéticos, la existencia de al menos dos promotores funcionales en el operón qlnA/G, uno al inicio de qlnA y otro al inicio de qlnI (Pahel et al., 1982), si bien la secuencia nucleotídica de la región de control de qlnA mostraba tres posibles secuencias promotoras al inicio del operón (Covarrubias y Bastarrachea, 1983). El primero de los promotores en ser identificado física y funcionalmente corresponde al promotor localizado al inicio del gene qlnI, para el cual se había postulado una regulación negativa mediada por NR₁, el producto del gene qlnG (Pahel et al., 1982; Ueno-Nishio et al., 1983; Reitzer y Magasanik, 1983). Este promotor, conocido como qlnI_P, fue inicialmente localizado en un fragmento de 270 pares de bases, el cual contenía también la región operadora (Ueno-Nishio et al., 1983). Este fragmento fue posteriormente secuenciado, y el sitio preciso de inicio de la transcripción fue localizado, lo que permitió definir al promotor (Ueno-Nishio et al., 1984). El operador también pudo ser identificado, al observar que NR₁, el producto de qlnG previamente purificado (Reitzer y Magasanik, 1983), protegía de la acción de la DNasa I un fragmento que se sobreponía al promotor; además, una mutación puntual que provocaba insensibilidad a la represión ejercida por NR₁ se localizaba precisamente en esta secuencia. Estos autores también observaron en la secuencia intercistronica qlnA-qlnI un terminador rho-independiente, localizado posterior a qlnA, pero anterior a qlnI_P. La secuencia fue comparada con la de Salmonella typhimurium, encontrándose los mismos elementos estructurales. Estos resultados fueron posteriormente confirmados por Rocha et al. (1985); también ha sido descrita la secuencia de esta región intercistronica

en Klebsiella pneumoniae (MacFarlane y Merrick, 1985), la cual conserva los mismos elementos estructurales.

Si bien la secuencia de nucleótidos reportada por Covarrubias y Bastarrachea (1983) mostraba tres posibles regiones promotoras para glnA, sabemos actualmente que ninguno de estos tres posibles promotores es funcional. Con base en una secuencia corregida y en experimentos de mapeo por nucleasa S1, Reitzer y Magasanik (1985) demostraron que el gene glnA se transcribe a partir de dos promotores funcionales. El promotor más alejado (glnAp1) es reprimido por NR₂, requiere de activación por el complejo CAP-cAMP, produciendo un transcrito con un líder de 187 nucleótidos, y no es afectado por la carencia del producto del gene glnF. El promotor cercano glnAp2 requiere, por el contrario, del producto de glnF y de NR₂ para ser funcional y produce un transcrito menor, con un líder de 73 nucleótidos. El promotor glnAp1 presenta una homología del 50%, tanto en la región de -35 como en la de -10, con la secuencia consenso, y se encuentra un sitio de unión al complejo CAP-cAMP aproximadamente 30 pares de bases hacia arriba del promotor; además, sobrepuestas al promotor glnAp1 existen dos secuencias con homología a la región de DNA que es protegida de la digestión con DNasa I por NR₂; en glnLp (Ueno-Nishio et al., 1984), lo que explica la represión que sobre este promotor ejerce NR₂. El promotor glnAp2, por el contrario, no presenta ninguna secuencia parecida al consenso. Estos dos promotores se expresan de manera diferencial. En condiciones de exceso de carbono y limitación de nitrógeno, la transcripción del operón proviene de glnAp2, generándose concentraciones intracelulares de NR₂ suficientes para activar a los sistemas Ntr y para reprimir tanto a glnAp1 como a glnLp. En condiciones de exceso de carbono y nitrógeno se observa menor transcripción a partir de glnAp2 y una expresión muy débil a partir de glnAp1. En condiciones de

limitación de carbono y exceso de nitrógeno se expresa solamente glnAp1, así como en cepas que carecen de NR₂ y/o del producto de glnE; esta expresión es completamente dependiente de la presencia del complejo CAP-CAMP.

La funcionalidad del promotor glnAp1 también ha sido demostrada genéticamente mediante mutaciones que lo afectan. Osorio et al. (1984, apéndice 1) habían descrito previamente una mutación cis-dominante que aumentaba la expresión de glnA en condiciones de exceso de carbono y nitrógeno, pero que conservaba una regulación normal. En ausencia de NR₂ esta mutación permitía niveles elevados de expresión de glnA, aún en condiciones de exceso de nitrógeno; además era capaz de suprimir la auxotrofia por glutamina provocada por una inserción del transposón Tn5 en glnE. Estos datos genéticos indicaban que la mutación probablemente modificaba un promotor ya existente, haciéndolo más eficiente. León et al. (1985) confirmaron dicho planteamiento al mostrar que la mutación se debe al cambio de una sola base en la región de -10 de glnAp1, obteniéndose una mayor homología con el consenso y generando un promotor 10 veces más fuerte. Mutaciones similares han sido descritas por McCarter et al. (1984).

El estudio del mecanismo de activación dependiente de NR₂ y del producto de glnE ha evidenciado algunas de las características más interesantes de la regulación de la expresión del operón glnALG y de los sistemas Ntr. Hirschman et al. (1985) obtuvieron evidencias de que el producto del gene glnE es un factor σ de la RNA polimerasa, el cual confiere a ésta una especificidad diferente. Esto le permite el reconocimiento de los promotores regulados por el sistema Ntr, tales como glnAp2, en condiciones de limitación de nitrógeno; éstos, como se mencionó anteriormente, carecen de homología con la secuencia consenso de los promotores reconocidos por la RNA polimerasa asociada a la subunidad σ .

normal (σ^{70}). Hunt y Magasanik (1985) también han demostrado que el producto de qlnE es una subunidad σ (σ^{40}), y que en un DNA superenrollado la RNA polimerasa asociada a σ^{40} es capaz de iniciar la transcripción en qlnAp2, aún en ausencia de NR_{11} . En un DNA lineal, sin embargo, se requiere de NR_{11} , así como del producto de un alelo mutante de qlnL (ver más adelante). Merrick y Gibbins (1985) determinaron la secuencia nucleotídica del gene qlnE de K. pneumoniae, e identificaron dos secuencias conservadas que están presentes en otros factores σ de E. coli y Bacillus subtilis que, aparentemente, constituyen dominios de unión a DNA. Los datos anteriores no explican completamente qué determina que en condiciones de limitación de nitrógeno se utilice preferencialmente qlnAp2. Podría pensarse que solo en estas condiciones se encuentra presente σ^{40} ; esta posibilidad queda descartada, puesto que la expresión de qlnE es constitutiva (Castaño y Bastarrachea, 1984). Por lo tanto, debe haber otro factor que determine que, en condiciones de limitación de nitrógeno, se utilice preferencialmente el promotor activado por σ^{40} .

Como se mencionó anteriormente, Hunt y Magasanik (1985) observaron que la transcripción in vitro de qlnA a partir de qlnAp2 no solamente requería de σ^{40} y NR_{11} , sino también del producto de qlnL (NR_{11}) proveniente de una cepa con un alelo mutante particular (qlnL2302). Este alelo provoca un fenotipo de constitutividad alta; es decir, qlnAp2 permanece activado in vivo aún en condiciones de exceso de nitrógeno. Posteriormente, Ninfa y Magasanik (1986) han demostrado que NR_{11} es capaz de catalizar la transferencia del grupo P-fosfato del ATP a NR_{11} . Esta fosforilación de NR_{11} le proporciona la capacidad de activar la transcripción a partir de qlnAp2. El mismo NR_{11} cataliza la remoción del grupo fosfato de NR_{11} , con lo que se pierde la capacidad de éste de activar la transcripción a partir de qlnAp2; para esto se

requiere de P_{11} , el producto del gen qlnB. De esta manera, NR_2 parece ser interconvertido por NR_1 entre una forma activa (fosforilada) y una inactiva (no fosforilada). La interconversión está determinada por la disponibilidad de nitrógeno; esta información fisiológica la recibe NR_1 de los productos de qlnD y qlnB a través de la proteína P_{11} , lo cual es apoyado por datos genéticos (Bueno *et al.*, 1985) y moleculares (Reitzer y Magasanik, 1985).

La activación de la expresión del operón qlnALG a partir de qlnAp2 muestra otro elemento interesante. El sitio de unión de NR_2 que funciona como operador para la represión de qlnAp1 es el mismo que funciona como sitio para la activación de qlnAp2. Este sitio se encuentra sobrespuesto a qlnAp1, pero bastante alejado (aprox. 100 pares de bases hacia arriba) de qlnAp2. Este sitio puede alejarse varios cientos de pares de bases hacia arriba y sigue siendo funcional, independientemente de su orientación (Reitzer y Magasanik, 1986). Por lo tanto parece funcionar de manera similar a los enhancers de organismos eucariotes. Un arreglo parecido se ha encontrado en la región regulatoria dhvA, responsable de la activación del operón hisJOMP (transporte de histidina) de S. typhimurium (Ames y Nikaido, 1985) y en las regiones regulatorias de algunos genes nif de K. pneumoniae, Rhizobium y Azotobacter (Buck *et al.*, 1986).

Las enzimas responsables de la asimilación de NH_3 han recibido mucha atención, ya que constituyen el primer paso en el metabolismo de este compuesto. Por el contrario, pocas veces se tiene en cuenta, o se hace énfasis suficiente, en un paso esencial de dicha asimilación: el transporte de NH_3 a través de la membrana citoplásmica. La existencia de sistemas de transporte de amonio ha sido ya demostrada en muchos microorganismos, tanto eucariotes (Brown, 1980; Kleiner, 1981) como procariotes (Kleiner, 1981; Kleiner, 1983). El rezago en el reconocimiento y en el estudio de los sistemas

de transporte de NH_3 , en comparación con las enzimas de asimilación, se debe en buena medida a las características fisicoquímicas de dicha molécula. El NH_3 es una base débil, capaz de protonarse en solución acuosa para dar lugar al ion NH_4^+ :



Debido a su neutralidad y su pequeño tamaño, el NH_3 es capaz de atravesar libremente las membranas biológicas por difusión inespecífica. Asumiendo que una célula careciera de cualquier sistema específico de transporte de NH_3 , las concentraciones interna y externa quedarían determinadas por la diferencia en la concentración de iones hidronio a ambos lados de la membrana (ΔpH).

$$K = \frac{[\text{NH}_3]_i [\text{H}^+]_i}{[\text{NH}_4^+]_i} = \frac{[\text{NH}_3]_e [\text{H}^+]_e}{[\text{NH}_4^+]_e}$$

Como el NH_3 se equilibra entre los compartimentos interno y externo, o sea

$$[\text{NH}_3]_i = [\text{NH}_3]_e$$

se desprende que:

$$K = \frac{[\text{H}^+]_i}{[\text{NH}_4^+]_i} = \frac{[\text{H}^+]_e}{[\text{NH}_4^+]_e}$$

Así, una diferencia de pH a ambos lados de la membrana daría lugar a una mayor acumulación de NH_4^+ en el lado más ácido. De hecho, estas propiedades han sido utilizadas para determinar el ΔpH estudiando la distribución de un análogo del amonio con propiedades fisicoquímicas muy similares, el [^{14}C] metilamonio.

Debido a esta permeabilidad relativamente alta que presentan las membranas biológicas hacia el NH_3 , durante mucho tiempo se pensó que era innecesaria la existencia de sistemas de transporte específicos para el NH_3 . Sin duda sería un gasto inútil para las células el transportar NH_3 a expensas de energía metabólica si este compuesto siempre fuera abundante en el medio extracelular, de manera que se

podiera sostener un buen crecimiento a expensas de aquella proporción que atravesara la membrana como NH_3 . Si este fuera el caso, sería muy difícil el crecimiento celular en condiciones de limitación de amonio en el medio. Por el contrario, se ha observado que muchas especies de bacterias son capaces de crecer en presencia de concentraciones extracelulares bajas de NH_3 . En dichas condiciones existe un gradiente de concentración de NH_3 , siendo esta de 10^7 a 10^8 veces mayor en el citoplasma que en el medio. Esta acumulación intracelular no puede ser explicada por la simple difusión de NH_3 .

La primera sugerencia de la existencia de un sistema de transporte de NH_3 en cualquier procarionte se debe a Strenkosky y DeCicco (1971), quienes obtuvieron cepas mutantes de Alcaligenes eutropha (previamente conocida como Hydrogenomonas eutropha), alteradas en la asimilación de NH_3 . Estas mutantes exhibían un crecimiento muy pobre al utilizarlo como fuente de nitrógeno y solamente aumentando la concentración de NH_3 o el pH del medio se recuperaba parcialmente el crecimiento; este efecto fue interpretado por los autores como evidencia de que las mutantes, a diferencia de la cepa silvestre, carecían de un acarreador de NH_3 . No es posible considerar el hallazgo de estos autores como totalmente válido, puesto que la única enzima involucrada en la asimilación de NH_3 investigada por ellos fue la glutamato deshidrogenasa, la cual se encontraba normal, por lo que es muy posible que sus mutantes en realidad carecieran de glutamina sintetasa o de glutamato sintasa.

El primer procarionte para el que se demostró la existencia de un sistema de transporte de amonio fue E. coli (Stevenson y Silver, 1977). A partir de entonces, han sido descritos sistemas de transporte de amonio en alrededor de 30 especies bacterianas. Los sistemas de transporte de amonio

son bastante ubicuos dentro de los procariotes, ya que su presencia no se encuentra restringida a ningún grupo taxonómico en particular, o a organismos que tengan una determinada fisiología. Organismos tan diversos como enterobacterias (Stevenson y Silver, 1977; Kleiner, 1982), espiriláceas (Hartmann y Kleiner, 1982), rhizobiáceas (Dilworth y Glenn, 1982; Wiegel y Kleiner, 1982; Gober y Kashket, 1983), pseudomonádáceas (Bellion y Wayland, 1982; Bellion et al., 1983), cianobacterias (Kashyap y Johar, 1984; Boussiba et al., 1984) y actinomicetos (Mazzucco y Benson, 1984) presentan sistemas de transporte de amonio.

El ensayo que más comúnmente ha sido utilizado para estudiar las características de los sistemas de transporte de amonio consiste en emplear un análogo, el metilamonio, marcado con ^{14}C . Inicialmente este compuesto parecía ser ideal para estos propósitos, puesto que la mayoría de los microorganismos no pueden utilizarlo como fuente de nitrógeno, por lo que durante mucho tiempo se asumió que no era metabolizable. El NH_3 , por el contrario, no se puede encontrar marcado con un isótopo radioactivo de fácil manejo en el laboratorio, y además es metabolizado muy rápidamente al entrar a las células. El hecho de que el NH_3 es el verdadero sustrato del sistema que se mide empleando metilamonio queda demostrado por la existencia de una fuerte inhibición competitiva del NH_3 sobre el transporte del metilamonio, siendo más afín el sistema de transporte por el NH_3 . De esta manera ha sido posible calcular la afinidad de los sistemas de transporte por su sustrato natural, el NH_3 , encontrándose que la K_m es de alrededor de 10^{-6} M, o sea que la afinidad por amonio es mayor aún a la de la glutamina sintetasa (Kleiner, 1985).

Existen algunos organismos que sí pueden utilizar al metilamonio como fuente de nitrógeno, y aún como fuente de

carbono y nitrógeno (Colby, 1979); obviamente en estos organismos no es posible asumir que el sistema de transporte de amonio sea el mismo que se mide empleando metilamonio. De hecho, han sido descritos sistemas de transporte específicos para metilamonio en varios organismos. Como ejemplo de lo anterior baste citar el caso de la cepa metilotrófica Pseudomonas MA; cuando este organismo crece en presencia de metilamonio como fuente de carbono y nitrógeno se induce un sistema de transporte de metilamonio específico, el cual es insensible a la presencia de amonio (Bellion et al., 1980); si esta misma cepa es crecida en presencia de metilamonio como fuente de nitrógeno únicamente, utilizando como fuente de carbono otro compuesto, se induce un sistema de transporte que sí es inhibido por amonio (Bellion y Wayland, 1982). Algo muy similar ocurre en otra cepa de Pseudomonas (AM1; Bellion et al., 1983) y en Paracoccus denitrificans, donde se sintetizan también dos acarreadores, uno bajo control de carbono y otro bajo control nitrogenado (Kleiner, 1985). Actualmente se sabe que el metilamonio también es metabolizado en aquellos organismos que no lo pueden utilizar como fuente de nitrógeno o como fuente de carbono y nitrógeno, lo cual constituye una desventaja desde el punto de vista del empleo del metilamonio para estudiar el transporte de amonio. Barnes et al. (1983) demostraron que este metabolismo consiste en la incorporación del metilamonio en un análogo de glutamina T-N-metilglutamina, conocido también como T-glutamilmetilamida o GMAD, reacción que es llevada a cabo por la glutamina sintetasa. No se encontró ni en Azotobacter vinelandii ni en E. coli otro compuesto al que se hubiera incorporado el metilamonio, por lo que parece no haber formación de T-N-metilglutamato, reacción que teóricamente podría llevar a cabo la glutamato deshidrogenasa. Estos autores también demostraron que la GMAD no es permeable, y no sufre ningún metabolismo posterior, por lo que es acumulada intracelularmente.

Es evidente, por lo mencionado en párrafos anteriores que el NH_3 puede ser transportado por muchos microorganismos en contra de un gradiente de concentración. Obviamente esto no puede ocurrir sin que las células gasten energía en el proceso. Varios investigadores han tratado de establecer cómo se acopla el transporte de NH_3 al metabolismo energético. Kleiner (1985) resume lo encontrado en estos trabajos, los cuales han llegado a la conclusión de que el transporte de NH_3 es guiado por uno de los componentes de la fuerza protón motriz: la diferencia de potencial ($\Delta\psi$) que existe entre ambos lados de la membrana citoplásmica, con el interior más negativo que el exterior. Esta conclusión se ha obtenido observando el efecto que producen inhibidores o desacopladores de la cadena respiratoria, así como inhibidores de la ATPasa membranar. En condiciones aeróbicas la diferencia de potencial es generada por la cadena respiratoria, por lo que los inhibidores o desacopladores de ésta eliminan el transporte. En condiciones anaeróbicas, en las que la diferencia de potencial es generada por la ATPasa membranar, inhibidores de la ATPasa eliminan el transporte, cosa que no ocurre en condiciones aeróbicas. Esta estricta dependencia de la diferencia de potencial implica que la molécula transportada está cargada positivamente, es decir que la especie molecular transportada es el NH_4^+ y no el NH_3 .

El sistema de transporte de NH_3 que mejor ha sido caracterizado desde el punto de vista de su mecanismo es el de *E. coli*. Jayakumar et al. (1985) realizaron este estudio utilizando un método de filtración rápida previamente desarrollado por ellos (Jayakumar y Barnes, 1983), el cual elimina la interferencia provocada por la formación de GMAD. Estos autores demostraron que se requiere de K^+ intracelular para que funcione el acarreador de NH_3 , por lo que aparentemente el mecanismo de transporte se da mediante

antiporte de NH_3 y K^+ .

La síntesis del sistema de transporte de NH_3 de *E. coli* se encuentra bajo control genético. A pesar de que Stevenson y Silver (1977) describieron que dicho sistema se expresaba de manera constitutiva, fue posible demostrar posteriormente que en realidad está controlado por el sistema regulador Ntr, como había sido sugerido anteriormente por Kleiner (1982), para el sistema de transporte de NH_3 de *Klebsiella pneumoniae*. Al igual que varios sistemas de transporte de aminoácidos, el transporte de NH_3 se induce solamente en condiciones de limitación de nitrógeno, y se reprime cuando hay un exceso de NH_3 en el medio, lo cual resulta aparentemente paradójico puesto que el NH_3 es el sustrato del sistema de transporte; dicha regulación genética depende de la presencia de los genes *qlnE*, *qlnL* y *qlnG* (Servin-González y Bastarrachea, 1984; apéndice 2). Posteriormente estos resultados han sido comprobados por otros autores (Jayakumar et al., 1986).

Los sistemas de transporte de NH_3 se encuentran regulados no solamente a nivel de síntesis, sino también a nivel de su actividad (Kleiner, 1985). Para el acarreador de *E. coli* se ha encontrado una fuerte inhibición por glutamina (Servin-González y Bastarrachea, 1984), aunque no se sabe si es la glutamina intracelular o la extracelular la que inhibe. La existencia de un sitio de unión para glutamina en el acarreador ha sido evidenciada también en otros organismos, estudiando ya sea el efecto de la glutamina directamente, o el efecto de análogos de ésta, principalmente la metionina-D,L-sulfoximina. En *K. pneumoniae*, el transporte fue inhibido por este análogo, además de ser inhibido por otros dos análogos, la metionina sulfona y la 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON). Dicha inhibición era parcialmente aliviada si las células eran preincubadas en

presencia de glutamina, puesto que esta inhibe la entrada de los análogos. En este organismo la glutamina provoca también una inhibición pero mucho más débil que en E. coli. Posteriormente, este estudio fue extendido a otras bacterias fijadoras de nitrógeno, encontrándose algo muy similar (Kleiner et al., 1983). En A. vinelandii se encontró que no solamente la glutamina y el DON son inhibidores del transporte de NH_3 , sino también GMD (Jayakumar y Barnes, 1984). En estos estudios se ha hecho evidente que son los niveles intracelulares de glutamina o sus análogos los que tienen un efecto sobre el acarreador. El hecho de que los niveles intracelulares de glutamina regulen la actividad de éste probablemente se deba a que son los niveles de este metabolito los que rápidamente responden a las diferencias en la concentración de NH_3 en el medio.

Las únicas mutantes descritas que carecen del acarreador de NH_3 por una mutación aparentemente estructural fueron aisladas en K. pneumoniae (Castorph y Kleiner, 1984). Estas mutantes fueron incapaces de utilizar concentraciones bajas de NH_3 como fuente de nitrógeno, mientras que concentraciones altas fueron utilizadas casi normalmente; además fueron incapaces de utilizar aminoácidos como fuente de nitrógeno, encontrándose que en estas condiciones, a diferencia de una cepa silvestre, excretaban grandes cantidades de NH_3 al medio de cultivo. Basándose en el fenotipo de estas mutantes, Kleiner (1985) ha propuesto que la función principal del acarreador de NH_3 es la "retención cíclica" de dicha molécula; es decir que para poder mantener niveles intracelulares adecuados de NH_3 , en condiciones de limitación, es necesario un acarreador activo, ya que de lo contrario el NH_3 difundiría al exterior en forma de NH_3 , y no podría ser recapturado.

RESULTADOS.

glnA Mutations Conferring Resistance to
Methylammonium in Escherichia coli K12

By

LUIS SERVIN-GONZALEZ^{1*}, MYRIAM ORTIZ¹, ALICIA GONZALEZ^{2*},
and FERNANDO BASTARRACHEA³

Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología¹;
Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno² and Instituto de
Fisiología Celular³, Universidad Nacional Autónoma de México,
Apartado Postal 70479, D.F. 04510 MEXICO

Running title: CH₃NH₂-resistant mutants of E. coli

Subject category: Genetics and Molecular Biology

Index suggestions:

Methylammonium, Escherichia coli mutants resistant to
Glutamine synthetase, and sensitivity to methylammonium in Escherichia coli
Escherichia coli, glutamine synthetase and sensitivity to methylammonium in

Cells of Escherichia coli K12 were sensitive to 100 mM methylammonium when cultured under nitrogen limitation, and resistant when grown with an excess of either NH_4Cl or glutamine. Glutamine synthetase activity was required for expression of the methylammonium-sensitive phenotype. Mutants were isolated which were resistant to 100 mM methylammonium, even when grown under nitrogen limitation. P1 bacteriophage transduction and F-prime complementation analysis revealed that the resistance-conferring mutations mapped either inside the glnA structural gene and/or somewhere else in the E. coli chromosome. Glutamine synthetase was purified from the wild-type and from some of the mutant strains. Strains carrying glnA-linked mutations as solely responsible for the methylammonium-resistant phenotype yielded an altered enzyme, which was less active biosynthetically, with either ammonium or methylammonium as substrate. Sensitivity to methylammonium appears to be due to synthesis of γ -glutamylmethylamide by glutamine synthetase, which is poorly, if at all, synthesized by mutants carrying an altered glutamine synthetase enzyme.

INTRODUCTION

The ammonium ion analogue methylammonium has been used to determine the presence of ammonium transport systems in several prokaryotic and eukaryotic micro-organisms. In most cases, methylammonium enters the cells via specific ammonium transport systems (see Brown, 1980; Kleiner, 1981, 1985 for reviews). In Escherichia coli and other bacteria, this system has a high affinity for ammonium (Stevenson & Silver, 1977; Kleiner, 1985; Jayakumar et al., 1985). When the extracellular ammonium concentration is low, cells can generate intracellular concentrations which are 100-fold higher or more;

at high external ammonium concentrations, cells grow efficiently without an active high affinity ammonium transport system, since the amount of ammonia that enters the cell by simple diffusion is sufficient for cellular growth (Kleiner, 1985).

In E. coli and other bacteria, synthesis of the ammonium carrier is under genetic control (Serrvín-González & Bastarrachea, 1984; Kleiner, 1985; Jayakumar et al., 1986). The system that regulates ammonium transport in enterobacteria, known as Ntr, also regulates expression of several other systems involved in the transport and utilization of nitrogenous compounds such as arginine, proline, etc., and synthesis of glutamine synthetase (see Magasanik, 1982 for a review).

Methylammonium can be used as a substrate by glutamine synthetase, even in strains that cannot use it as nitrogen source. In the presence of methylammonium, glutamate and ATP, glutamine synthetase catalyses synthesis of the glutamine analogue γ -glutamylmethylamide (GMAM; Barnes & Zimniak, 1981; Barnes et al., 1983; Kleiner, 1985).

In this paper we describe the methylammonium-sensitive (MA^S) phenotype of E. coli, and the role glutamine synthetase plays in it. This was possible through the isolation and characterization of MA^S mutants.

METHODS

Bacterial strains. All strains used were Escherichia coli K12 derivatives (Table 1).

Culture conditions. Cells were cultured at 37°C, using NN minimal medium (Covarrubias et al., 1980), with 0.2% (w/v) glucose as carbon source.

All compounds added, i.e. carbohydrates, amino acids, vitamins, nitrogen sources and methylammonium, were sterilized by filtration. Liquid cultures were grown aerobically in a rotary shaker at 250 r.p.m., and growth was monitored in a Klett-Summerson colorimeter with a red filter (no. 66). For growth on minimal medium plates, 1.5% Bacto-Agar (Difco) was added to NH₄ medium. For mutagenesis, transductions and matings, cells were grown in LB broth (Miller, 1972).

Mutagenesis. MX614 cells were mutagenized with ethylmethane sulphonate according to Miller (1972), and plated directly on NH minimal medium plates with 0.2% (w/v) glucose as a carbon source, 0.2% (w/v) arginine as a nitrogen source, and 100 mM methylammonium. Plates were incubated for 48 h at 37°C; colonies from each plate were transferred with sterile wooden toothpicks to plates with either glutamine (1 mg ml⁻¹) or NH₄Cl (15 mM) as nitrogen source, and after overnight incubation growth patches were assayed for glutamine synthetase activity by a qualitative colony test (Pahel et al., 1978). In this way, ten different mutants were selected from four different pools.

Genetic procedures. Pivira bacteriophage was used for transductions. Preparation of phage lysates, and protocols for transductions and matings, were according to Miller (1972).

Enzyme assays. Glutamine synthetase [L-glutamate:ammonia ligase (ADP-forming); E.C. 6.3.1.2.] was assayed by the γ -glutamyl transferase or by the biosynthetic, γ -glutamylhydroxamate-forming procedures as described by Bender et al. (1977), with minor modifications (Covarrubias et al., 1980); the average adenylation state was determined as described by Bender

et al. (1977). To measure biosynthetic activity of purified glutamine synthetase preparations, the phosphate-release method described by Shapiro & Stadtman (1970) was used. Protein was measured by the Lowry method.

Purification of glutamine synthetase. The polyethylene glycol precipitation procedure described by Streicher & Tyler (1981) was used, but with the final Sepharose 6B column step omitted.

Reagents. Amino acids, vitamins, methylamine-HCl and reagents used for assay or purification of glutamine synthetase were purchased from Sigma. All other reagents used were of analytical grade.

Amino acid analysis. Extracts for amino acid analysis were prepared as described in the legend to Table 7. The filtrates containing the free amino acids were lyophilized and the samples resuspended in lithium citrate buffer (pH 2.88). Amino acids were separated with an Aminco amino acid analyser and quantified in an Aminco ratio fluorometer after coupling with β -phthalaldehyde. Purified glutamine synthetase from the wild-type strain was used to obtain GMAD from methylammonium and glutamate in a standard biosynthetic reaction mixture. The amount of GMAD synthesized was calculated from the amount of phosphate liberated from ATP during the reaction. Both GMAD and glutamine ($2.5 \mu\text{moles ml}^{-1}$) were added to a Sigma amino acid standard solution. Using a Perkin-Elmer LC1-100 laboratory computing integrator, the GMAD response factor was calculated by the system from a calibration run. A full separation of glutamate, glutamine and GMAD was obtained with approximate retention times of 34, 36 and 41 min, respectively.

RESULTS

Effect of methylammonium on E. coli growth.

Growth inhibition by methylammonium in E. coli was nitrogen-dependent. When cells were provided with a high (15 mM) NH_4Cl concentration as nitrogen source, growth was not affected by the presence of methylammonium in the medium. However, when the NH_4Cl concentration was low (0.5 mM) or when arginine, proline or glutamate was used as nitrogen source, growth was fully inhibited by the presence of 100 mM methylammonium. All nitrogen sources under which methylammonium inhibited growth were limiting (i.e. high glutamine synthetase activity is required for growth under such conditions). Even though glutamine is nitrogen limiting for growth in E. coli, 1 mg glutamine ml^{-1} allowed growth in the presence of methylammonium; however, with lower concentrations of glutamine (75 $\mu g ml^{-1}$), growth was inhibited by methylammonium.

Effect of methylammonium on glutamine synthetase activity and adenylylation

Glutamine synthetase of Escherichia coli can utilize methylammonium as a substrate both in vivo and in vitro, leading to the formation of GHAD (Barnes et al., 1983). We measured glutamine synthetase activity and adenylylation to determine whether addition of methylammonium, under conditions where growth is inhibited, had any apparent effect on glutamine synthetase. A 2 h exposure to 100 mM methylammonium of a culture growing exponentially with arginine as nitrogen source had no apparent effect on either glutamine synthetase levels or adenylylation (data not shown). Apparently, growth inhibition by methylammonium could not be attributed to

inhibition of glutamine synthetase, or to interference with the glutamine synthetase acenylation system.

Isolation and characterization
of methylammonium-resistant mutants

Mutants which were no longer inhibited by methylammonium under nitrogen limitation were isolated. MX614 cells were treated with ethylmethane sulphonate, and plated on medium containing arginine as nitrogen source and 100 mM methylammonium. Only 10 of the many independent MA^r mutants were further characterized. As can be seen in Table 2, most of the mutants had altered glutamine synthetase activity. P1y1rA phage was propagated in each of the mutant strains, and the lysates were used to transduce strain MX734 (Table 1) selecting for glutamine prototrophs. When strains MX1210, MX1211, MX1212, MX1213 and MX1214 were used as donors, more than 90% of transductants in each case were resistant to 100 mM methylammonium (Table 3) indicating that the resistance-conferring mutations carried by these strains lay within the glnA gene, or very close to it. We therefore tentatively termed the alleles carried by the above strains gln93, gln94, gln95, gln96 and gln97, respectively. Transductions were also performed with lysates from strains carrying the glnA-linked MA^r-conferring mutations as donors and strain MX821 as recipient. This strain is a glnA71::Tn5 derivative of the primary F-prime strain AB1206. MX821 is therefore haploid for the entire glnAIG operon carried on its F'14 merogenote (Osorio et al., 1984). The results were similar to those obtained with MX734 as a recipient (Table 3). Glutamine synthetase activities of the transductants in either the MX614 or the AB1206 background were the same (Table 4); i.e. the MA^r phenotype was always accompanied by the altered glutamine synthetase activity which was

characteristic of the donor strain. The F⁺14 derivatives carrying the glnA-linked mutations conferring methylammonium resistance could now be utilized for genetic complementation experiments (see below). Glutamine synthetase activity from strains carrying the gln mutations was also assayed by the biosynthetic γ -glutamylhydroxamate-forming procedure (see Methods). This activity was strongly diminished in the mutants as compared to the wild-type strain (Table 4). These data suggest that methylammonium resistance could be due to the presence of an altered glutamine synthetase enzyme, which was biosynthetically less active.

When P1 lysates from strains MX1215, MX1216, MX1217, MX1218 and MX1219 were used to transduce MX734, all Gln^r-resulting transductants that were tested were MA^S (Table 3). These results could have been taken as an indication that methylammonium resistance in these strains was due to mutations unlinked to glnA. However, since such strains showed altered glutamine synthetase activity, it was possible that they harboured more than one mutation. To distinguish between these options, the glnALG region of the mutants was replaced by a wild-type glnALG region in the following way. P1virA phage propagated on strain MX734 (glnA71::Tn5) was used to transduce strains MX1215, MX1216, MX1217, MX1218 and MX1219 to glutamine auxotrophy (Kan^r selection). These transductants were then used as recipients of P1 phage grown on either MX614 or on each original parental mutant strain (MX1215 through MX1219), selecting in all cases for glutamine prototrophy. All strains except one (MX1215) yielded MA^S transductants with MX614 phage, and MA^r transductants when their original glnA chromosomal region was reintroduced (data not shown). Therefore, the MA^r phenotype of strains MX1216, MX1217, MX1218 and MX1219 seems to be due to more than one mutation,

one of them being within the glnALG region. Only the MA⁺ phenotype of strains MX1215 appears to be associated with one or more mutations unlinked to glnA.

Complementation analysis of
glnA-linked MA⁺-conferring mutations

Since the MA⁺-conferring mutations carried by strains MX1210 through MX1214 appeared to be due to mutational events within the glnALG operon, we used F'14 derivatives carrying these alleles to complement a set of strains carrying chromosomal Tn₅ insertion mutations in either of the three operon genes. Matings were performed using strains MX1225 through MX1229 (carrying alleles gln92 through gln97, respectively) as donors. As a control donor we used strain AB1206, which transfers the wild-type F'14 episome. All recipients used carried the recA56 allele, and were wild-type for the glnALG region (MX991), or carried Tn₅ insertions in either the glnA (MX944), glnL (MX961) or glnG (MX913) genes (see also Table 1). Ilv⁻ His⁺ exconjugants were selected, and tested for methylammonium resistance on plates containing arginine as sole nitrogen source. One exconjugant selected from each cross was purified and assayed for glutamine synthetase activity (Table 5). The MA⁺-conferring mutations were all recessive to wild-type, since strain MX881 (glnALG⁻) carrying any of the F'14 derivatives (gln93 through gln97) retained its sensitivity to methylammonium, and had normally regulated glutamine synthetase levels. The F'14 derivatives were able to complement the glnL::Tn₅ and glnG::Tn₅ insertions, since the resulting merodiploids had normal glutamine synthetase activity and were MA⁺. When the same F'14 derivatives were introduced into strain MX944 (carrying a glnA::Tn₅ insertion), altered glutamine synthetase activities, corresponding to the

original mutant strains, were obtained; these merodiploids were MA^m, as compared to MX944 carrying the wild-type F'14 episome, which was MA^c and had normal glutamine synthetase activities. We conclude that the MA^m-conferring mutations are trans-recessive and lie inside the glnA gene. They were, therefore, renamed glnA93, glnA94, glnA95, glnA96 and glnA97.

Properties of purified glutamine
synthetase from methylammonium-resistant strains

To ascertain the structural nature of the glnA-linked, MA^m-conferring mutations, the glutamine synthetases from the wild-type (AB1206) and from the mutants MX1225 through MX1229 were purified as described in Methods. The glutamine synthetase preparations so obtained had only some minor contaminants, as evidenced by sodium dodecylsulphate polyacrylamide disc gel electrophoresis. The major polypeptide observed in all preparations was a single band with the same mobility as that of the wild-type enzyme (data not shown). This implies that the resistance-conferring mutations probably are single-site mutations which do not grossly alter the molecular mass of the glutamine synthetase polypeptide. Glutamine synthetase biosynthetic activity was measured by the phosphate-release assay (see Methods), using either ammonium or methylammonium as substrates (Table 6). It is evident that alleles glnA93 through glnA97 are structural mutations, since they produced altered glutamine synthetase enzymes, which were less active biosynthetically with either ammonium or methylammonium as substrates. We tried to determine the K_m values of the wild-type and mutant glutamine synthetases for ammonium. This was not possible for the enzymes from strain MX1225 (glnA93), which became inactive during purification (Table 6), or that from strain MX1226 (glnA94 allele), which yielded low and variable

results. The K_m values for ammonium for the wild-type and three of the altered enzymes (Table 6) show that the enzymes encoded by alleles glnA95 and glnA97 had much higher K_m values than the wild-type, while that encoded by the glnA96 allele had approximately the same K_m as the wild-type.

GMAD accumulation by
wild-type and mutant strains

The low affinity for ammonium (methylammonium) found in some of the mutant glutamine synthetases could result in a poor ability to convert methylammonium into GMAD, which in turn could be the cause of the MA⁺ phenotype. We therefore measured intracellular pools of glutamate, glutamine and GMAD in wild-type cells and in one of the mutants after exposure to 100 mM methylammonium in glucose-arginine medium (Table 7). MX614 cells accumulated large amounts of GMAD; by contrast, MX1210 cells synthesized very small amounts, consistent with their having a low glutamine synthetase biosynthetic activity (Table 4). Under such conditions, glutamine pools were very small in both strains (< 2 nmol (mg protein)⁻¹, data not shown).

DISCUSSION

We have found that under nitrogen limitation, aerobic growth of E. coli is inhibited by high (100 mM) extracellular concentrations of methylammonium. Our results suggest that GMAD, and not methylammonium, is responsible for growth inhibition. This is evidenced by the fact that extracellular methylammonium has a growth inhibitory effect on cells only under conditions of nitrogen limitation, when ammonium is limiting and glutamine synthetase is derepressed and biosynthetically active (deadenylylated). Under such conditions, synthesis of GMAD from glutamate

and methylammonium would be favoured by reduced competition with ammonium for glutamine synthetase. Apparently, excess ammonium and low levels of adenylated enzyme prevent accumulation of GMD, at least in sufficient amounts to be growth inhibitory.

Mutants resistant to methylammonium under conditions of nitrogen limitation were isolated. Some of these showed altered γ -glutamyltransferase specific activities (Table 2). It therefore seemed possible that they carried mutations in glnA, the structural gene for glutamine synthetase. Genetic characterization of the mutants was accomplished by P1 transductions and F'14 complementations (Tables 3,4 and 5). Four out of ten independent strains turned out to carry more than one mutation, at least one of them being linked to glnA; both glnA-linked and unlinked mutations were required for these strains to display the MA^r phenotype; another strain (HX1215) carried mutation(s) unlinked to glnA. Further mapping and characterization of the glnA-unlinked mutations has not been carried out yet. The remaining five mutant strains owe their MA^r phenotype to mutations that lie inside the glnA gene. These mutants were characterized more thoroughly. Even though they seemed quite diverse with regard to their γ -glutamyl transferase activity, it is clear that the relevant glutamine synthetase biosynthetic activity was reduced in all of them. It cannot be ruled out yet if strains with high transferase activity carry more than one glnA-linked mutation, with one mutation reducing the biosynthetic activity and another allowing high constitutive levels of the altered enzyme; this seems to be the case for the glnA97 allele, which confers to cells glnA-dominant constitutive levels of a glutamine synthetase with a high K_m for NH₄⁺ (Tables 5 and 6).

Some of the altered glutamine synthetases of the MA^r mutants are less

active, at least in part, because of a reduced affinity for ammonium or methylammonium. It was interesting to find, however, that MX1228, carrying the glnA96 allele, had an enzyme with the same affinity as the wild-type, but with altered catalytic properties; therefore, insensitivity to methylammonium is not necessarily due to a reduced affinity for it by the altered glutamine synthetases, indicating again that this molecule could not be the real inhibitor. Whether the glnA96 mutation carried by MX1228 is associated with a diminished affinity of its glutamine synthetase for glutamate or ATP remains to be elucidated.

Since a wild-type strain is able to synthesize growth inhibitory amounts of GHAD only under nitrogen limitation, it seems that those intracellular concentrations are not easy to attain. In fact, extracellular methylammonium concentrations which are 5 or 10-fold lower than the 100 mM concentration used throughout this study, still allowed growth to proceed at a slightly diminished rate (data not shown). It seems therefore obvious that the mutant strains carrying the biosynthetically inefficient glutamine synthetases are unable to synthesize inhibitory amounts of GHAD. When we measured conversion of methylammonium into GHAD in the wild-type strain and in one of the mutant strains, we found a considerably higher concentration of GHAD in the former than in the latter.

It is noteworthy that among the MA^r mutants we have isolated none was found affected in ammonium (methylammonium) transport. Since methylammonium concentrations required to inhibit growth are high, access into cells could not be limited to the high affinity transport system; as in the case of excess ammonium, sufficient methylamine could also diffuse through the membrane.

Our results show that GNAD accumulation is responsible for growth inhibition in E. coli, but further experimentation is required to elucidate the mechanism of inhibition. It will also be interesting to explore the prevalence of a similar phenotype in other micro-organisms, and whether it might provide a general way for the isolation of mutations affecting glutamine synthetase.

We are grateful to A.V. Osorio and J.C. Urbina for their gift of some of the strains used in this work.

REFERENCES

- BARNES, E.M., Jr. & ZIMNIAK, P. (1981). Transport of ammonium and methylammonium ions by Azotobacter vinelandii. Journal of Bacteriology 146, 512-516.
- BARNES, E.M., Jr., ZIMNIAK, P. & JAYAKUMAR, A. (1983). Role of glutamine synthetase in the uptake and metabolism of methylammonium by Azotobacter vinelandii. Journal of Bacteriology 156, 752-757.
- BASTARRACHEA, F., BROM, S., COVARRUBIAS, A.A., OSORIO, A. & BOLIVAR, F. (1980). Genetic characterization of mutations affecting glutamine biosynthesis and its regulation in Escherichia coli K12. In: Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation, pp. 107-121. Edited by J. Mora and R. Palacios. New York: Academic Press.
- BENDER, R.A., JANSSEN, K.A., RESNICK, A.D., BLUMENBERG, M., FOOR, F. & MAGASANIK, B. (1977). Biochemical parameters of glutamine synthetase from Klebsiella aerogenes. Journal of Bacteriology 129, 1001-1009.
- BROWN, C.M. (1980). Ammonia assimilation and utilization in bacteria and fungi. In: Microorganisms and Nitrogen Sources, pp. 511-535. Edited by J.W. Payne. Chichester: John Wiley & Sons.
- COVARRUBIAS, A.A., SANCHEZ-PESCADOR, R., OSORIO, A., BOLIVAR, F. & BASTARRACHEA, F. (1980). ColE1 hybrid plasmids containing Escherichia coli genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine. Plasmid 3, 150-164.

- JAYAKUMAR, A., EPSTEIN, W. & BARNES, E.M., Jr. (1985). Characterization of ammonium (methylammonium)/potassium antiport in Escherichia coli. The Journal of Biological Chemistry 260, 7528-7532.
- JAYAKUMAR, A., SCHULMAN, I., MACNEIL, D. & BARNES, E.M., Jr. (1986). Role of the Escherichia coli glnA/G operon in regulation of ammonium transport. Journal of Bacteriology 166, 281-284.
- KLEINER, D. (1981). The transport of NH_3 and NH_4^+ across biological membranes. Biochimica et biophysica acta 639, 41-52.
- KLEINER, D. (1985). Bacterial ammonium transport. FEMS Microbiology Reviews 32, 87-100
- MAGASANIK, B. (1982). Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. Annual Review of Genetics 16, 135-168.
- MILLER, J. (1972). Experiments in Molecular Genetics. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.
- OSORIO, A.V., SERVIN-GONZALEZ, L., ROCHA, M., COVARRUBIAS, A.A. & BASTARRACHEA, F. (1984). gln-dominant, glutamine synthetase constitutive mutations of Escherichia coli independent of activation by the glnG and glnE products. Molecular and General Genetics 194, 114-123.
- PAHEL, G., ZELENETZ, A.D. & TYLER, B. (1978). glnB gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in Escherichia coli. Journal of Bacteriology 133, 139-148.

SERVIN-GONZALEZ, L. & BASTARRACHEA, F. (1984). Nitrogen regulation of synthesis of the high affinity methylammonium transport system of Escherichia coli. Journal of General Microbiology 130, 3071-3077.

SHAPIRO, B.M. & STADTMAN, E.R. (1970). Glutamine synthetase (Escherichia coli). Methods in Enzymology 17A, 910-922.

STEVENSON, R. & SILVER, S. (1977). Methylammonium uptake by Escherichia coli: evidence for a bacterial NH_3 transport system. Biochemical and Biophysical Research Communications 75, 1133-1139.

STREICHER, S.L. & TYLER, B. (1980). Purification of glutamine synthetase from a variety of bacteria. Journal of Bacteriology 142, 69-78.

Table 1. Bacterial strains

Strain	Genotype	Source or derivation
MX114	$\Delta(\text{pro-1ac})$ <u>galE</u> <u>ilv-680</u> <u>thi-1</u> .	Bastarrachea <u>et al.</u> (1980)
MX724	$\Delta(\text{pro-1ac})$ <u>galE</u> <u>ilv-680</u> <u>glnA21::Tc^R</u> <u>thi-1</u>	Osorio <u>et al.</u> (1984)
AS1206	<u>proA2</u> <u>ifr-2</u> <u>lacY1</u> <u>supE44</u> <u>galK2</u> <u>his-4</u> <u>pro13</u> $\Delta\text{DE2}(\text{ilvE-argM})$ <u>thi-1</u> / F'14	S. Bachmann
MX321	<u>proA2</u> <u>ifr-2</u> <u>lacY1</u> <u>supE44</u> <u>galK2</u> <u>his-4</u> <u>pro13</u> $\Delta\text{DE2}(\text{ilvE-argM})$ <u>thi-1</u> / F'14 <u>glnA21::Tc^R</u>	Osorio <u>et al.</u> (1984)
MX251	$\Delta(\text{pro-1ac})$ <u>EME</u> <u>recA56</u> <u>ilv-680</u> <u>thi-1</u>	Our laboratories
MX912	$\Delta(\text{pro-1ac})$ <u>galE</u> <u>recA56</u> <u>ilv-680</u> <u>glnC24::Tc^R</u> <u>thi-1</u>	Our laboratories
MX944	$\Delta(\text{pro-1ac})$ $\Delta(\text{gal-att})$ - <u>bio</u> <u>recA56</u> <u>ilv-680</u> <u>glnA21::Tc^R</u> <u>thi-1</u>	Our laboratories
MX961	$\Delta(\text{pro-1ac})$ <u>galE</u> <u>recA56</u> <u>ilv-680</u> <u>gln182::Tc^R</u> <u>thi-1</u>	Our laboratories

Table 2. Glutamine synthetase specific activities of wild-type
and methylammonium resistant strains

Cells were grown aerobically until the cultures reached 100-200 Klett units, and assayed for γ -glutamyltransferase activity as described in Methods.

Results are the means of two experiments. GN, glucose-15 mM NH_4Cl -NN medium; GGIN, glucose-1 mg ml^{-1} glutamine-NN medium; GArg, glucose-0.2% arginine-NN medium.

Strain	Glutamine synthetase activity [nmol min^{-1} (mg protein) $^{-1}$]		
	GN	GGIN	GArg
MX614	250	1 770	2 260
MX1210	760	890	1 200
MX1211	140	100	60
MX1212	200	1 090	1 250
MX1213	120	200	280
MX1214	480	3 060	2 680
MX1215	760	1 140	2 080
MX1216	280	1 930	2 340
MX1217	830	1 190	1 700
MX1218	250	1 960	1 650
MX1219	960	1 470	1 990

Table 3. Mapping of methylammonium resistance-conferring mutations by PI transduction

Transductants were selected on glucose-15 mM NH₄Cl-NM minimal medium plates. After growth, individual colonies were transferred as patches onto glucose-0.2% arginine-NM medium plates, with and without 100 mM methylammonium. MA^R transductants grew on plates of either medium after 24 h of incubation, while MA^S transductants were unable to grow on plates with methylammonium, even after 48 h of incubation.

PI donor	Recipient	Number of Gln ⁻ Kan ^S transductants that inherited the MA ^R phenotype.
MX614 (<u>glnA⁻</u>)	MX734 (<u>glnA71::Tn5</u>)	0/44
MX1210 (<u>gln93</u>)	"	24/25
MX1211 (<u>gln94</u>)	"	49/50
MX1212 (<u>gln95</u>)	"	21/21
MX1213 (<u>gln96</u>)	"	42/42
MX1214 (<u>gln97</u>)	"	50/50
MX1215	"	0/16
MX1216	"	0/22
MX1217	"	0/21
MX1218	"	0/26
MX1219	"	0/50
MX1210 (<u>gln93</u>)	MX821 (<u>glnA71::Tn5</u>)	50/50
MX1211 (<u>gln94</u>)	"	50/50
MX1212 (<u>gln95</u>)	"	50/50
MX1213 (<u>gln96</u>)	"	50/50
MX1214 (<u>gln97</u>)	"	50/50

Table 4. Glutamine synthetase specific activities of E. coli strains carrying glnA-linked methylammonium resistance-conferring mutations, and of transductants derived from them

Strains MX1220 through MX1224 are transductants obtained using MX734 as recipient of PI lysates of strains MX1210 through MX1214. Strains MX1225 through MX1229 are transductants obtained with the same lysates, but with MX821 as recipient (see text for a detailed explanation). Cells were grown aerobically as described in Table 2, and assayed for γ -glutamyl transferase activity. Cells grown in G6In medium were also assayed for biosynthetic γ -glutamylhydroxamate-forming activity, given in parenthesis. Results are the means of three experiments. GN; G6In; see Table 2.

Allele	Strain	Glutamine synthetase activity (nmol min ⁻¹)		Glutamine synthetase activity (nmol min ⁻¹)			Glutamine synthetase activity (nmol min ⁻¹)		
		(mg protein) ⁻¹		(mg protein) ⁻¹			(mg protein) ⁻¹		
		GN	G6In	Strain	GN	G6In	Strain	GN	G6In
<u>glnALG⁺</u>	MX614	240	1 960 (890)	---	-	--	AB1206	260	1 670 (1 200)
<u>gln93</u>	MX1210	520	1 380 (120)	MX1220	610	1 110	MX1225	440	1 090 (190)
<u>gln94</u>	MX1211	140	140 (100)	MX1221	120	160	MX1226	130	160 (150)
<u>gln95</u>	MX1212	160	1 110 (150)	MX1222	220	950	MX1227	210	1 520 (200)
<u>gln96</u>	MX1213	90	170 (100)	MX1223	80	140	MX1228	100	470 (380)
<u>gln97</u>	MX1214	490	2 480 (250)	MX1224	610	2 150	MX1229	730	1 840 (390)

Table 5. Complementation analysis with wild-type F'14 and derivatives, of strains carrying Tn5 insertions in the *glnA*, *glnL* and *glnG* genes

The MA^r phenotype of exconjugants from each mating was scored as described in Table 3. One exconjugant from each cross was purified; cells were grown until the cultures reached 100:20 Klett units, and assayed for γ -glutamyltransferase activity. Representative results from several experiments are shown. MA, resistance (R) or sensitivity (S) to 100 mM methylammonium. GN; GGN: see Table 2. NG, no growth.

Episome	MX881 (<i>glnALG*</i>)						MX944 (<i>glnA71::Tn5</i>)			MX961 (<i>glnLB2::Tn5</i>)			MX913 (<i>glnG74::Tn5</i>)					
	Glutamine synthetase activity (nmol min ⁻¹ (ng protein) ⁻¹)						Glutamine synthetase activity (nmol min ⁻¹ (ng protein) ⁻¹)			Glutamine synthetase activity (nmol min ⁻¹ (ng protein) ⁻¹)			Glutamine synthetase activity (nmol min ⁻¹ (ng protein) ⁻¹)					
	MA	GN		GGN		MA	GN	GGN	MA	GN	GGN	MA	GN	GGN				
None	S	200	1	590	NG	NG	<10	NG	80	150	NG	30	60					
F'14 <i>glnALG*</i>	S	300	1	080	S	180	2	220	S	380	3	770	S	390	3	980		
F'14 <i>gln93</i>	S	190	1	440	R	780	1	030	S	400	1	080	S	370	2	060		
F'14 <i>gln94</i>	S	370	1	410	R	160	260	S	430	1	230	S	470	1	980			
F'14 <i>gln95</i>	S	210	1	330	R	400	1	300	S	240	2	600	S	550	2	280		
F'14 <i>gln96</i>	S	270	1	790	R	180	70	S	200	1	770	S	260	1	380			
F'14 <i>gln97</i>	S	550	2	550	R	1	750	1	370	S	1	040	2	220	S	620	2	400

Table 6. Specific activity of purified glutamine synthetase from wild-type and methyleammonium resistant strains.

Glutamine synthetase was purified from cells grown on glucose-arginine-NH₂ minimal medium. Biosynthetic activity was assayed as described in Methods. Standard reaction mixtures were prepared with either NH₄Cl or CH₃NH₂-HCl. For K_m determinations reaction mixtures were prepared in order to assay NH₄ concentrations ranging from 0.01 mM to 1M. The K_m values were calculated from Lineweaver-Burk double reciprocal plots (not shown). Results are the average of two experiments. ND, Not determined

Strain	Glutamine synthetase activity [$\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg protein) ⁻¹]		K _m for NH ₄
	NH ₄	CH ₃ NH ₂	
AB1206 (glnA ⁺)	67.32	3.06	1 mM
MX1225 (glnA93)	<0.01	<0.01	ND
MX1226 (glnA94)	0.33	0.08	ND
MX1227 (glnA95)	4.53	0.14	83 mM
MX1228 (glnA96)	1.54	0.16	1 mM
MX1229 (glnA97)	1.15	<0.01	100 mM

Table 7. GMAD accumulation by cells of strains
MX614 (glnA⁻) and MX1210 (glnA⁺)

Cells were grown aerobically in glucose-arginine-NN minimal medium. When cultures reached 80 Klett units they were divided and growth was continued in the same medium with and without 100 mM methylammonium (MA). Samples were taken at appropriate intervals; cells were immediately centrifuged, resuspended in 80% (v/v) ethanol, and disrupted in a MSE Soniprep 150 sonic oscillator. The extracts were then heated in boiling water for 10 min, filtered and lyophilized. Amino acid analysis was carried out as described in Methods. ND, None detected.

Time (min)	MX614 (MA ⁻)				MX1210 (MA ⁺)			
	-MA		+MA 100 mM		-MA		+MA 100 mM	
	Glutamate (nmol)	GMAD (mg protein) ⁻¹	Glutamate (nmol)	GMAD (mg protein) ⁻¹	Glutamate (nmol)	GMAD (mg protein) ⁻¹	Glutamate (nmol)	GMAD (mg protein) ⁻¹
0	130	ND	130	ND	84	ND	84	ND
30	--	--	43	99	--	--	97	1
60	90	ND	76	390	90	ND	129	1
120	130	ND	77	395	130	ND	150	<1

THE JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY

The Editorial Office
Harvest House, 62 London Road, Reading RG1 5AS, U.K.
Tel. Reading (0734) 861345

CS/PL/13782

12 December 1986

Dr L. Servin-Gonzalez
CEINGEBI/UNAM
Apartado Postal 70479
D.F. 04510
Mexico

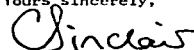
Dear Dr Servin-Gonzalez

re: 'Genetic analysis of methylammonium sensitivity in Escherichia coliK-12'

Thank you for submitting your paper to the Journal. It has been read by a referee, a Member of the Editorial Board and an Editor. They agree that the paper contains interesting and new data that deserve publication. However, it needs to be improved as regards the presentation. The discussion, in particular, must be reorganized and reduced in length (see specific comments in the referee's report); the Introduction and Results should also be shortened.

I look forward to receiving a revised version of the manuscript in due course. The marked copy of the manuscript has been returned to you under separate cover. Please return it when you submit the revised paper.

Yours sincerely,



DR. C. SINCLAIR
FOR THE EDITORS

THE JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY

REFEREE'S REPORT on Paper No. 13792, SERVIN-COMZALCZ, et al. 22-10.86

REPORT FOR AUTHOR

(Please insert carbon paper; if necessary, provide continuation sheets on A4 paper, in duplicate.)

Is the subject matter appropriate for the Journal?	YES <input checked="" type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	POSSIBLY AFTER REVISION AS SPECIFIED <input checked="" type="checkbox"/>
Are the scientific content and presentation of sufficiently high standard to merit publication in the Journal?	YES <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	

Main reasons for recommending rejection or revision:

The essential results have already been published	<input type="checkbox"/>	The presentation is inadequate	<input checked="" type="checkbox"/>
The scientific content is too slight	<input type="checkbox"/>	Other (see comments below)	<input type="checkbox"/>
The scientific content is incomplete	<input type="checkbox"/>		

COMMENTS

This manuscript describes the isolation and the genetic analysis of methylammonium-resistant mutants of *E. coli* and leads to the conclusion that sensitivity to methylammonium is due to synthesis of γ -glutamylmethylamide mediated by glutamine synthetase. This finding is interesting and merits publication in Journal of General Microbiology. Yet the presentation of the paper might be improved, in particular with regard to its length.

Specific suggestions are as follows :

- 1) Table 2 and 3 should be omitted. The informations from these tables could easily be inserted in the text. Also, table 4 and 6 could probably be condensed into a single table.
- 2) The discussion is long and difficult to read. It repeats results which have already been mentioned in the Results section.
- 3) The method used to determine the adenylation state of glutamine synthetase (p. 8 and Table 3) is not mentioned.

Some minor changes are pencilled in the manuscript.

RESULTADOS

Y

DISCUSION

ADICIONALES.

Además de los resultados contenidos en el artículo, se incluyen en esta tesis otros resultados adicionales. Algunos de estos resultados forman parte de las tesis de licenciatura en Biología de Olivia Santana Estrada y de Timoteo Celso Oyamendi Portugal.

La tesis realizada por Olivia Santana consistió en una caracterización más detallada del fenotipo de sensibilidad al metilamonio en E. coli, y de diferentes parámetros que la afectan, como son diferentes concentraciones de metilamonio en el medio, crecimiento en medio rico vs. crecimiento en medio mínimo, utilización de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno así como el efecto de mutaciones en el sistema regulador Ntr.

Primeramente, se estudió la sensibilidad de una cepa silvestre a diferentes concentraciones de metilamonio, tanto en medio rico como en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono y arginina como fuente de nitrógeno. Como se puede observar en las figuras 1 y 2 existe una marcada diferencia entre lo que ocurre en medio mínimo y en medio rico. En medio rico, ya sea LB o LB adicionado con glucosa 0.2%, no existe ningún efecto del metilamonio sobre el crecimiento celular, aún a concentraciones tan elevadas como 100 mM; en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono y arginina como fuente de nitrógeno, por el contrario, se observa una inhibición total del crecimiento aún después de 24 horas de incubación. Al disminuir la concentración de metilamonio adicionado al medio de cultivo, se observa que una concentración dos veces menor (50 mM) sigue inhibiendo totalmente el crecimiento, pero concentraciones menores (20, 10 y 5 mM) inhiben solamente de manera parcial. Las actividades de glutamina sintetasa corresponden al fenotipo observado, es decir en medio rico son muy bajas (.09 y .13 $\mu\text{moles/min/mg}$ proteína para LB y LB+glucosa respectivamente), mientras que en medio mínimo con arginina

como fuente de nitrógeno (la cual es limitante para el crecimiento) la actividad es elevada (1.44 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$. proteína).

Como se menciona en el artículo, se había observado que el fenotipo de sensibilidad que manifiesta una cepa silvestre de E. coli a una concentración elevada de metilamonio es un fenotipo dependiente de la fuente de nitrógeno, encontrándose que existe sensibilidad en condiciones de limitación de nitrógeno, y resistencia en condiciones de exceso de NH_3 . Además, dos fuentes de nitrógeno permitían la expresión de ambos fenotipos (sensibilidad o resistencia), dependiendo de la concentración a la que se encontraran en el medio. Tal es el caso del NH_3 y de la glutamina. Como se menciona en el artículo, una cepa silvestre es sensible a metilamonio a una concentración de NH_3 de 0.5 mM, mientras que es resistente si la concentración de NH_3 se eleva a 15 mM (estas concentraciones son las que rutinariamente hemos utilizado en el laboratorio como "bajo" amonio y "alto" amonio, encontrándose la GS inducida y no adenilada y reprimida y adenilada, respectivamente). Como estas concentraciones de NH_3 representan condiciones extremas, decidimos investigar lo que ocurría utilizando concentraciones de NH_3 intermedias. Nos parecía particularmente interesante estudiar aquellas donde ocurre la transición de GS inducida a GS reprimida. La figura 3 muestra las curvas de crecimiento de la cepa silvestre en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono y diferentes concentraciones de NH_3 como fuente de nitrógeno, las cuales van desde 0.1 mM hasta 15 mM, en presencia y en ausencia de metilamonio 100 mM en el medio. Las actividades de GS que corresponden a dichas curvas de crecimiento se encuentran en la tabla 1. Puede observarse que cuando la concentración de NH_3 es 1 mM o menor, existe una inhibición total del crecimiento en presencia de metilamonio, mientras que cuando la concentración de amonio es 5 mM o mayor no hay

inhibición del crecimiento. Lo anterior correlaciona con las actividades específicas de GS observadas, ya que en concentraciones de NH_3 de 1 mM o menores la GS se encuentra totalmente inducida, mientras que en concentraciones de 5 mM o mayores se encuentra reprimida. Es interesante observar lo que ocurre en las concentraciones intermedias, que van de 1 mM a 5 mM de NH_3 . En estas concentraciones se observa efectivamente la transición de inducción a represión de la GS, como se puede ver en la tabla 1. Las curvas de crecimiento tienen un comportamiento muy particular, ya que en presencia de metilamonio consisten de dos fases bien definidas: al principio el crecimiento no es inhibido y el cultivo crece hasta una cierta turbidez, llegando un momento en que el crecimiento se inhibe y permanece inhibido aún después de todo un día de incubación. A medida que aumenta la concentración de NH_3 esta inhibición se presenta en una fase más tardía del crecimiento y, por lo tanto, a una turbidez mayor. Inicialmente pensamos que este crecimiento inicial previo a la inhibición se debía a que las células hubieran acumulado NH_3 intracelularmente en el precultivo, de manera que pasaba un cierto tiempo antes de que pudiéramos observar la inhibición. Sin embargo, se observó el mismo tipo de inhibición cuando, antes de inocular los cultivos, se sometieron los precultivos a un lavado de las células y a una depleción del NH_3 que pudieran haber acumulado intracelularmente, incubándolas sin fuente de nitrógeno durante las seis horas previas a la inoculación. Es muy probable que el tipo particular de curva de crecimiento que se presenta nos esté reflejando algo del mecanismo por medio del cual ocurre la inhibición. Es factible pensar que en concentraciones de NH_3 menores a 1 mM, esta molécula no sea capaz de competir eficientemente con un exceso de metilamonio, de manera que rápidamente se puedan alcanzar concentraciones inhibitorias de GMAD, especialmente si tenemos en cuenta que la GS es abundante y muy activa en estas

condiciones. Por el contrario, en concentraciones altas de NH_3 , mayores de 5 mM, el amonio podría competir eficientemente con el metilamonio de manera que se dificultara la síntesis de GMAD, por lo menos en cantidad suficiente para inhibir el crecimiento. En aquellas concentraciones intermedias que no podemos considerar como totalmente limitantes, pero tampoco como óptimas, es probable que el crecimiento inicial se deba a que existe todavía suficiente NH_3 como para competir con el metilamonio; a medida que el cultivo crece, el amonio es utilizado y disminuye la concentración del mismo, por lo que se favorece la síntesis de GMAD, de manera que el crecimiento es inhibido antes de que el cultivo logre alcanzar su máximo crecimiento; lo anterior es congruente con el hecho de que la inhibición se da más tempranamente mientras menor es la concentración de amonio. Resultaría sin duda interesante el determinar la desaparición de amonio del medio en estas condiciones, así como las pozas intracelulares de este compuesto, para ver si efectivamente la hipótesis anterior explica los resultados obtenidos.

Cuando se utiliza glutamina como fuente de nitrógeno ocurre algo parecido con respecto al fenotipo de resistencia y sensibilidad al metilamonio. Es decir, si se emplean concentraciones de glutamina altas (1 mg/ml) el crecimiento de una cepa silvestre no es inhibido por una concentración elevada (100 mM) de metilamonio en el medio, mientras que si se utilizan concentraciones bajas de glutamina (0.1 mg/ml) el crecimiento sí es inhibido (Figura 4). Sin embargo, en el caso de glutamina ambas concentraciones provocan una condición de limitación de nitrógeno, como lo evidencia el hecho de que la GS se encuentra inducida (Tabla 2). Por lo tanto es necesario buscar otra explicación para estos datos. Una posibilidad interesante es que la glutamina sea capaz de competir con el análogo inhibidor (GMAD) que se sintetiza en

presencia de metilamonio. Entonces, la transición de resistencia a sensibilidad al metilamonio se debería a que, en un medio con concentraciones bajas de glutamina, ésta no alcanzaría niveles intracelulares suficientes para competir con el análogo; en un medio con una concentración alta de glutamina, por el contrario, ésta sí alcanzaría una concentración intracelular suficiente para competir con el inhibidor GMAD. Estos niveles, sin embargo, no son tan elevados como para provocar la represión o la adenilación de la glutamina sintetasa, como ocurre cuando se utiliza un exceso de amonio como fuente de nitrógeno.

Determinamos también si el crecimiento de una cepa silvestre era inhibido por metilamonio cuando se le proporciona prolina como fuente de nitrógeno. La utilización de este aminoácido está controlada por el sistema regulador Ntr, al igual que la utilización de la arginina. Al igual que con otras fuentes limitantes de nitrógeno (excepto glutamina), el crecimiento es inhibido por metilamonio 100 mM. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con arginina como fuente de nitrógeno, el crecimiento es inhibido también a concentraciones menores de metilamonio en el medio. Por lo tanto podemos definir que en estas condiciones existe hipersensibilidad al metilamonio. Una posible explicación es que la prolina sea aún más limitante para el crecimiento que la arginina. Esto es evidenciado por la diferencia que existe en la velocidad de crecimiento en estas dos fuentes de nitrógeno (tiempos de generación de 2.29 horas para arginina vs. 4.76 horas para prolina), y por el hecho de que la vía degradativa de arginina produce dos moléculas de glutamato por molécula de arginina, además de contribuir con una molécula de succinato (Shaibe et al., 1985), mientras que la prolina produce solamente una molécula de glutamato (Dendinger y Brill, 1970; Wood, 1981).

Otro de los factores que analizamos fue el efecto de la

fuelle de carbono sobre la sensibilidad al metilamonio. Los experimentos descritos anteriormente fueron todos llevados a cabo creciendo a las células en medios con glucosa 0.2% como fuente de carbono. Decidimos probar glicerol y succinato como fuentes de carbono, utilizando arginina como fuente de nitrógeno. Como se puede observar en la figura 6, no hay ninguna diferencia marcada en la sensibilidad que presenta una cepa silvestre al metilamonio cuando se crece en las diferentes fuentes de carbono con arginina como fuente de nitrógeno. La sensibilidad sigue siendo muy similar a la que presenta la cepa silvestre crecida en glucosa, incluso a concentraciones menores de 100 mM. Las actividades de GS son también bastante similares en estas tres condiciones (tabla 1). Al utilizar las mismas fuentes de carbono, con diferentes concentraciones de NH₃ como fuente de nitrógeno si es posible observar una diferencia. Como se puede ver en las figuras 7 y 8, existe una menor sensibilidad a metilamonio 100 mM en las fuentes limitantes de carbono (comparar con la figura 3). Al analizar las actividades que presenta la cepa silvestre en estas condiciones, es posible observar que la GS se reprime a concentraciones menores, lo cual es congruente con la mayor resistencia observada (Tabla 1).

Debido a la correlación que en general se observó entre los niveles de GS y la sensibilidad al metilamonio en una cepa silvestre, decidimos investigar si mutaciones regulatorias que afectan la expresión del gene glnA, y por lo tanto los niveles intracelulares de la enzima, tenían algún efecto sobre la sensibilidad. La cepa que analizamos primeramente fue la MX902, la cual lleva una inserción del transposón Tn₅ en el gene glnG, y por lo tanto es incapaz de regular la expresión de glnA, lo que da lugar a una síntesis de escape y al fenotipo de constitutividad baja de GS. Sin embargo, al presentar esta cepa el fenotipo Ntr⁻, es incapaz de utilizar arginina como fuente de nitrógeno, siendo ésta la

condición que rutinariamente hemos utilizado para determinar el fenotipo de sensibilidad o resistencia al metilamonio. Por lo tanto decidimos determinar el comportamiento que tiene esta cepa al ser crecida en diferentes concentraciones de NH_3 , las mismas que constituyen la zona de transición de sensibilidad a resistencia al metilamonio en una cepa silvestre. De acuerdo al fenotipo de cepas glnG^- , esperábamos de antemano una mayor resistencia al metilamonio en la cepa MX902, ya que es incapaz de inducir su GS. Como se puede observar en la figura 9, la cepa MX902 fue efectivamente resistente a metilamonio aún en concentraciones bajas de NH_3 , en las que una cepa silvestre es sensible; en la Tabla 3 podemos observar que efectivamente esta cepa sintetizó cantidades muy bajas de GS en cualquiera de las concentraciones de NH_3 . Es decir, a diferencia de la cepa silvestre no hubo una transición de GS reprimida a inducida, por lo que tampoco se observó una transición de resistencia a sensibilidad. Estos resultados apoyan fuertemente la hipótesis planteada en el artículo, en el sentido de que la resistencia a metilamonio de las mutantes ahí descritas se debe a su baja actividad biosintética de GS. Si bien la cepa MX902 posee una GS silvestre, ésta no puede inducirse, encontrándose en niveles muy bajos aún en condiciones de limitación de NH_3 ; para la célula esto equivaldría a tener mayor cantidad de una enzima mutante con una actividad biosintética reducida, por lo que en ambos casos la síntesis del análogo GMAD se vería afectada desfavorablemente, y no se alcanzarían niveles intracelulares suficientes como para lograr la inhibición del crecimiento. Debido a que esta cepa es capaz de crecer con glutamina como fuente de nitrógeno, analizamos también su capacidad para crecer en presencia de metilamonio 100 mM cuando la glutamina se la proporcionaba como fuente de nitrógeno a las mismas concentraciones que provocan una transición de sensibilidad a resistencia en la cepa silvestre. La figura 10 nos muestra que la cepa MX902

también fue resistente a concentraciones elevadas de metilamonio cuando se le proporcionan estas diferentes concentraciones de glutamina como fuente de nitrógeno. Las actividades de GS son también siempre bajas en estas condiciones (Tabla 2).

Una cepa con características similares a la MX902 es la cepa MX960, la cual tiene una inserción del transposón Tn₅ en el gene qlnL. Debido a la polaridad de la inserción sobre el gene qlnG, ésta cepa es incapaz de inducir completamente sus niveles de GS, así como la expresión de los sistemas Ntr. También analizamos el efecto de esta mutación sobre la sensibilidad al metilamonio, utilizando las mismas concentraciones de NH₃ y de glutamina que para la cepa silvestre y para la cepa MX902. Como se puede observar en las figuras 11 y 12, esta cepa también fue resistente a comparación de la cepa silvestre, pero no tan claramente como la cepa MX902. Si analizamos las actividades de GS de esta cepa en dichas condiciones es claro que existe una cierta inducción de la GS en las condiciones más limitantes (Tablas 2 y 3), lo cual quiere decir que la inserción de Tn₅ en qlnL no es completamente polar sobre qlnG, o bien que el promotor del gene qlnG, cuya existencia ha sido demostrada (J.C. Urbina, comunicación personal), se está expresando en esas condiciones para permitir la expresión de qlnG independientemente del promotor de qlnL. Sin embargo, esta inducción de la GS no es igual a la de la cepa silvestre, lo cual nos explica la mayor resistencia observada en la cepa MX960.

La tesis realizada por Timoteo Diamendi consistió en la obtención y caracterización parcial de cepas mutantes de E. coli hipersensibles al metilamonio. Como se mencionó en los párrafos anteriores, la sensibilidad no es igual en todas las fuentes de carbono ni en todas las fuentes de nitrógeno. Por ejemplo, cuando se utiliza arginina como fuente de

nitrógeno y glucosa como fuente de carbono, una cepa silvestre es sensible a metilamonio 100 mM, pero una concentración 10 veces menor (10 mM) inhibe solamente de manera parcial, permitiendo el crecimiento después de varias horas de incubación. En el artículo se demostró que se puede obtener resistencia a metilamonio 100 mM si se reduce la actividad biosintética de la GS, de manera que disminuya la cantidad de GMAD que se puede sintetizar a partir de metilamonio. Por lo tanto decidimos buscar mutantes que presentaran el fenotipo opuesto, es decir mutantes hipersensibles cuyo crecimiento fuera inhibido totalmente aún en presencia de concentraciones bajas (10 mM) de metilamonio, que no son totalmente inhibitoras para una cepa silvestre; estas mutantes, teóricamente, deberían ser capaces de sintetizar el inhibidor GMAD de manera más eficiente.

La estrategia que seguimos para aislar las mutantes se muestra en la figura 13. A partir de varios lotes de células mutagenizadas se lograron obtener colonias con el fenotipo esperado. Sólomente se describe la caracterización parcial de dos de ellas, que resultaron ser las más estables y las que dieron resultados reproducibles. Estas dos cepas mutantes, MX1251 y MX1252 son incapaces de crecer en presencia de metilamonio 10 mM cuando utilizan arginina como fuente de nitrógeno (Figura 14), mientras que en glutamina o NH_4^+ 15 mM sí son capaces de crecer (datos no mostrados). Las actividades específicas de GS se presentan en la Tabla 4. Como se puede observar, presentan actividades más elevadas que la cepa silvestre, pero únicamente en condiciones de limitación de nitrógeno. El fenotipo de estas mutantes concuerda con la hipótesis de que no es fácil alcanzar concentraciones intracelulares inhibitoras de GMAD y que para obtener la inhibición del crecimiento son requisitos la presencia de concentraciones extracelulares elevadas de metilamonio (100 mM) y GS inducida. Para poder alcanzar

concentraciones inhibitoras del análogo con cantidades extracelulares menores de metilamonio (10 mM) es necesario incrementar la enzima que lo sintetiza, o sea la GS, por sobre los niveles normales de una cepa silvestre crecida en condiciones de limitación de nitrógeno, tal y como ocurre en estas mutantes hipersensibles.

Para iniciar la caracterización de estas mutaciones, realizamos primeramente experimentos similares a los que se describen en el artículo y que se emplearon para la caracterización de las mutantes resistentes al metilamonio. Se obtuvieron lisados del bacteriófago P₁V₁₉a a partir de las mutantes, y éstos se utilizaron para transducir a las cepas MX734 y MX821, seleccionando el fenotipo Gln⁻ (prototrofia de glutamina); las transductantes fueron analizadas para ver si el fenotipo MAH^e (hipersensibilidad al metilamonio) y las actividades hiperinducidas de GS cotransducían con el gene glnA, observándose efectivamente que casi el 100% de las transductantes eran hipersensibles. Al purificar las transductantes y determinarles actividad específica de GS encontramos que seguían presentando niveles superiores a la cepa silvestre progenitora en condiciones de limitación de nitrógeno (datos no mostrados); por lo tanto, decidimos nombrar a las mutaciones de estas cepas gln101 y gln102. Además utilizamos los derivados del F'14 obtenidos de las transductantes de la cepa MX821 para realizar experimentos de complementación de inserciones en los genes glnA, glnL y glnG, así como de una cepa silvestre.

En este caso, el análisis por complementación no resultó ser tan directo como para las mutantes resistente (Tabla 5 del artículo), debido a algunas características peculiares de las cepas complementadas. Los resultados se puede observar en la Tabla 5. Al complementar a la cepa MX944 (glnA71::Tn5) con los diferentes plásmidos, observamos que es capaz de crecer en presencia de metilamonio 10 mM si se le introduce el F'14

silvestre, pero es hipersensible si el F'14 porta los alelos qln101 ó qln102. Esto indica que estas mutaciones no son recesivas a los genes qln1 y qln6 cromosomales. Al introducir los mismos plásmidos a una cepa silvestre, observamos que las mutaciones tampoco son recesivas al gene qlnA cromosomal; la mutación qln101 parece ser completamente dominante, mientras que la qln102 lo es solo parcialmente. Las cepas MX961 (qln102::Tn5) y MX912 (qln074::Tn5) portando cualquiera de los plásmidos, inclusive el F'14 silvestre, son hipersensibles. Esto pudiera explicarse por el efecto de dosis génica de qlnA; sin embargo, la cepa silvestre con el F'14 silvestre no presenta dicho fenotipo: es capaz de crecer en presencia de metilamonio 10 mM, a pesar de presentar la misma dosis génica.

Un dato adicional interesante es que las mutaciones qln101 y qln102 son incapaces de suprimir la auxotrofia por glutamina provocada por una inserción de Tn5 en el gene qlnE. Al introducir el alelo qlnF72::Tn5 por transducción a las cepas MX1253 (qln101) y MX1254 (qln102), más del 95% de las transductantes resistentes a kanamicina resultaron ser Gln⁻. Lo anterior indica que la expresión del fenotipo MA⁺ depende de la transcripción originada a partir del promotor qlnAP2, mediada por los elementos reguladores NR₁ y σ^{40} .

Tomando en cuenta los resultados anteriores existen varias posibilidades para explicar el fenotipo provocado por las mutaciones qln101 y qln102. Una posibilidad es que se trate de mutaciones estructurales en qlnA, que den lugar a una enzima capaz de utilizar más eficientemente al metilamonio como sustrato; esto implicaría que las actividades más altas observadas en las cepas portadoras de los alelos qln101 y qln102 no necesariamente se deben a una hiperinducción de qlnA. Sin embargo, la posibilidad de que fueran mutaciones estructurales no explica porqué las actividades en condiciones de exceso de nitrógeno no son

significativamente diferentes a las de la cepa silvestre. Actualmente nos encontramos en proceso de purificar la enzima de estas mutantes para confirmar o descartar esta posibilidad.

Otra posibilidad es que se trate de mutaciones regulatorias, que provoquen una activación mayor de la transcripción a partir de qlnAp2. Teóricamente, estas mutaciones podrían afectar a cualquiera de los elementos involucrados en la expresión a partir de este promotor:

a) mutaciones en el sitio de unión a NR₁, que provocaran una unión más eficiente de este al DNA, las cuales podrían localizarse en alguno de los dos sitios de unión fuerte, o en alguno de los tres sitios de unión débil (Hirschman et al., 1985; Reitzer y Magasanik, 1986).

b) mutaciones en el promotor qlnAp2, que generaran un mejor reconocimiento por parte de σ^{70} .

c) mutaciones en qlnG que dieran lugar a moléculas de NR₁ alteradas, capaces de unirse más fuertemente a los sitios principales o secundarios en la región de control de qlnA, o capaces de ser fosforiladas más eficientemente por NR₁.

Todas estas posibilidades darían el fenotipo observado: dominancia, expresión de qlnA dependiente de σ^{70} , y una mayor capacidad biosintética del análogo inhibidor GMAD bajo condiciones de limitación de nitrógeno.

El análogo de amonio, metilamonio, ha sido ampliamente utilizado en el estudio de los sistemas de transporte de amonio en diversos microorganismos procarióticos y eucarióticos (Brown, 1981; Kleiner, 1981; Kleiner, 1985). En este trabajo hemos explorado la posibilidad de utilizarlo con fines genéticos para el aislamiento de mutaciones relacionadas a la asimilación de nitrógeno. Para esto, hemos descrito un nuevo fenotipo para E. coli, el de sensibilidad y resistencia a este análogo.

El fenotipo de sensibilidad al metilamonio es relativamente complejo, ya que este compuesto no ejerce su acción directamente, sino que debe ser primero metabolizado; por lo tanto, la expresión del fenotipo de sensibilidad guarda una estrecha relación con la asimilación de amonio. El metabolismo del metilamonio es llevado a cabo por la GS y consiste en la síntesis del análogo de glutamina T-glutamilmetilamida (GMAD). Por lo tanto, el fenotipo de sensibilidad está sometido a la misma regulación a la que está sometida la síntesis de GS por el sistema Ntr.

Tenemos varias evidencias de que el verdadero inhibidor es el análogo GMAD. En primer lugar, las concentraciones de metilamonio requeridas para inhibir el crecimiento son elevadas; pensamos que estas reflejan la baja afinidad que tiene la GS por el metilamonio (Barnes et al., 1983), de manera que para que la GS pueda sintetizar concentraciones intracelulares inhibitorias de GMAD se requiere suministrar al metilamonio en cantidades suficientes para que pueda ser metabolizado. Concentraciones extracelulares tan altas no están limitadas por el sistema de transporte de amonio para entrar a la célula, ya que la permeabilidad de la membrana hacia este tipo de compuestos es elevada (Kleiner, 1985) y por simple difusión debe ser capaz de alcanzar niveles intracelulares suficientes para ser metabolizado. La K_m del sistema de transporte por metilamonio es de alrededor de

36 μM , por lo que se está usando un exceso de más de tres órdenes de magnitud por encima de la K_m . Adn con concentraciones no totalmente inhibitorias de metilamonio (por ejemplo 10 mM) este sistema estaría completamente saturado, lo que indica que el paso limitante para obtener sensibilidad no es la entrada del análogo a la célula, sino su transformación para la GS al verdadero inhibidor: GMAD.

La importancia del metabolismo del metilamonio para obtener la inhibición del crecimiento es evidenciada por la dependencia de niveles inducidos de GS, sin los cuales no hay sensibilidad hacia concentraciones extracelulares elevadas del análogo de amonio. El crecimiento de cepas incapaces de inducir sus niveles de GS, bajo condiciones de limitación de nitrógeno, por tener mutaciones regulatorias (glnL::Tn5 o glnG::Tn5) no es inhibido por las mismas concentraciones que provocan una inhibición total del crecimiento cuando la GS se puede inducir normalmente. Pudiera pensarse que este es un efecto de la mutación regulatoria independiente de GS; es decir que el blanco de la inhibición solamente fuera inducido en una cepa Ntr^+ . Sin embargo, las mutantes resistentes descritas en este trabajo son Ntr^- , y presentan como única alteración genética mutaciones estructurales no polares. Estas cepas están alteradas específicamente en la capacidad biosintética de la GS, y por lo tanto son incapaces de metabolizar al metilamonio y convertirlo a GMAD, como lo demuestra la casi nula acumulación de este análogo. Hemos presentado también evidencias de que cepas mutantes con niveles inducidos de actividad de GS en condiciones de limitación de nitrógeno, y que son superiores a los de una cepa silvestre, manifiestan hipersensibilidad hacia el metilamonio, lo que nuevamente refuerza el papel que juega esta enzima en el fenotipo de sensibilidad.

La síntesis de GS está regulada por el complejo sistema regulador Ntr . Por lo tanto existe una relación estrecha

entre éste y la sensibilidad al metilamónio. Podemos observar que todas las condiciones fisiológicas en las que se manifiesta la sensibilidad al metilamónio son condiciones de activación de la síntesis de GS, donde la transcripción proviene del promotor qlnAp2. Aquellas condiciones fisiológicas donde la transcripción procede de qlnAp1 no generan niveles suficientemente altos de GS como para alcanzar niveles inhibidores de GMAD. La única condición que hemos encontrado en que la GS está inducida y el metilamónio es inocuo es en presencia de concentraciones altas de glutamina como fuente de nitrógeno. Este efecto de la glutamina parece indicar que ésta es capaz de competir con el análogo sintetizado por la GS, aliviando así la inhibición. Esto puede ser interpretado, además, como evidencia de que el verdadero inhibidor es el análogo de glutamina, y no el metilamónio. Actualmente no sabemos a qué nivel actúa el inhibidor. Una posibilidad es que inhiba algún paso o varios pasos esenciales del metabolismo de glutamina. Este metabolismo es bastante complejo, ya que la glutamina actúa como donador de su grupo amido en muchas vías biosintéticas (Stadtman, 1973), por lo que resultaría demasiado especulativo el tratar de mencionar un solo paso metabólico como el blanco de la inhibición por GMAD. Otra posibilidad es que este análogo pudiera incorporarse a proteínas, como ha sido reportado para análogos de arginina (Celis, 1982) y de prolina (Ratzkin y Roth, 1978; Ratzkin et al., 1978). Sin embargo, ha sido reportado que el análogo GMAD no sufre aparentemente ningún metabolismo ulterior en varios procariotes que no pueden utilizar metilamónio como fuente de nitrógeno (Kleiner, 1982; Barnes et al., 1983). El único efecto fisiológico reportado para el análogo GMAD es el de inhibir al acarreador de amónio de A. vinelandii (Jayakumar y Barnes, 1984); otros análogos de glutamina son también capaces de inhibir al sistema de transporte de amónio de K. pneumoniae (Kleiner et al., 1983) y la misma glutamina

tiene un efecto inhibitor (Kleiner et al., 1984; Servin-González y Bastarrachea, 1984). Por lo tanto pudiera pensarse que la inhibición del crecimiento se debe a que al análogo GMAD acumulado inhibiera al acarreador de amonio. Surge la pregunta, entonces, de si el acarreador de amonio es esencial para el crecimiento de E. coli en condiciones de limitación de nitrógeno, al igual que para K. pneumoniae (Castorph y Kleiner, 1984). El hecho de que cepas glnG- de E. coli, incapaces de inducir la síntesis del acarreador de amonio, presenten un crecimiento relativamente bueno con concentraciones extracelulares bajas de amonio como única fuente de nitrógeno (en las que una mutante Am^r- de K. pneumoniae no crece) sugiere que este no es el caso. Esto pudiera reflejar el hecho de que E. coli es más eficiente que K. pneumoniae en la utilización de concentraciones bajas de amonio, por lo que pudiera no haber una dependencia tan estricta de la presencia del acarreador. Es evidente que se requiere de más experimentación para definir el mecanismo exacto de inhibición, si bien resulta aparente que la síntesis de GMAD por GS es requisito necesario.

Una de las posibilidades más interesantes del empleo de análogos es la de poder utilizarlos como herramientas para realizar estudios fisiológicos o genéticos. Creemos que, para el estudio de la asimilación de nitrógeno, el metilamonio puede resultar un candidato interesante. Por ejemplo, dado que la sensibilidad al metilamonio depende de los mismos factores de los que depende la asimilación (la disponibilidad de esqueletos de carbono, la disponibilidad de nitrógeno y la actividad biosintética de GS) es posible que se pudiera utilizar el fenotipo de sensibilidad para conocer el grado de limitación al que se encuentra sometida una cepa. Creemos que entre más severa sea la limitación, mayor será la sensibilidad, ya que habrá una GS más activa, menos amonio y por ende menos glutamina intracelular.

Este trabajo demuestra que se puede utilizar el fenotipo de sensibilidad con fines genéticos: nos ha permitido el aislamiento de cepas con mutaciones ya sea estructurales o regulatorias. Además, el tipo de mutaciones que pueden ser aisladas depende de una de las características particulares del fenotipo: su dependencia de la disponibilidad de nitrógeno. Es interesante hacer una comparación con otro análogo de glutamina que ha sido también utilizado con fines genéticos y que también inhibe el crecimiento dependiendo de la disponibilidad de nitrógeno: la metionina sulfoximina (MS). Este análogo de glutamina es capaz de inhibir irreversiblemente a la GS y ha sido utilizado para aislar cepas mutantes resistentes las cuales poseen una GS alterada, la cual es ahora insensible a la acción inhibitoria del análogo como consecuencia de mutaciones estructurales (Miller y Brenchley, 1981). La sensibilidad al metilamonio y la sensibilidad a la MS se presentan en condiciones opuestas de disponibilidad de nitrógeno. Mientras que el fenotipo de sensibilidad al metilamonio se manifiesta en condiciones de limitación, cuando la GS se encuentra inducida, la MS en estas condiciones es bastante menos eficiente como inhibidor que en condiciones de exceso, ya que aparentemente tiene que titular una mayor cantidad de moléculas de GS (Osorio et al., 1984). Como consecuencia de lo anterior, cepas glnG⁻ que sintetizan niveles anormalmente bajos de GS manifiestan hipersensibilidad a la MS, lo que ha permitido el aislamiento de mutaciones regulatorias en el promotor glnAp1 (Osorio et al., 1984; León et al., 1985). Nuevamente esto es en contraposición al fenotipo de sensibilidad al metilamonio, para el cual cepas glnG⁻ con niveles bajos constitutivos de GS son resistentes, y para el cual la hipersensibilidad se obtiene por niveles de GS superiores a los normales en condiciones de limitación, y que muy probablemente afecten al promotor glnAp2.

Una de las razones por las que hemos estudiado el fenotipo de sensibilidad y resistencia al metilamonio en E. coli es con el objeto de investigar si pudiera emplearse este análogo para aislar mutaciones estructurales en el sistema de transporte de amonio. Originalmente pensamos que este aislamiento debería ser bastante directo: si hay sensibilidad hacia el metilamonio, basta buscar mutantes resistentes, las cuales deben estar afectadas en el transporte. Desde los primeros experimentos, nos dimos cuenta que la sensibilidad era un fenotipo más complejo de lo que este planteamiento inicial, relativamente simple, implicaba. Por lo tanto, decidimos primeramente estudiar el fenotipo de sensibilidad como tal. Surge ahora la pregunta de si contamos ya con las bases para diseñar un método de selección de mutantes afectadas en el sistema de transporte de amonio con lo que sabemos de la sensibilidad al metilamonio. Creemos que sería necesario encontrar aquellas condiciones donde el crecimiento sea inhibido por concentraciones sumamente bajas de metilamonio, que fueran dependientes del sistema de transporte para entrar a la célula. El hecho de haber encontrado que en ciertas condiciones de crecimiento (por ejemplo con prolina como fuente de nitrógeno) existe mayor hipersensibilidad, aunado al hecho de que esta hipersensibilidad también puede ser alcanzada por alteraciones genéticas nos hace pensar que, si se dirigen esfuerzos específicos hacia tal fin, se podría diseñar un método para el aislamiento de mutaciones estructurales que afecten al transporte de amonio.

REFERENCIAS.

(Únicamente aquellas no incluidas en el artículo).

- Ames, G.F.L., Nikaido, K. (1985). Nitrogen regulation in Salmonella typhimurium. Identification of an ntrC protein-binding site and definition of a consensus binding sequence. The EMBO Journal 4, 539-547.
- Bellion, E., Alikhan, M.Y., Romano, M.J. (1980). Transport of methylamine by Pseudomonas sp. MA. J. Bacteriol. 142, 786-790.
- Bellion, E., Wayland, L. (1982). Methylamine uptake in Pseudomonas species strain MA: utilization of methylamine as the sole nitrogen source. J. Bacteriol. 149, 395-398.
- Bellion, E., Kent, M.E., Aud, J.C., Alikhan, M.Y., Bolbot, J.A. (1983). Uptake of methylamine and methanol by Pseudomonas sp. strain AM1. J. Bacteriol. 154, 1168-1173.
- Boussiba, S., Dilling, W., Gibson, J. (1984). Methylammonium transport in Anacyctis nidulans R-2. J. Bacteriol. 160, 204-210.
- Buck, M., Miller, S., Drummond, M., Dixon, R. (1986). Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. Nature 320, 374-378.
- Bueno, R., Pahel, G., Magasanik, B. (1985). Role of glnB and glnQ gene products in regulation of the glnALG operon in Escherichia coli. J. Bacteriol. 164, 816-822.
- Castaño, I., Bastarrachea, F. (1984). glnF-lacZ fusions in Escherichia coli: studies on glnF expression and its chromosomal orientation. Mol. Gen. Genet. 195, 228-233.
- Castorph, H., Kleiner, D. (1984). Some properties of a Klebsiella pneumoniae ammonium transport negative mutant (Amt⁻). Arch. Microbiol. 139, 245-247.
- Cellis, R.T.F. (1982). Mapping of two loci affecting the synthesis and structure of a periplasmic protein involved in arginine and ornithine transport in Escherichia coli K-12. J. Bacteriol. 151, 1314-1319.
- Colby, J., Dalton, H., Whittenbury, R. (1979). Biological and biochemical aspects of microbial growth on C₁ compounds. Ann. Rev. Microbiol. 33, 481-517.
- Dendinger, S., Brill, W.J. (1970). Regulation of proline degradation in Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 103, 144-152.

- Dilworth, M.J., Glenn, A.R. (1982). Movements of ammonia in Rhizobium leguminosarum. J. Gen. Microbiol. 128, 29-37.
- Gober, J.W., Kashket, E.R. (1983). Methylammonium uptake by Rhizobium sp. strain 32H1. J. Bacteriol. 153, 1196-1201.
- Hartmann, A., Kleiner, D. (1982). Ammonium (methylammonium) transport by Azospirillum spp. FEMS Microbiol. Lett. 15:65-67.
- Hirschman, J., Wong, P.-K., Sei, K., Keener, J., Kustu, S. Products of nitrogen regulatory genes ntrA and ntrC of enteric bacteria activate glnA transcription in vitro: Evidence that the ntrA product is a σ factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 7525-7529.
- Hunt, T.P., Magasanik, B. (1985). Transcription of glnA by purified Escherichia coli components: Core RNA polymerase and the products of glnE, glnG, and glnL. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 8453-8457.
- Jayakumar, A., Barnes, E.M., Jr. (1983). A filtration method for measuring cellular uptake of [14 C]methylamine and other highly permeant solutes. Anal. Biochem. 135, 475-478.
- Jayakumar, A., Barnes, E.M., Jr. (1984). The role of glutamine in regulation of ammonium transport in Azotobacter vinelandii. Arch. Biochem. Biophys. 231, 95-101.
- Kashyap, A.K., Johar, G. (1984). Genetic control of ammonium transport in nitrogen fixing cyanobacterium Nostoc muscorum. Mol. Gen. Genet. 197, 509-512.
- Kleiner, D. (1982). Ammonium (methylammonium) transport by Klebsiella pneumoniae. Biochim. biophys. acta 688, 702-708.
- Kleiner, D., Castorph, H. (1982). Inhibition of ammonium (methylammonium) transport in Klebsiella pneumoniae by glutamine and glutamine analogues. FEMS Lett. 146, 201-203.
- Kleiner, D., Alef, K., Hartmann, A. (1983). Uptake of methionine sulfoximine by some N_2 fixing bacteria, and its effect on ammonium transport. FEMS Lett. 164, 121-123.
- León, P., Romero, D., Garcíarrubio, A., Bastarrachea, F., Covarrubias, A.A. (1985). Glutamine synthetase-constitutive mutation affecting the glnALG upstream promoter of Escherichia coli. J. Bacteriol. 164, 1032-1038.
- Mazzucco, C.E., Benson, D.R. (1984). 14 C-Methylammonium transport by Frankia sp. strain Cp11. J. Bacteriol. 160, 636-641.

- MacFarlane, S.A., Merrick, M. (1985). The nucleotide sequence of the nitrogen regulation gene ntrB and the glnA-ntrBC intergenic region of Klebsiella pneumoniae. Nucleic Acids Res. 13, 7591-7606.
- McCarter, L., Krajewska-Grynkiewicz, K., Trinh, D., Wei, G., Kustu, S. (1984). Characterization of mutations that lie in the promoter-regulatory region for glnA, the structural gene encoding glutamine synthetase. Mol. Gen. Genet. 197, 150-160.
- Merrick, M.J., Gibbins, J.R. (1985). The nucleotide sequence of the nitrogen-regulation gene ntrA and comparison with conserved features in bacterial RNA polymerase sigma factors Nucleic Acids Res. 13, 7607-7620.
- Miller, E.S., Brenchley, J.E. (1981). L-methionine SR-sulfoximine resistant glutamine synthetase from mutants of Salmonella typhimurium. J. Biol. Chem. 256, 11307-11312.
- Ninfa, A.J., Magasanik, B. (1986). Covalent modification of the glnG product, NR₁, by the glnI product, NR₂, regulates the transcription of the glnALG operon in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 5909-5913.
- Ratzkin, B., Grabnar, M., Roth, J. (1978). Regulation of the major proline permease gene of Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 133, 737-743.
- Ratzkin, B., Roth, J. (1978). Cluster of genes controlling proline degradation in Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 133, 744-754.
- Reitzer, L.J., Magasanik, B. (1983). Isolation of the nitrogen assimilation regulator NR₁, the product of the glnG gene of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 5554-5558.
- Reitzer, L.J., Magasanik, B. (1985). Expression of glnA is regulated at tandem promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 1979-1983.
- Reitzer, L.J., Magasanik, B. (1984). Transcription of glnA in E. coli is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. Cell 45, 785-792.
- Rocha, M., Vázquez, M., Garcíarrubio, A., Covarrubias, A. (1985). Nucleotide sequence of the glnA-glnI intergenic region of Escherichia coli. Gene 37, 91-99.

Shaibe, E., Metzger, E., Halpern, Y.S. (1985). Metabolic pathway for the utilization of L-arginine, L-ornithine and putrescine as nitrogen sources in Escherichia coli. J. Bacteriol. 163, 933-937.

Stadtman, E.R., (1973). Introduction: a note on the significance of glutamine in intermediary metabolism. En: The Enzymes of Glutamine Metabolism. Prusiner, S., Stadtman, E.R. (eds.) New York: Academic Press.

Strenkoski, L.F., DeCicco, B.T. (1971). pH-conditional, ammonia assimilation-deficient mutants of Hydrogenomonas eutropha: evidence for the nature of the mutation. J. Bacteriol. 105, 296-302.

Ueno-Nishio, S., Mango, S., Reizer, L.J., Magasanik, B. (1984). Identification and regulation of the glnL operator-promoter of the complex glnALG operon of Escherichia coli. J. Bacteriol. 160, 379-384.

Wiegel, J., Kleiner, D. (1982). Survey of ammonium (methyl-ammonium) transport by aerobic N_2 -fixing bacteria--the special case of Rhizobium. FEMS Microbiol. Lett. 15, 61-63.

Wood, J.M. (1981). Genetics of L-proline utilization in Escherichia coli. J. Bacteriol. 146, 895-901.

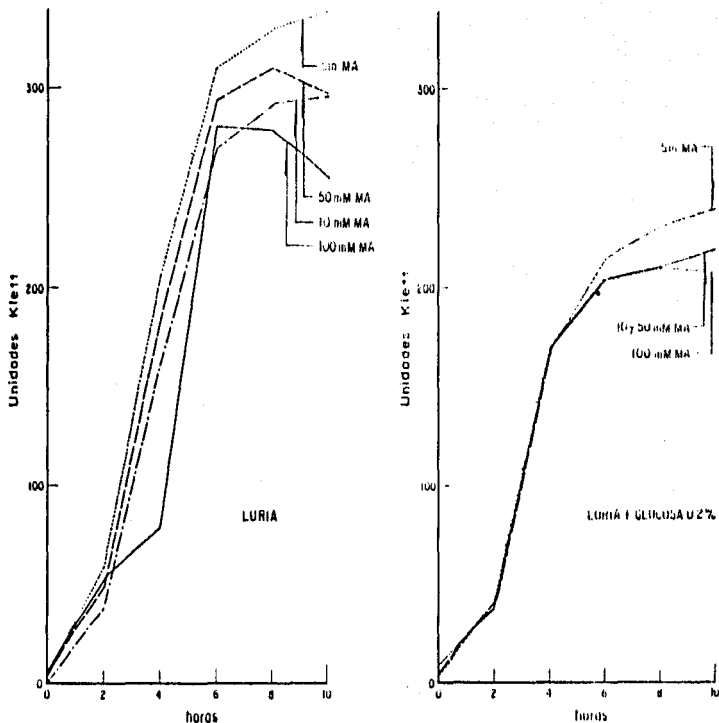


Fig 1 Curvas de crecimiento de la cepa MX614 en medio rico con diferentes concentraciones de metilamino (MA)

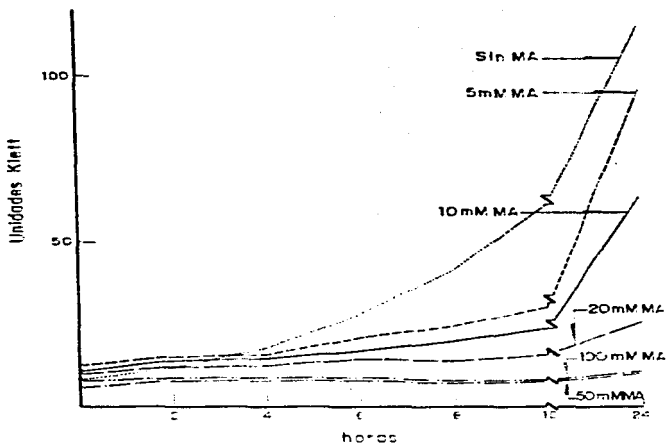


Fig 2 Curvas de crecimiento de la cepa MX614 en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono y arginina como fuente de nitrógeno; y además con diferentes concentraciones de metilammonio (MA)

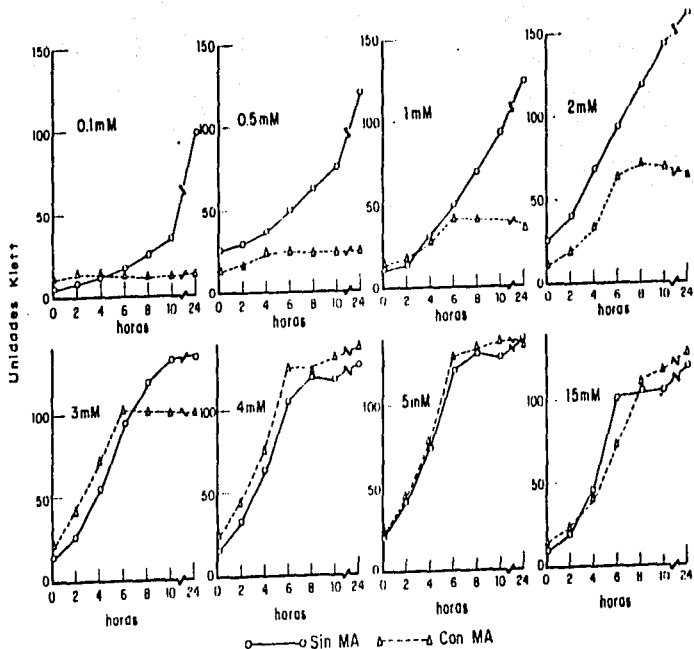


Fig 3 Curvas de crecimiento de la cepa MX614 en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono, con diferentes concentraciones de amonio y 100 mM de metilamnio (MA)

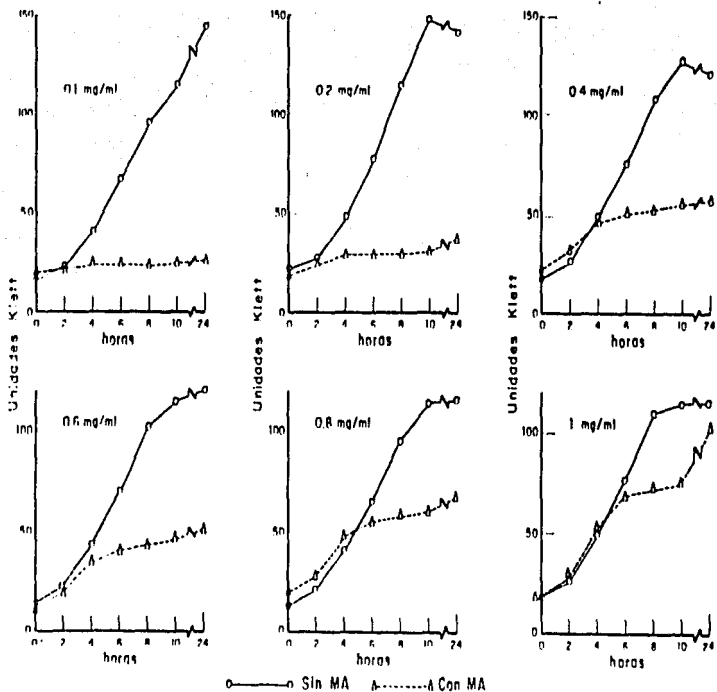


Fig. 4 Curvas de crecimiento de la cepa MX614 en medio mínimo con diferentes concentraciones de glutamina y 100 mM de metionina (MA)

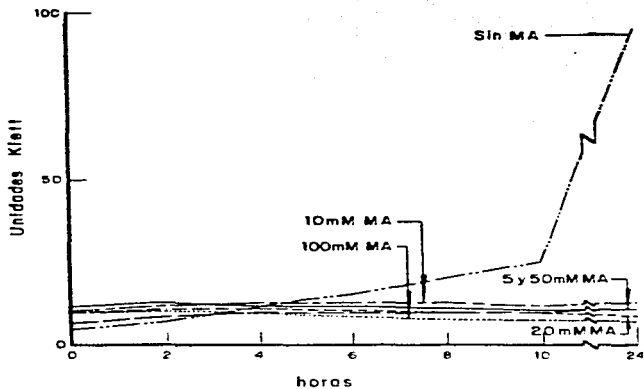


Fig 5 Curvas de crecimiento de la cepa MX614 en medio mínimo con prolina como fuente de nitrógeno y diferentes concentraciones de metilamonio (MA)

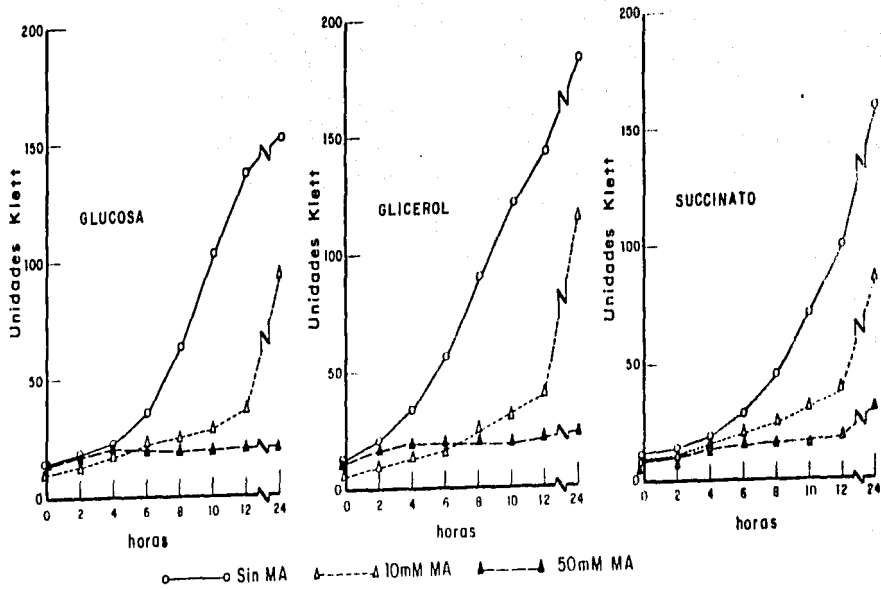


Fig 6 Curvas de crecimiento de la cepa MX614 en medio mínimo con arginina como fuente de nitrógeno y diferentes concentraciones de metilamonio (MA)

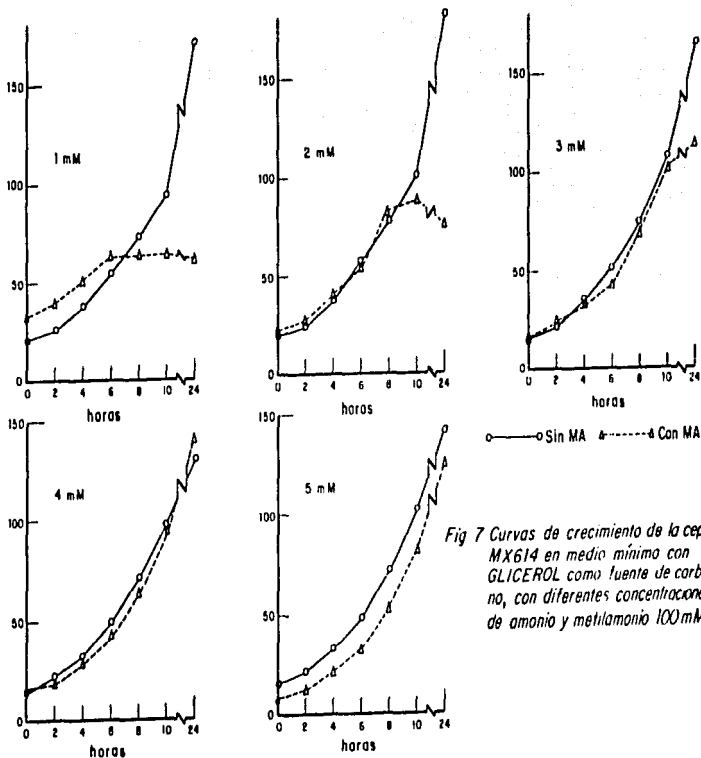
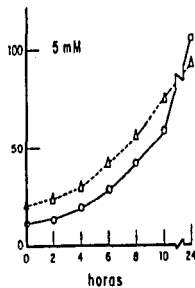
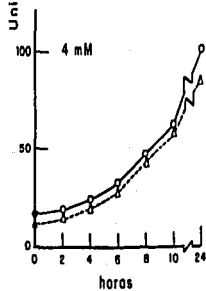
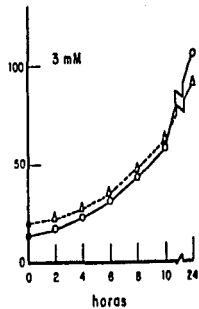
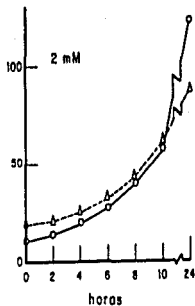
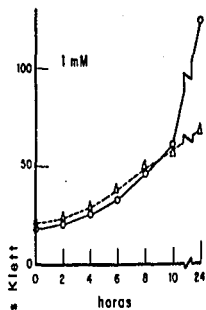
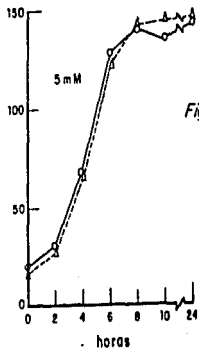
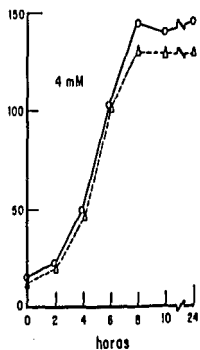
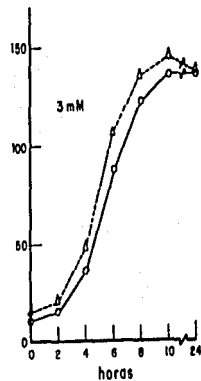
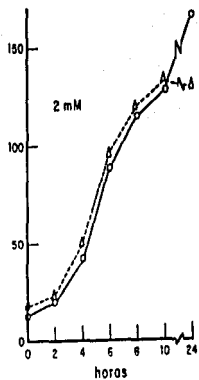
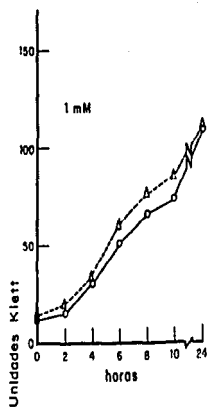


Fig 7 Curvas de crecimiento de la cepa MX614 en medio mínimo con GLICEROL como fuente de carbono, con diferentes concentraciones de amonio y metilamonio 100mM



○—○ Sin MA △-----△ Con MA

Fig 8 Curvas de crecimiento de la cepa MX614 en medio mínimo con SUCCINATO como fuente de carbono, con diferentes concentraciones de amonio y metilamonio 100 mM



○—○ Sin MA △—△ Con MA

Fig 9 Curvas de crecimiento de la cepa MX902 en medio mínimo con diferentes concentraciones de amonio y metilammonio 100 mM

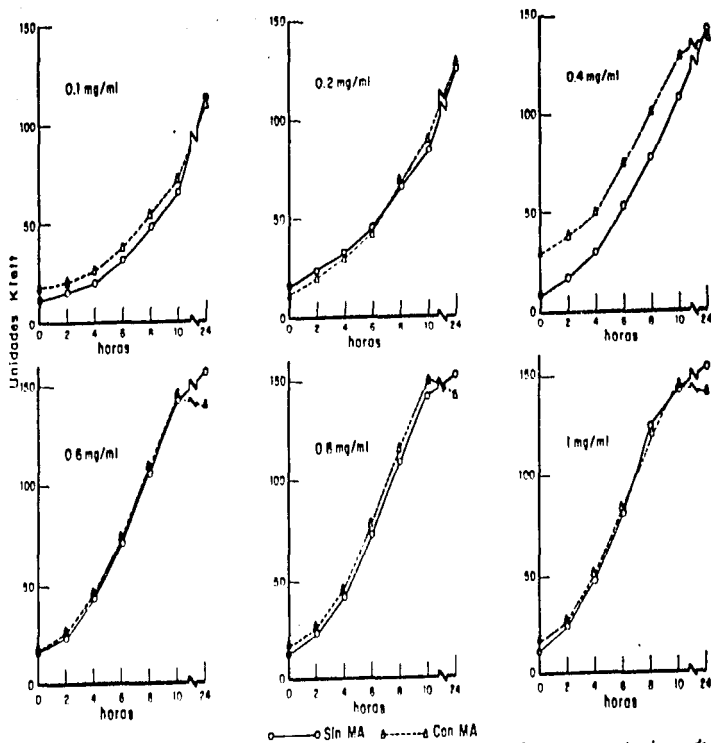


Fig 10 Curvas de crecimiento de la cepa MX902 en medio mínimo con diferentes concentraciones de glutamina y metilamina 100 mM

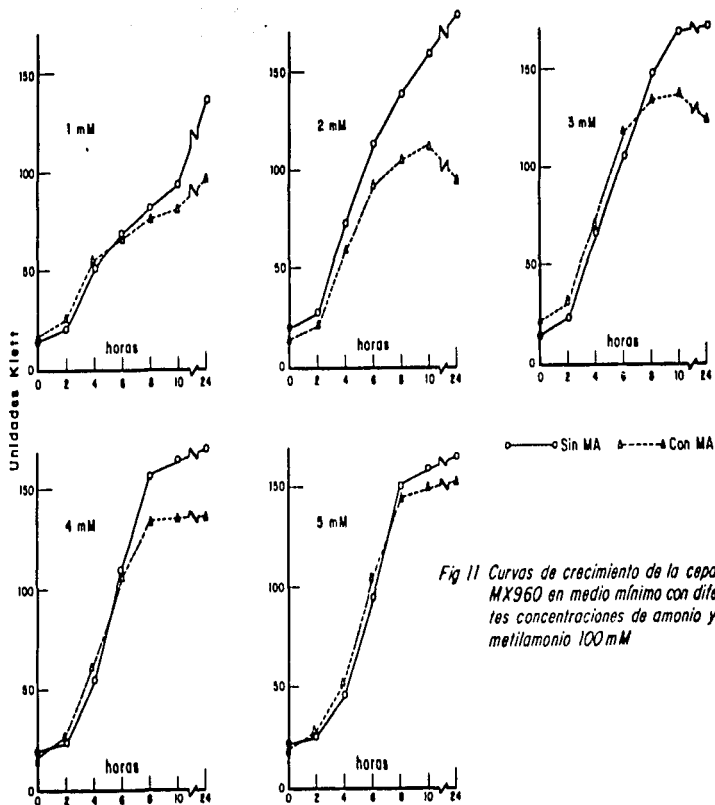


Fig 11 Curvas de crecimiento de la cepa MX960 en medio mínimo con diferentes concentraciones de amonio y metilamonio 100 mM

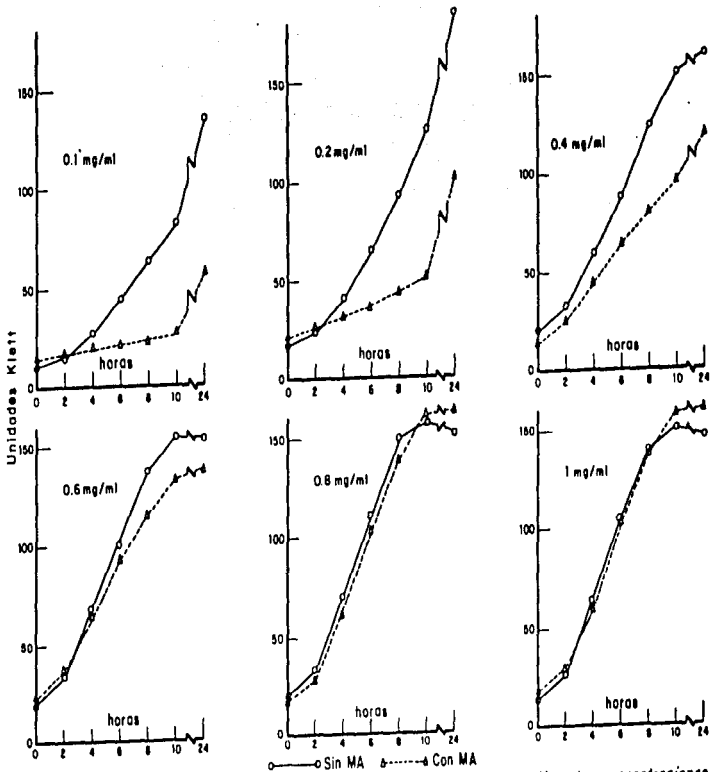


Fig 12 Curvas de crecimiento de la cepa MX960 en medio mínimo con diferentes concentraciones de glutamina y metilammonio 100 mM

CRECIMIENTO EN LB
(CEFA SILVESTRE MX614)



MUTAGENESIS CON
ETILMETANO SULFONATO
(Según Miller, 1972)



RECUPERACION EN LB
Y LAVADO DE CELULAS



DILUCION Y CRECIMIENTO
EN MEDIO MINIMO (GLUCOSA-ARGININA)
+ METILAMONIO 10mM HASTA FASE
EXPONENCIAL TEMPRANA

2600 U/ml DE
PENICILINA G



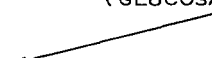
LISIS DE CELULAS
NO HIPERSENSIBLES



(1)

LAVADO DE CELULAS Y
RECUPERACION
EN MEDIO MINIMO
(GLUCOSA-ARGININA)

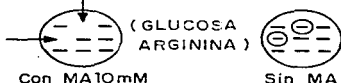
(2)



DILUCION Y PLAQUEO
(CAJAS CON EL MISMO MEDIO)



IDENTIFICACION DE HIPERSENSIBLES
Y PURIFICACION



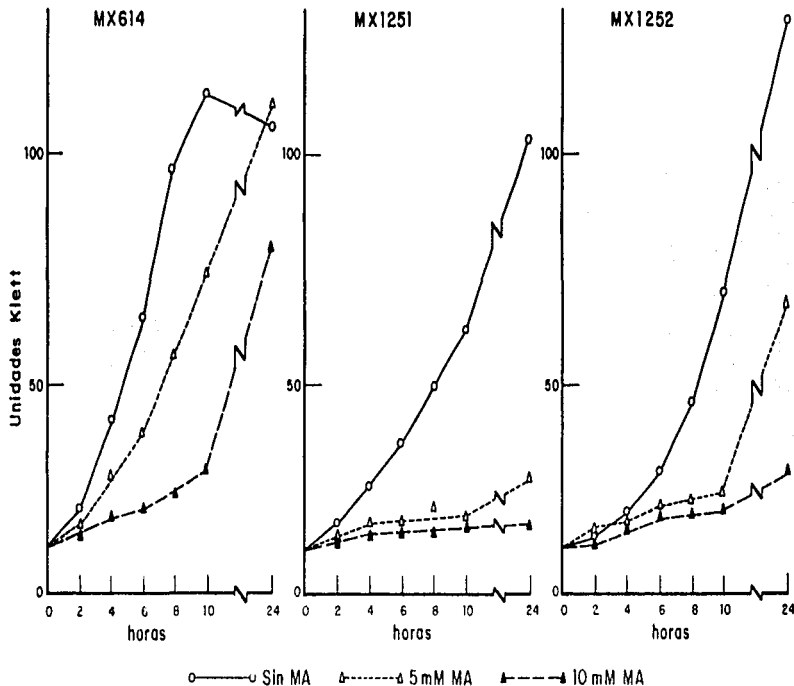


Fig 14 Curva de crecimiento en medio mínimo con arginina como fuente de nitrógeno

TABLE 1.

Actividad específica de glutamina sintetasa de la cepa H3614.
(nanomoles de γ -glutamylhidroxamato/min/mg proteína)

Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno								Arginina 0.2%
	NH ₄ Cl (mM)								
	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	15.0	
Glucosa 0.2%	920	950	1 080	550	370	250	130	110	880
Glicerol 0.2%	n.d.	n.d.	1 360	1 130	100	130	110	n.d.	740
Succinato 0.2%	n.d.	n.d.	1 420	260	100	120	40	n.d.	910

n.d.: no determinado

Tabla 2.

Actividad específica de glutamina sintetasa de las cepas
MX614, MX902 y MX960, con diferentes concentraciones de glutamina
como fuente de nitrógeno.

(nanomoles de γ -glutamihidroxamato/min/mg de proteína)

Cepa	Concentración de glutamina en el medio (mg/ml)					
	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
MX614 (<u>glnALG</u> ⁺)	1 070	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	940
MX902 (<u>glnG::Tn5</u>)	40	50	40	40	40	40
MX960 (<u>glnL::Tn5</u>)	1 580	910	750	440	310	330

n.d.: no determinado

Tabla 3

Actividad específica de las cepas MX614, MX902 y
MX960, con diferentes concentraciones de NH_4Cl como fuente de nitrógeno.
(nanomoles de γ -glutamylhidroxamato/min/mg proteína)

Cepa	Concentración de NH_4Cl en el medio (M)				
	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
MX614 (γNHAI_6^+)	1 080	550	390	250	130
MX902 ($\gamma\text{NHG}::\text{Tn5}$)	20	50	40	50	50
MX960	500	330	190	130	100

Tabla 4.

Actividades específicas de glutamina sintetasa de las cepas MX614 (glnALG⁻), MX1251 (gln101) y MX1252 (gln102).

Cepa	Alelo	Glucosa-NH ₃ 15 mM	Glucosa-NH ₃ 0.5 mM	Glucosa-Arginina
MX614	<u>glnALG⁻</u>	140 (100%)	1 080 (100%)	700 (100%)
MX1251	<u>gln101</u>	200 (143%)	2 410 (223%)	2 200 (314%)
MX1251	<u>gln102</u>	130 (93%)	2 120 (196%)	2 420 (346%)

Actividad específica de L-glutamyltransferasa (nanomoles/min/mg proteína)

Tabla 5.

Complementación de cepas silvestres y mutantes con derivados del plásmido F'14 llevando la región glnALG silvestre o con las mutaciones gln101 y gln102

Episoma	Cromosoma			
	MX881	MX944	MX961	MX913
	<u>glnALG⁻</u>	<u>glnA71::Tn5</u>	<u>gln102::Tn5</u>	<u>gln674::Tn5</u>
F'14 <u>glnALG⁻</u>	+	+	-	-
F'14 <u>gln101</u>	-	-	-	-
F'14 <u>gln102</u>	+/-	-	-	-

+ = crecimiento en presencia de metilamonio 10 mM en medio mínimo con arginina como fuente de nitrógeno.

- = crecimiento inhibido por metilamonio 10 mM en el mismo medio.

+/- = crecimiento inhibido solamente de manera parcial.

cis-dominant, glutamine synthetase constitutive mutations of *Escherichia coli* independent of activation by the *glnG* and *glnF* products

Aurora V. Osorio, Luis Servín-González, Mario Rocha*, Alejandra A. Covarrubias*, and Fernando Bastarrachea
 Centro de Investigación Nacional Autónoma de Biocientología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado P.O. 30-225, 04510 México 20, D.F., México

Summary. Mutants resistant to 0.1 μ M methionine in sulfonamide (MS) were isolated on glucose minimal 15 mM NH_4^+ medium plates from *Escherichia coli* cells which were hypersensitive to this concentration of the analogue by virtue of their harboring *glnG* mutations. MS-resistant mutants derived from strain MN902 carried, in addition to its *glnG*⁷⁴ Tn3 allele, mutations tightly linked to *glnA*, as shown by PI-mediated transduction experiments. One particular allele, *gln*⁷⁶, which suppressed the MS-sensitivity conferred by *glnG*⁷⁴ Tn3 but not its Ntr⁻ phenotype (inability to transport and utilize compounds such as arginine or proline as the only nitrogen source), was shown to allow constitutive expression of glutamine synthetase in the absence not only of functional *glnG* product but also of a functional *glnF* product. This behavior was found to be *cis*-dominant in complementation experiments with F⁺14 merogenotes. In an otherwise wild type genetic background as in MN929 (*gln*⁷⁶ *glnF*⁺ *glnG*⁺ *glnA*⁺), however, normal activation, mediated by the *glnG* and *glnF* products was preferred over that mediated by *gln*⁷⁶.

Introduction

Glutamine synthetase (L-glutamate, ammonia lyase (ADP-forming), EC 6.3.2) is one of several proteins of enteric bacteria whose synthesis is regulated by the availability of nitrogen in the growth medium (Woodfolk et al. 1966). Under nitrogen limitation, as in the presence of glutamine, glutamate, arginine, proline or low concentrations of ammonium ions as the only nitrogen sources, glutamine synthetase is depressed. The addition of high ammonium ion concentrations to the medium causes repression by about 10 to 20-fold. Experimental evidence obtained in different laboratories indicates that the products of several genes, *glnF*, *glnL*, *glnG*, and *glnH*, appear to mediate regulation of *glnA*, the structural gene for the glutamine synthetase monomer, presumably at the transcription level (Rothstein et al. 1980; Pabel et al. 1982; Goldie and Magasanik 1982; Guterman et al. 1982). These genes also regulate the expression of other operons or genes whose products are involved in the transport and utilization of a number of organic nitrogenous compounds such as histidine, arginine or pro-

line, the previously named Reg phenotype (Pabel et al. 1982; Guterman et al. 1982; MacNeil et al. 1983), later renamed the Ntr⁻ phenotype (Magasanik 1982). *glnF* mutations first discovered in *Salmonella typhimurium* by Carotta et al. (1977), are located at min 86 on the *Escherichia coli* map (Hachmann and Low 1980). Cells carrying a mutant *glnF* are glutamine requirees, e.g. they synthesize glutamine synthetase in amounts even lower than those found under extreme repressing conditions. *glnF* mutants revert to the *gln*⁺ phenotype at frequencies of about 10⁻⁵. Most of the revertants carry, in addition to the original *glnF* mutation, secondary mutations in a gene closely linked to *glnA* named *glnG* in *E. coli* (Pabel and Isler 1979), and *glnH* in *S. typhimurium* (Koski et al. 1979a). As already mentioned, *glnG* mutants are Gln⁺. They synthesize low constitutive levels of glutamine synthetase and are also Ntr⁻ in either a *glnF*⁺ or *glnF*⁻ background. Recent evidence (McFarland et al. 1981) indicates that *glnG* or *glnH* is not one but two genes. The relative orientation of these genes in the *E. coli* chromosome is *glnA* *glnG* *glnF* *glnH*. The direction of transcription of the three genes occurs in the same counter-clockwise direction (Hachmann et al. 1981; Pabel et al. 1982).

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

Since the frameshift mutations of McFarland et al. (1981) in either *glnF* or *glnG* affected only the expression of the protein product but not that of the other, and since we know that frameshift mutations are highly polar, it is probable that *glnF* and *glnG* belong to different transcriptional units. In accordance with these observations, Backman et al. (1981) have described a deletion within *glnF* which is nonpolar to *glnA* in a plasmid containing the whole *glnA* region. Nevertheless, *glnF* mutations polar to *glnG* have also been isolated by G. Pabel (quoted in Chen et al. 1982). According to Pabel et al. (1982) *glnA* and *glnG* are expressed under nitrogen-limiting growth conditions in a single transcriptional unit, thus the three genes, *glnA*, *glnF*, and *glnG* seem to constitute an operon. Most of the evidence in support of the operon model comes from studies on *Reg* galactosidase expression of *MutD* (*gln*) insertions in *glnA*, *glnF*, or *glnG* (Rothstein et al. 1980; Guterman et al.

* Present requests to F. Bastarrachea

Offprint address: Centro de Investigación sobre Epistasia de Nitrógeno Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 563-A Cuernavaca, Mor., México

1982; Pabel et al. 1982) and from suppression of the Ntr phenotype of *glnA* point mutants by *gln* mutations (Cruickshank et al. 1982).

The presence of a promoter starting transcription from *glnA*, and being negatively controlled by the *glnE* product has been suggested (Pabel et al. 1982; Chen et al. 1982). Evidence is also available for the presence of a functional promoter transcribing only the *glnE* gene (Cruickshank et al. in preparation). Indeed, if expression of these genes is achieved by a series of overlapping mRNA transcripts depending upon the equality and the quantity of the nitrogen source available for growth it will be as expected. This is in agreement with observations indicating that some expression of *glnE* takes place in strains in which *glnA* (Pabel and Tyler 1979; Pabel et al. 1982; Goldie and Magasanik 1982) or *glnE* (Cruickshank and Baxtarrachae, unpublished data) have been mutated by insertion.

We have characterized a number of *glnE* mutants and have found, in addition to their low level constitutivity for glutamine synthesis and their Ntr⁻ phenotypes, that they are also hypersensitive to the glutamine analogue 1-methionine-sulfoximine (MS). We have used MS-resistance as a selection marker for wild-type recombinants in crosses involving *glnE* mutations, as well as for complementation experiments with E.14 merodiploids. Selection for MS-resistant revertants of the *glnE*74⁻ Tn5 allele led to the isolation of *crdA* and *crdB* mutations tightly linked to *glnE*, which allowed constitutive synthesis of glutamine synthetase (inde pendently of *glnE* or *glnE* products) under otherwise ammonium-repressing conditions. Our results indicate that *glnE*76 may be in the control region of the *glnE* transcriptional unit making it independent of activator and poorly repressible, but still by the normal regulatory effectors within the general framework of the McClureland et al. (1981) model.

Materials and Methods

Bacterial Strains. All strains were derivatives of *E. coli* K12 and are listed in Table 1.

Culture Media. The NS minimal and the complex Luria media used have been described (Covarrubias et al. 1980). Additions to minimal medium in final concentrations were as follows: G, 0.2% glucose, LA and HA, 0.5 mM and 15 mM ammonium chloride, respectively; gln, 1-glutamine (1 mg/ml). The utilization of 0.2% L-arginine as the only nitrogen source (Aut⁺) was used as an indicator of the Ntr phenotype. Other supplements of minimal medium to satisfy nutritional requirements were added at predetermined optimal concentrations ranging from 5 × 10⁻⁵ M to 2 × 10⁻³ M. Glutamine auxotrophs were maintained in slants of Luria medium supplemented with 1-glutamine (1 mg/ml). Merodiploid strains were maintained on slants of minimal medium without isoleucine and valine.

Isolation of Mutants. Tn5 insertions were isolated following infection of MN615 (Table 1) with λ Kan2 (Berg et al. 1978). Pl⁺ lysates were then prepared from pooled samples of a large number of Kanamycin resistant (Kan^r) individual colonies. Following transduction of MN727 (*glnE*74⁻ Tn5) selection was made for Gln⁻ [Km^r Aut⁻] colonies which turned out to carry Tn5 insertions into either *glnE* or *glnI*.

Genetic Procedures. Preparation of Pl⁺ lysates and the protocol for transductions were according to Miller (1972). Merodiploid strains were constructed by transfer of E.14 merodiploids from AB1206 or its derivatives, to appropriate recipients and selection for Dn⁺ complementation. Since E.14 merodiploids constructed in a *trcA16* background were highly unstable, all our recipients were *trcA*⁻. Their merodiploid status was verified by using wild activity orange (Baxtarrachae and Wollets 1969). The *glnE* genotype was recognized by its sensitivity to methylmethanesulfoxide (de Luca and Cairns 1990) and the Tn5 transposon by its resistance to Kanamycin at 30 mg/ml. Carriers of MN927 (*glnE*74⁻ Tn5) from its transposon was achieved by selection of Aut⁺ [Km^r] spontaneous revertants.

Glutamine Synthetase Assay. The γ -glutamyl transferase assay used, that preparation of cell-free extracts and the determination of the average state of adenylation, were as previously reported (Covarrubias et al. 1980). Specific activities are given as nanomoles [glutamy] hydroxamate formed per min per mg protein at 37°C. Protein was determined by the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as a standard. The screening of individual colonies for high constitutive level synthesis was carried out using the qualitative assay described by Pabel et al. (1978).

Southern Hybridizations. Southern hybridizations were carried out using purified DNAs (Bellach et al. 1976) from plasmid phages pAC12 and pAC10. pAC12 carries an *E. coli* DNA chromosomal fragment of approximately 10.8 kb that contains the *glnE*, *glnI* and *glnG* genes (Orr 1980). pAC10 is pHF322 carrying a 1.85 insertion of unknown location. Chromosomal DNA from strains MN615 and MN902 was purified (Marum 1961) and digested to completion with endonucleases BamHI and PstI. The digested mixtures were subjected to agarose gel electrophoresis and the DNAs transferred to nitrocellulose paper (Schleicher and Schuel BMS) or hybridized against nick-translated pAC12 or pAC10 DNAs as described by Southern (1975).

Reagents. All amino acids and vitamins as well as the 1-methionine-sulfoximine were from Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo., USA. The restriction endonucleases were purified by the procedure of Greene et al. (1978). The plasmid DNAs used as probes were labeled using a nick translation kit (code BPS100) from Amersham International, Bucks, England. All other reagents and media used were of analytical grade.

Genetic Nomenclature. In as much as the gene designations *glnE*, *glnI*, and *glnG* have been used extensively in *E. coli* (see for instance Chen et al. 1982; MacNeil et al. 1982) they are preferred here over *ntrA*, *ntrB* and *ntrC*, their counterparts in *S. typhimurium* (McClelland et al. 1981). All other genotypic symbols are those recommended by Bachmann and Low (1980). The genotypic designation *ntrE*, for the mutation associated with the MS resistance of strain MN901 (Table 1) is retained. Alleles *glnE*74 and *glnE*74⁻ Tn5 are those previously known as *glnE*420 and *glnE*421⁻ Tn5 (Covarrubias et al. 1980; Baxtarrachae et al. 1980; MacNeil 1981; Pabel et al. 1982), respectively.

Table 1. Bacterial strains

Strain	Genotype	Source or derivation
MX614	<i>Apr-pro-lac</i> <i>galE</i> <i>thi-680 thi-1</i>	Bastarrachea et al. (1980)
MX615	<i>Apr-pro-lac</i> <i>Algal attC</i> <i>hvs</i> <i>thi-680 thi-1</i>	Bastarrachea et al. (1980)
MX705	<i>luc</i> <i>ara</i> <i>pro-42 lac</i> <i>3'1 sup</i> <i>44 galK2 his-4 rpsL8</i>	Costrabubias et al. (1980)
MX727	<i>Apr-pro-lac</i> <i>Algal attC</i> <i>hvs</i> <i>thi-680 glnA71</i> <i>Tn5 thi-1</i>	Bastarrachea et al. (1980)
MX734	<i>Apr-pro-lac</i> <i>galE</i> <i>thi-680 glnA71</i> <i>Tn5 thi-1</i>	P1 (MX727) × MX614, Km ^r [Gln ⁻] selection
MX752	<i>Apr-pro-lac</i> <i>Algal attC</i> <i>hvs</i> <i>supE</i> <i>thi-680 zih</i> <i>Tn5</i> <i>Tn5 thi-1 lamB</i>	Bastarrachea et al. (1980)
AB1206	<i>pro-42 thr-3 lac</i> <i>3'1 sup</i> <i>44 galK2 his-4 rpsL8</i> <i>ΔDE</i> <i>24th E-arg</i> <i>His</i> <i>thi-1</i> <i>14</i>	B. Bachmann
MX816	<i>pro-42 thr-3 lac</i> <i>3'1 sup</i> <i>44 galK2 his-4 rpsL8</i> <i>ΔDE</i> <i>24th E-arg</i> <i>His</i> <i>thi-1</i> <i>14</i> <i>thi</i>	[His] methanephthalone mutagenesis of AB1206
MX821	<i>pro-42 thr-3 lac</i> <i>3'1 sup</i> <i>44 galK2 his-4 rpsL8</i> <i>ΔDE</i> <i>24th E-arg</i> <i>His</i> <i>thi-1</i> <i>14</i> <i>glnA71</i> <i>Tn5</i>	P1 (MX727) × MX816, Rha ^r [Km ^r Gln ⁻] selection
MX822	<i>pro-42 thr-3 lac</i> <i>3'1 sup</i> <i>44 galK2 his-4 rpsL8</i> <i>ΔDE</i> <i>24th E-arg</i> <i>His</i> <i>thi-1</i> <i>14</i> <i>glnA71</i> <i>Tn5</i>	P1 (MX705) × MX816, Rha ^r [Gln ⁻] selection
MX848	<i>Apr-pro-lac</i> <i>galE</i> <i>glnA71</i> <i>Tn5</i> <i>thi-680 lac</i> <i>1</i>	P1 (MX615, λ Kan2 infected) × MX614, Km ^r , 44 ^r cotransducible with <i>argE</i>
MX850	<i>Apr-pro-lac</i> <i>Algal attC</i> <i>hvs</i> <i>supE</i> <i>thi-680</i> <i>Arg</i> <i>glcA</i> <i>Arb</i> <i>zih</i> <i>Tn5</i> <i>thi-1 lamB</i>	Heat induction of MX752
MX852	<i>Apr-pro-lac</i> <i>Algal attC</i> <i>hvs</i> <i>supE</i> <i>thi-680</i> <i>Arg</i> <i>glcA</i> <i>Arb</i> <i>zih</i> <i>Tn5</i> <i>thi-1 lamB</i>	Heat induction of MX752
MX900	<i>pro-42 thr-3 lac</i> <i>3'1 sup</i> <i>44 galK2 his-4 rpsL8</i> <i>ΔDE</i> <i>24th E-arg</i> <i>His</i> <i>thi-1</i> <i>14</i> <i>glnA71</i> <i>Tn5</i>	P1 (MX902) × AB1206, Km ^r [Aut ⁻] selection
MX902	<i>Apr-pro-lac</i> <i>galE</i> <i>thi-680 glnA71</i> <i>Tn5</i> <i>thi-1</i>	This paper
MX914	<i>Apr-pro-lac</i> <i>Algal attC</i> <i>hvs</i> <i>supE</i> <i>thi-680</i> <i>Arg</i> <i>glcA</i> <i>Arb</i> <i>zih</i> <i>Tn5</i> <i>thi-1 lamB</i>	Precise excision of Tn5 in MX850
MX915	<i>Apr-pro-lac</i> <i>Algal attC</i> <i>hvs</i> <i>supE</i> <i>thi-680 glnA71</i> <i>Tn5</i> <i>Arg</i> <i>glcA</i> <i>Arb</i> <i>zih</i> <i>Tn5</i> <i>thi-1 lamB</i>	P1 (MX948) × MX914, Km ^r selection
MX927	<i>Apr-pro-lac</i> <i>galE</i> <i>thi-680 glnA71</i> <i>Tn5</i> <i>gln-76 thi-1</i>	MS ⁻ spontaneous mutant of MX902
MX929	<i>Apr-pro-lac</i> <i>galE</i> <i>thi-680 gln-76 thi-1</i>	Aut ⁻ [Km ^r] spontaneous derivative of MX927
MX931	<i>Apr-pro-lac</i> <i>galE</i> <i>glnA71</i> <i>Tn5</i> <i>thi-680 gln-76 thi-1</i>	P1 (MX948) × MX929, Km ^r [Aut ⁻] selection
MX932	<i>Apr-pro-lac</i> <i>galE</i> <i>thi-680 glnA71</i> <i>Tn5</i> <i>thi-1</i> <i>14</i>	Mating AB1206 × MX902, His ^r [His ⁻] selection
MX933	<i>Apr-pro-lac</i> <i>galE</i> <i>thi-680 glnA71</i> <i>Tn5</i> <i>thi-1</i> <i>14</i> <i>glnA71</i> <i>Tn5</i>	Mating MX821 × MX902, His ^r [His ⁻] selection
MX936	<i>Apr-pro-lac</i> <i>galE</i> <i>thi-680 glnA71</i> <i>Tn5</i> <i>gln-76 thi-1</i> <i>14</i>	Mating AB1206 × MX927, His ^r [His ⁻] selection
MX937	<i>Apr-pro-lac</i> <i>galE</i> <i>thi-680 glnA71</i> <i>Tn5</i> <i>gln-76 thi-1</i> <i>14</i> <i>glnA71</i> <i>Tn5</i>	Mating MX821 × MX927, His ^r [His ⁻] selection
MX981	<i>Apr-pro-lac</i> <i>galE</i> <i>glnA71</i> <i>Tn5</i> <i>thi-680 gln-76 thi-1</i> <i>lac</i> <i>1</i>	MS ⁻ spontaneous mutant of MX931
MX982	<i>Apr-pro-lac</i> <i>galE</i> <i>glnA71</i> <i>Tn5</i> <i>thi-680 glnA71</i> <i>gln-76 thi-1</i>	MS ⁻ spontaneous mutant of MX931
W3110 <i>puA1</i>	<i>mal</i> <i>4</i> <i>thi</i> <i>4</i> <i>puA1</i>	MC Gomez-Echeblmann

Results

Hypersensitivity to L-Methionine-D-Sulfotaxime of *glnG* Mutants

The *GlnK* phenotype of *glnG* mutants in enteric and other bacteria is characterized by an inability to transport and utilize compounds such as arginine, proline or histidine as the only nitrogen sources (i.e. the *Ntr* phenotype) and by a low level constitutive expression of glutamine synthetase (Kustu et al. 1975a; Patel and Tyler 1979). Based on the known irreversible inhibition of glutamine synthetase by the glutamine analogue, L-methionine-D-sulfotaxime (MS)

in the presence of ATP (Ronzio and Meister 1968; Ronzio et al. 1969; Rowe et al. 1969; Manning et al. 1969), we reasoned that cells synthesizing small amounts of this enzyme should be hypersensitive to MS. Indeed, we have found that all the *glnG* mutants of *E. coli* we have tested are hypersensitive to MS. At 80 μ M MS in GEA medium, *glnG* cells fail to grow while *glnG⁺* cells do grow (Fig. 1). In the presence of glutamine as the only nitrogen source, MS inhibition of growth of either *glnG⁻* or *glnG⁺* cells was not observed; methionine also prevented the growth inhibitory effects of MS on MX902 cells after a prolonged lag (Fig. 1; Ayling and Bridgeland 1972; Betteridge and Ayling 1975).

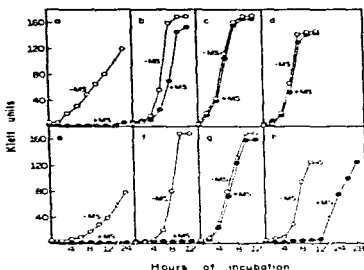


Fig. 1. a-h. Growth responses of strains MN614 (solid type) and MN902 (*glbZ*⁻ Tn5) in minimal medium at 37°C with (○) or without (□) 80 μM MS, as a function of the nitrogen source: a-d MN614, e-h MN902. a and e, Gln medium; b and f, Gln medium; c and g, Gln medium; d and h, Gln medium plus 80 μM 1-methionine.

Genetic and Physical Characterization of the *glbZ*⁻ Tn5 Mutations

glbZ mutations can be isolated either as suppressors of *glbZ* mutations or as Ntr⁻ mutations tightly linked to *glbZ*. The particular mutation *glbZ*⁻ Tn5 was isolated by the latter procedure but yet, was able to suppress the *glbZ*⁻ Tn5 mutation. In a conjugal cross made between the AH126 derivative, MN900, carrying *glbZ*⁻ Tn5 in the 1-merogonote, as donor and MN915, a *glbZ*⁻ Tn5 derivative of the MN850 deletion strain (Table 1), as recipient, we obtained 87% Glu⁻ (Ntr⁻) progeny among the 15⁺ exductants.

All the allelic properties of the *glbZ*⁻ Tn5 allele, i.e., its low level constitutivity for glutamine synthetase, and its Ntr⁻ and MS⁻ phenotypes, were shown to be recessive to the wild-type allele as shown by complementation of MN902 cells by the F14 merogonote carrying the entire wild-type *glbZ* region (strain MN932, Table 1). Cells of strain MN933 carrying *glbZ*⁻ Tn5 *glbZ*⁻ on the chromosome and *glbZ*⁻ *glbZ*⁻ Tn5 on the 1-merogonote (Table 3) synthesized normal, regulated levels of glutamine synthetase and were MS⁻. In agreement with the observation of Pahel and Taler (1979), no complementation was observed in these cells. Pahel et al. (1982) have explained these results in terms of the polarity exerted by the *glbZ*⁻ Tn5 mutation on expression of *glbZ* cis to it and to the limited transcription of this gene from a *glbZ* distal promoter insufficient to activate Ntr expression but sufficient to activate *glbZ* expression in *trans*.

glbZ⁻ Tn5 was found to be 93% linked to *glbZ* and 70% linked to *galA* in P1 transduction experiments (Table 2). These results were consistent with those obtained

Table 2. Mapping of *glbZ*⁻ Tn5 by transduction

P1 donor	Recipient	Marker		% Cotransduction
		Selected	Unselected	
W3110	MN902	Aur ^r	MS ⁻	70 (284/409)
<i>galA</i> 1	(<i>glbZ</i> ⁻ Tn5)			
MN902	MN227	Glu ⁻	Aur ^r MS ⁻	93 (330/361)

MS⁻ Methyl methanesulphonate, MS, 1-methionine in sulfonamide. The superscripts indicate sensitivity to 0.04% MSMS or to 80 μM MS.

in crosses with mutants carrying well-defined deletions entering the *glbZ* region. In reciprocal crosses using MN902 (*glbZ*⁻ Tn5) as a recipient and P1 propagated on either MN850, *glbZ*⁻ *glbZ*⁻ *glbZ*⁻ or MN852, *glbZ*⁻ *glbZ*⁻ *glbZ*⁻, we obtained Glu⁻ recombinants only with MN852 but not with MN850 as the donor.

To locate the *glbZ*⁻ Tn5 mutation more precisely, Southern-type hybridization experiments were carried out using the two plasmids, pACR2, which carries the *glbZ*⁻ *glbZ*⁻ region (Fig. 2B) and pACR10, a derivative of pBR322 carrying a Tn5 insertion as probes. These plasmids were nick-translated and hybridized against chromosomal DNA from strains MN615 (wild-type) and MN902 (*glbZ*⁻ Tn5) previously digested with endonucleases *Bam*HI and *Pvu*II. As shown in Fig. 2A, five *Bam*HI-*Pvu*II DNA fragments from MN615 were found to hybridize with pACR2 DNA. Three of them seemingly corresponded to the internal pACR2 DNA region, since similar bands were observed in the pACR2 vs pACR2 hybridization (Fig. 2A). The remaining two fragments represented the junctions between each of the ends of the chromosomal DNA fragment carried by pACR2. In the case of the hybridization of MN902 against pACR2, we noticed the disappearance of the 3.6 kb *Bam*HI-*Pvu*II fragment. Instead, two fragments of 2.77 kb and 2.55 kb were visualized. These results indicate that the *glbZ*⁻ Tn5 insertion occurred inside the 3.6 kb *Bam*HI-*Pvu*II fragment, approximately 2.77 kb from the *Bam*HI site. The data were confirmed by results obtained using pACR10 DNA as probe (Fig. 2A). Our hybridization results, therefore, are consistent with the conclusion that the *glbZ*⁻ Tn5 insertion readily interrupts the *glbZ* gene sequence (Fig. 2C).

Isolation of Constitutive Mutations for Glutamine Synthetase as Suppressors of *glbZ*⁻ Tn5

From MN614 cells, we isolated and characterized 17 independent mutants carrying Tn5 insertions tightly linked to *glbZ* in P1 transduction experiments. Most of them were shown to be insertions in *glbZ* but a few were insertions in *glbZ*, that were polar to *glbZ*. Yet all were MS⁻ and Aur^r. None of the *glbZ*⁻ Tn5 insertions reverted to Aur^r in the presence of kanamycin, but they did revert to the MS⁻ phenotype whether or not kanamycin was present in the selection medium. Strain MN902, for instance, reverted to MS⁻ at a frequency of 1 to 10⁷. Ten independent MS⁻ revertants from strain MN614 were screened for glutamine synthetase activity after growth on a Gln medium. Specific

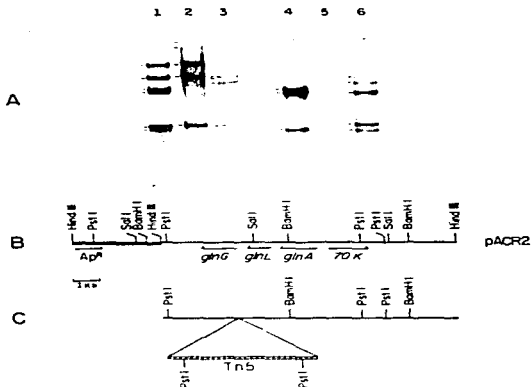


Fig. 2. A-C. Blotting hybridization of *Bam*HI + *Pst*I digests of MN615 and MN927 *E. coli* chromosomal DNA's with ³²P-pACR2 (lanes 1-3) or pACR10 (lanes 4-6) DNA's as probes for *glnG* and *Tn5*, respectively. A: Lane 1, pACR2 vs pACR2; Lane 2, MN615 vs pACR2; Lane 3, MN927 vs pACR2; Lane 4, pACR2 vs pACR10; Lane 5, MN615 vs pACR10; Lane 6, MN927 vs pACR10. B: Diagram of plasmid pACR2. C: Diagram of the *Tn5* insertion in MN927; the *Bam*HI sites of *Tn5* are not shown since its orientation in MN927 is not known, very likely, in Lane 6. Bands 1-6 (from top to bottom) correspond to *Bam*HI-Tn5 internal fragments while bands 1 and 2 (to 2.7 kb and 2.5 kb, respectively) are fusions between *Tn5* and the chromosome. The black bars correspond to pBR327 DNA; the thin lines to chromosomal DNA and the cross-hatched bars to *Tn5*. The arrows indicate the direction of gene transcription.

activities ranged between 370 and 1900. The MS^r strain with the highest glutamine synthetase specific activity under otherwise repressing conditions was selected for detailed study.

This MS^r revertant strain, designated MN927, synthesized high constitutive levels of glutamine synthetase but failed to utilize arginine as a nitrogen source (Table 3). Thus, in addition to the original *glnT*⁷⁴ *Tn5* mutation, MN927 carried a secondary mutation that suppressed only the *glnG* functions related to *glnT* expression and not those related to expression of the *Aut*^r phenotype.

Mapping of *gln-76*

P1 lysates made on MN927 (*glnG*⁷⁴ *Tn5 gln-76*) were used to transduce two independent glutamine auxotrophs, MN727 and MN822, to prototrophy. *gln-74* *Tn5* was found to cotransduce 82% and 96% with the wild-type chromosomal regions corresponding to the *gln-471* *Tn5* and *gln-470* mutations, respectively (Table 4). This is consistent with an ordering of the mutations as *gln674* *Tn5*-

gln-470-gln-471 *Tn5*. The fact that all the *gln-471* *gln-74* *Tn5* transductants from either cross also combined with *gln-4* *Tn5* was indicative of the tight linkage of this mutation with *gln-4*. A third cross was performed to locate *gln-76* unambiguously. Phage P1 was propagated on MN822, a strain carrying (*gln-4* *gln*) with one deletion end cutting the *gln-4* structural gene near the middle while leaving the *glnL*⁺ and *glnL*⁻ genes intact. This lysate was used to transduce MN927 recipient cells. All *Aut*^r recombinants tested were Km^r (Table 4). Recombinants were expected to be wild-type for all *gln* genes and to have regulated levels of glutamine synthetase unless they conferred the *gln-76* mutation. Since the only difference between cells carrying *gln-76* (i.e., MN929; see below) and wild-type cells (i.e., MN614) is a two-fold depression of glutamine synthetase by MN929, after growth on high ammonium ion concentrations (Table 3), 14 independent transductants from the above cross were purified and tested for glutamine synthetase activity after growth on G1EA medium. All of the isolates showed two-fold depressed levels of the enzyme, thus affording the conclusion that the chromosomal region corresponding

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

Strain	Relevant genotype	Gln	Aut	MS	Glutamine synthase		
					GIA	GIIA	GIII
MX614	Wild-type	-	+	Resistant	1,900 (4)	260 (9)	1,760 (6)
AB1206	<i>gln-76</i> <i>trp-1</i> 14	-	-	Resistant	1,220 ^a	190	1,470
MX348	<i>gln-73</i> Tr5	-	-	-	-	-	10
MX302	<i>gln-72</i> Tr5	-	-	Sensitive	70 (8)	50 (6)	50 (6)
MX927	<i>gln-72</i> Tr5 <i>gln-76</i>	-	-	Resistant	4,30 (5)	1,870 (11)	2,660 (6)
MX926	<i>gln-76</i>	-	-	Resistant	1,970 (5)	830 (10)	1,400 (5)
MX931	<i>gln-73</i> Tr5 <i>gln-76</i>	-	-	Sensitive	150 (4)	600 (9)	370 (7)
MX932	<i>gln-74</i> Tr5 14	-	-	Resistant	n.d.	120	1,960
MX933	<i>gln-74</i> Tr5 14 <i>gln-47</i> Tr5	-	-	Resistant	n.d.	140	1,470
MX934	<i>gln-74</i> Tr5 <i>gln-76</i> 14	-	-	Resistant	n.d.	870	2,760
MX937	<i>gln-74</i> Tr5 <i>gln-76</i> 14 <i>gln-47</i> Tr5	-	-	Resistant	n.d.	1,570	2,140
MX981	<i>gln-74</i> Tr5 <i>gln-76</i> <i>ms-1</i>	-	-	Resistant	140 (4)	640 (8)	270 (7)
MX982	<i>gln-74</i> Tr5 <i>gln-76</i> <i>gln-77</i>	-	-	Resistant	4,180 (5)	1,390 (11)	2,670 (6)

In the cases where the γ glutamyl transferase assays were run with and without 600 μ M Mg^{2+} , the average state of adenylation, *a*, is indicated in parenthesis, n.d., not determined.

Table 4. Mapping of the *gln-76* mutation by transduction

PI donor	Recipient	Marker Selected	Gln activity ^b		
			Unselected	Gln activity ^b	
MX927	MX927	<i>gln+</i>	Km ^r	82	Constitutive (46.40) ^a
<i>gln-76</i> Tr5 <i>gln-76</i>	<i>gln-76</i> Tr5	<i>gln+</i>	Km ^r	80	Constitutive (46.40) ^a
MX927	MX852	<i>gln+</i>	Km ^r	144	Constitutive (14.14) ^a
MX852	MX927	<i>gln+</i>	Km ^r	80	Constitutive (14.14) ^a

^a After growth of individual transductants in GIIA medium.

^b High level constitutive (quantitative assay) or fold depressed (as compared to wild-type) (quantitative assay).

to the *gln-76* mutation was deleted in MX852. Due to its tight linkage with *gln-4*, *gln-76*, therefore must be very close to the NH₂-terminal end of *gln-4*.

Regulation of Glutamine Synthetase in Strains Carrying the *gln-76* Allele

The most striking feature of the *gln-76* allele was that it mediated synthesis of glutamine synthetase at high levels in the absence of a functional *glnA* product. In fact, cells carrying the *gln-76* mutation made considerably more enzyme when the cells lacked a normal activating system than in its presence. When compared with the wild-type, strain MX614, the *gln-76* strain had double the activity when both strains were grown on media containing low ammonium ion concentrations, it had about 1.5-fold higher activity when glutamine was the nitrogen source and 7-fold higher activity when both strains were grown on high ammonium ion concentrations (Table 3).

Using the curing procedure outlined in Materials and Methods, we obtained *glnA*⁻ derivatives from MX927 that were Km^r due to precise excision of the Tr5 insertion. One of these Gln⁻ Km^r derivatives, termed MX929, was shown to be Aut⁻ MS⁻ and synthesized normal levels of glutamine synthetase, except when grown on GIA medium where the activity was two-fold depressed as compared to wild-type MX614 cells grown under similar conditions. This implied that *gln-76*, the mutation conferring the MS⁻ phenotype to MX927, was still present in the Gln⁻ cured

strain, MX929. These results suggest that the putative *glnA*-*glnB* activator complex still bound and initiated transcription at the *glnE* operon control region of MX929 cells despite the fact that it is not needed.

The next logical step was to introduce a mutant *glnF* allele into the *gln-76* background in order to study the effects of the *gln-76* mutation on glutamine synthetase in more detail. Accordingly, we transduced the *glnF*⁷³ Tr5 mutation from MX848 into MX929 with bacteriophage P1, selecting for Km^r transductants. One Km^r transductant was purified and designated MX931. The *glnF*⁷³ Tr5 *gln-76* genotype of this isolate was verified by cotransduction with *argE* in the case of *glnF*⁷³ Tr5 and with *glnI* in the case of *gln-76*. MX931 was glutamine independent due to its ability to synthesize sufficient amounts of glutamine synthetase for growth (Table 3). The glutamine synthetase specific activities of strain MX931 varied between 150 and 600 (Table 3). Surprisingly, they showed the inverse relationship of having higher levels of activity in cells grown on high ammonium and lower in those grown on low ammonium ion concentrations. MX931 was also Aut⁻ and MS⁻, the Aut⁻ phenotype being a clear indication of an absolute requirement of a functional *glnF* product for Aut⁻ β -*trp* expression.

MS⁻ Derivatives of MX931

Plating of MX931 (*glnF*⁷³ Tr5 *gln-76*) cells on minimal-glucose-15 mM NH₄⁺ 80 μ M Mg²⁺ medium in the presence

of kanamycin, led to the isolation of MS^r spontaneous mutants at a frequency of 1×10^{-8} . Two classes of MS^r mutants were easily distinguished after the colonies were screened with the qualitative assay for glutamine transferase activity. One class (MS^r-1) synthesized high constitutive levels of the enzyme, similar to those made by MN927 (*glu-74*⁺, 1.0 \times 10⁶ U/g) and another class (MS^r-2) which synthesized intermediate constitutive levels, practically identical to those made by the parental strains, MN934. As expected, representatives of the high level constitutive class, exemplified by MN982 (Table 3), apparently carried, in addition to *glu-74*⁺, 1.0 \times 10⁶ U/g, *glu-76* *glu-76* mutations which conferred on them the MS^r phenotype. This was suggested by results of transduction tests in which PE lysates, made on three isolates of the high level constitutive class, including MN982, were used to transduce MN934 (*glu-74*⁺, 1.0 \times 10⁶ U/g) protoplasts resulting from each of the three crosses were Aut⁻ MS^r and high level constitutive for glutamine synthetase. These results suggest that MN934 cells spontaneously revert to *glu-74*⁺ at a frequency of 1×10^{-11} which is characteristic of the *glu-74*⁺ 1.0 \times 10⁶ U/g mutation. Thus, stability of the cells to synthesize glutamine does not seem to be a condition under which the suppressors of *glu-76* mutations will arise, as they take place in MN934 capable of synthesizing sufficient amounts of the enzyme to support cellular growth.

The other class of MS^r mutants derived from MN934 was shown not to affect *glu-74*. PE propagated in three of the mutants including MN981, the prototype strain of this class, was used to transduce the MN934 recipient to Gln⁻ [Kov⁺]. None of the 200 transductants tested from each cross was Aut⁻. The nature and location of the mutations rendering these mutants MS^r has not been investigated further.

Finally, the pattern of adenylation of the glutamine synthetase made by wild-type MN614 cells, which is a function of the quantity and abundance of the nitrogen source in the medium, was similar to those by the different strains carrying the *glu-76* allele (Table 3). This was true, even if the amount of enzyme made by a particular strain was unusually high. Thus, the *glu-76* mutation does not seem to affect the normal adenylation/deadenylation system of glutamine synthetase in these cells.

cis-Dominance of glu-76 in Heterozygous Merodiploid

We reasoned that if *glu-76* lay in the *glu-76* control region, it should behave as cis dominant in a heterozygote. To test this assumption we constructed two strains by conjugal transfer of F⁺14 merogenes into MN927 (*glu-74*⁺; 1.0 \times 10⁶ U/g) recipients. One strain, MN936, received an F⁺14 merogene carrying the entire wild-type *glu-74* region, and the other, MN937, received a similar F⁺14 merogene but carrying the *glu-74*⁺; 1.0 \times 10⁶ U/g insertion (Table 3).

MN936 was weakly Aut⁻ similar to MN932. In both strains the F⁺14 merogene carrying the wild-type *glu-74* region complemented the *glu-74*⁺; 1.0 \times 10⁶ U/g chromosomal mutation, albeit weakly. Apparently, some *trans* effects exerted by a chromosomal product negate the effect on *glu-74* expression from the merogene, since the wild-type F⁺14 merogene expressed Aut⁻ in the haploid state (i.e., in AH206, Table 3). Strain MN937 was Aut⁻, as expected, due to the *glu-74*⁺; 1.0 \times 10⁶ U/g mutation of its chromosomal and

Table 3. Inhibition of Glutamine Synthetase Activity by 80 μ M MS in cell-free extracts of different *E. coli* strains

Strain	Without MS ^r			With 80 μ M MS ^r		
	MS ^r	MS ^r	% Inhibition	MS ^r	MS ^r	% Inhibition
MN614	1.36	170	87	1.00	163	91
MN902	15	6	64	15	5	84
MN927	1.00	1.00	0	1.50	1.00	0
MN934	1.0	16	87	1.0	17	90
MN981	1.50	16	76	0.7	1.7	87
MN982	2.00	109	95	2.00	100	87

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

the *glu-74*⁺ 1.0 \times 10⁶ U/g mutation of its merogene, which probably exerted polar effects on expression of the *glu-76* gene positioned *cis* to it.

In the haploid state, as in AH206, the wild-type F⁺14 merogene directed synthesis of normally repressible glutamine synthetase (Table 3). Therefore, the high level constitutivity of glutamine synthetase in both MN936 and MN937 was ascribed to cis dominance of *glu-76* on expression of the chromosomal *glu-74* gene; the higher meronum levels of constitutivity observed in MN937 (see above) of MN936 being an additional indication of the negative effects of the limiting amount of *glu-74* producing activity in the F⁺14 merogene of MN936 and the inability of the *glu-74* gene of the F⁺14 *glu-74*⁺ 1.0 \times 10⁶ U/g merogene to be expressed.

An independent MS^r mutation from MN902 was also isolated and termed *glu-75*. The behavior of *glu-75* was similar to that of *glu-76* in many respects. It was tightly linked to *glu-76* in PE transduction experiments. It also mediated *cis*-dominant constitutive synthesis of glutamine synthetase in the absence of the *glu-74* *glu-74* donor system (data not shown).

Inhibition of Glutamine Synthetase Activity by MS

From evidence presented here we propose that the control region of the *glu-76* operon is the one where the *glu-76* mutation must be. The possibility that *glu-76* could lie within the *glu-74* structural gene, thus rendering the glutamine synthetase enzyme resistant to MS inhibition, as occurred for the *Salmonella* mutants of Miller and Bendisley (1984) was considered unlikely. Nonetheless, experiments to rule out this possibility were undertaken. As expected, cell-free extracts prepared from strains carrying *glu-76* showed glutamine synthetase activities equally as sensitive to MS as those prepared from wild-type; MN614 or MN902 (*glu-74*⁺ 1.0 \times 10⁶ U/g) cells (Table 3).

Discussion

E. coli strain MN902 which is hypersensitive to MS by virtue of carrying the *glu-74*⁺ 1.0 \times 10⁶ U/g mutation, was used to isolate and characterize spontaneous MS^r mutants. One of these, MN927, carried, in addition to *glu-74*⁺ 1.0 \times 10⁶ U/g, a secondary insertion, *glu-76*, which allowed the constitutive expression of glutamine synthetase.

This constitutive behavior of *gln-76* was shown to be *cis*-dominant when complemented with T44-mutagenesis carrying the entire wild-type *gln4* region (Table 3). Mapping experiments using transduction with bacteriophage P1 demonstrated that the *gln-76* allele was nearly 100% linked to the *gln4* structural gene. Moreover, all *Act1* transductants that were tested from a cross between MN852 *gln4⁺ gln1⁻ Arg4::His^r* as donor and MN927 (*gln76⁻ Trp5⁺ elm-76*) as recipient still had the *gln76* mutation (Table 4); therefore, *gln-76* must be on the *gln4* side opposite to *gln1⁻* and *gln4⁺*. By several additional criteria we have been able to show that the *gln-76* allele does not affect the *gln1⁻* gene. This was considered necessary since mutations in *gln1⁻* are also known to lead to constitutivity for glutamine synthetase, i.e. the *Gln1⁻* phenotype (Blackman et al. 1981; Chen et al. 1982). Contrary to the *cis*-dominant constitutive behavior for glutamine synthetase expression mediated by *gln-76*, constitutivity of all the *gln1* mutations as have been reported by 4 hcn et al. (1982), was *trans* recessive to the wild-type allele in complementation experiments; in addition, the *gln-76* allele did not suppress the *Trp1⁻* phenotype conferred on *Trp1⁻* cells by the *gln81* mutation (data not shown) as has been reported for certain *gln1* mutations (Lahel et al. 1978; Chen et al. 1982).

One of the most striking features of the *gln-76* mutation is that it allows *gln4* expression in the absence of a functional *gln4* product, e.g. in strain MN927. The later construction of strain MN982 (Table 3) presumably devoid of both the *gln4* and *gln1* products, further suggests that *gln-76* promotes a highly efficient expression of *gln4* in the absence of both the *gln4* and *gln1* products. Bacterial mutants synthesizing high constitutive levels of glutamine synthetase in the absence of the *gln4* and *gln1* activator system had not been reported previously. The only precedent was a mutation known as *mt1* isolated in *Klebsiella pneumoniae* by Ausubel et al. (1976, 1977); one such mutation was shown to be *cis*-dominant. These mutations presumably affected the regulatory region of the *mt1* 4 operon since they allowed *mt1* expression in the apparent absence of activation by the *gln1* product, i.e. in a *GlnR* background.

A *cis*-dominant mutation, *gln-153*, that affects the *gln4* control region of *Klebsiella pneumoniae*, has been reported previously (Rothstein and Magasanik 1980). It was selected as a glutamine-independent derivative of a strain carrying a *gln1* mutation and merodiploid for the *gln4* region. Some properties inherent to our *gln-76* mutation are shared by the *gln-153* mutation. However, others such as the high constitutive level of expression of glutamine synthetase mediated by *gln-76* in the absence of a *gln4* product have not been documented for cells carrying *gln-153*. Thus, whether or not *gln-76* and *gln-153* are old mutants in an open question.

The molecular basis for *gln4* activation by the *gln4* and *gln1* products and for repression by the *gln4* and *gln1* products, remains unknown. Whatever the mechanisms turn out to be, it is clear that the binding site for the activator remains largely unaltered in cells carrying *gln-76* according to the following reasoning. It was noticed that the maximal level of glutamine synthetase expression in MN927, which occurred when these cells were grown under nitrogen-limiting conditions, was increased by a factor of two when compared to that of wild-type MN84 cells grown under similar conditions (Table 3). However, in strain MN929 which car-

ries *gln-76* and all the *gln* regulatory genes in the wild state, the maximal level of glutamine synthetase expression dropped back to that of wild-type cells (Table 3). Thus, in MN929 cells activation of *gln4* expression by the *gln4* and *gln1* products is apparently preferred over that mediated by *gln-76*. It seems, therefore, as if the *gln-76* mediated expression of glutamine synthetase takes place only in the absence of a functional *gln4* product, regardless of whether or not a *gln1* product is present to compare MN927 with MN929 (Table 3).

Another important feature of the constitutive expression of glutamine synthetase in MN927 and in MN982 was its incompleteness; in other words, when these strains were grown in GFA, normally a repressing medium, the enzyme activity was derepressed but was still depressed relative to order derepressing conditions, as when the cells were grown with glutamine as the only nitrogen source. Since neither normal activation nor repression of the *gln4* operon can take place in MN927 or MN982 cells due to their lack of a functional *gln4* product, this effect may represent a hitherto undefined type of negative control created by exposure of these cells carrying *gln-76* to an excess of ammonium ions. A similar inability to attain full derepression of glutamine synthetase in the presence of an excess of ammonium ions, but not necessarily of the same origin, has been observed in *E. coli* strains of quite different genetic constitution, as those carrying *glnE* mutations homologous to *gln4* displaying the *Gln1⁻* phenotype (Chen et al. 1982; Bastarrica et al. unpublished data).

Introduction of the *gln76⁻* into cell lines MN929 led to strain MN931 (*gln76⁻ Trp5⁺ elm-76*); the behavior of which was peculiar in several aspects. In *gln4* cells carrying the site corresponding to the *gln76⁻* mutation in the wild state, i.e. MN848 (Table 3), the *gln1* mutation causes glutamine auxotrophy. In these cells only repression takes place since no activation is present. In strain MN931, however, the *gln-76* mutation prevented *gln76⁻* Trp5 from causing glutamine auxotrophy by allowing synthesis of glutamine synthetase in ammonium sufficient to support cell growth under ammonium assimilating conditions. Critically enough, the glutamine synthetase activity made by MN931 cells was consistently higher, by a factor of two, when the cells were grown in ammonium excess than when they were grown at low ammonium ion concentration. The weak expression and the variations of glutamine synthetase activity in MN931 cells could be due to repression exerted by the *gln4* product. This possibility is in agreement with the finding that the intracellular concentration of *gln4* as measured by β -galactosidase activity in *gln4* and *gln1* fusion strains, is high in cells grown under nitrogen limitation and low in those grown in an excess of nitrogen (Rothstein et al. 1980).

Our method of isolating mutations such as *gln-76* precluded selection of cells overproducing glutamine synthetase in the absence of the *gln4* product. It could be anticipated that at least some of the mutants that arose were affected in the *gln4* promoter. The high constitutive level of *gln4* expression mediated by *gln-76* readily suggests that a high efficiency promoter was probably created by this mutation. Even though *gln-76* made cells a repressing independent of its normal activator system, it did not affect either the binding to its specific recognition sites or its functionality when such an activator was present. Other results described above indicate that *gln-76* altered or de-

troyed a site near *gln4* where the repressor binds. We may tentatively conclude, therefore, that the binding sites for the activator and the repressor are not the same, which is tantamount to saying that they are independent of each other. The results also indicate that if a high efficiency promoter was created by the *gln-76* mutation, it should overlap, at least in part, with the binding domains of the repressor. Our efforts to this end suggest that the *gln-1* regulatory region contains more than one DNA sequence which could function as promoters (Covarrubias and Haslbracher, 1993). This finding raises another possibility, that the *gln-1* operator region may consist of one of the promoters, thus making both coding sequences susceptible to a single mutational event, which could be the case for *gln-76*. The location of the *gln-76* mutation by base sequence analysis and identification of the start of the mRNA transcripts made from wild-type and *gln-76* 1-65 *gln-76* DNA, which are now in progress in our laboratory, may shed some light on the mechanisms that are a *per se*.

From the results presented in Table V it is clear that either the normal pattern of acetylation of glutamine synthetase nor the inability of the cells to express the *Ntr*⁺ (Aut⁺) phenotype in the absence of either one of both the *gln6* and *gln7* functional products were altered by *gln-76*. The phenotypic response of the strains to the glutamine analogue, MS, however, deserves further comments.

Based on the irreversible inhibition of glutamine synthetase activity by MS in the presence of A.P. (Ronzón and Meister 1967; Ronzón et al. 1969; Rowe et al. 1969; Manning et al. 1991) we postulated that cells making abnormally small amounts of glutamine synthetase were more sensitive than wild-type cells to growth inhibition by MS. In fact all the *gln6* mutants we have tested were hypersensitive to MS. Previous evidence from Bettendorff and Adine (1975) suggested that MS penetrates the *S. typhimurium* cell to the high affinity glutamine transport system. It is also known that one of the manifestations of the *Ntr*⁺ phenotype of *S. typhimurium gln6* mutants is a reduced ability to transport a number of amino acids inside the cells, including glutamine (Kawato et al. 1976; Vayns and Kasai 1977). If the internal MS concentration attained by *gln6* cells is indeed diminished, it would be sufficient to titrate most of the reduced number of glutamine synthetase molecules made by these cells in order to leave too few active enzyme molecules compatible with cellular growth.

In our laboratory, accumulation of enzymatically inactive glutamine synthetase-MS molecular complexes has been shown to occur during growth of *E. coli* wild-type cells on GHI medium (Manning et al. 1991). We showed, though this result can be taken in support of the titration hypothesis, we still find many examples of strains synthesizing high glutamine synthetase activities, which are MS^r, MX01, *gln6-76* and *gln6-76* for instance, which synthesized twice the glutamine synthetase activity made by wild-type MX014 cells when both were grown on high ammonium concentrations. Yet, under these growth conditions, MX01 is sensitive and MX014 is resistant to MS. Further experimentation along these lines should lead to new insights into this complex problem of the regulation of glutamine biosynthesis.

Acknowledgments. We are grateful to Barbara Bachmann for her supply of strains, to Myriam Ortiz for expert technical assistance and to Patricia Anzures and Esperanza Ruiz for typing the manu-

script. This work was supported, in part, by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico) grants PC/CIBNA-001/84 and PC/CIBNA-002/86.

References

- Ausubel FM, Margolick BE, Marletti S (1976) Mutants of *Alcaligenes eutrophus* in which expression of nitrogenase is independent of glutamine synthetase control. In: Newton W, Postgate JR, Rodriguez-Ruiz C (eds) Recent developments in nitrogen fixation. Academic Press, London, pp 447-456.
- Ausubel FM, Bender G, Cannon J, Peck G, Margolick BE (1977) Cloning nitrogen fixation genes from *Alcaligenes eutrophus* in *Escherichia coli*: the isolation of a *nit* promoter mutants affecting glutamine synthetase regulation. In: Castellani A (ed) Genetics engineering: nitrogen fixation. Plenum Press, New York, pp 131-145.
- Avignone F, Bradstreet FN (1972) Methionine transport in wild type and transport defective mutants of *Neurospora crassa*. *J Gen Microbiol* 73:127-141.
- Bachmann BJ, Low KH (1980) Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 6. *Microbiol Rev* 44:1-56.
- Bachman K, Chen Y, Magasanik B (1981) Physical and genetic characterization of the *glnA* gene region of the *Escherichia coli* chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:3743-3747.
- Baratarra EA, Whitton NS (1980) The elimination by acetone orange of *E. coli* from recombinational deficient strains of *Escherichia coli* K-12. *Genetics* 89:133-136.
- Baratarra EA, Brom S, Covarrubias AV, Gomez A, Bolivar F (1980) Genetic characterization and mutational effects of glutamine synthetase and its regulation of *Escherichia coli* K-12. In: 7th Int. Talcazo E (ed) Glutamine: Metabolism and genetic regulation. Academic Press, New York, pp 167-171.
- Berg DE, Evans J, Miller B, Beckwith J (1975) Transformation of *R. ruber* genes to bacteriophage λ . *Proc Natl Acad Sci USA* 72:3628-3632.
- Bettendorff M, Hershfield D, Chen Y, Brown W, Friedman HW, Hager HW (1976) A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the *E. coli* restriction and modification of DNA. *J Mol Biol* 91:205-208.
- Bettendorff M, Avignone F (1975) The role of methionine transport-defective mutants in resistance to methionine sulphaphiazone in *Escherichia coli*. *Genetics* 80:187-191.
- Chen Y, Bachman K, Magasanik B (1982) *glnA* mutation as a genetic locus: the product of which is involved in the regulation of nitrogen fixation of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 150:224-226.
- Covarrubias AV, Sanchez-Pescador E, Gomez A, Bolivar F, Bassler W, Bolivar F (1980) Role of *E. coli* bacteriophage λ in glutamine synthetase genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine. *Plasmid* 3:150-164.
- Covarrubias AV, Baratarra EA (1983) Nucleotide sequence of the *glnA* control region of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 251:173-178.
- De Luca CA, Anis J (1969) Isolation of an *E. coli* strain with a mutation affecting DNA polymerase. *Nature* 224:1164-1166.
- Galicia I, Bacterio N, Rhee SG, Kustu S (1977) The product of a newly identified gene, *glnE*, is required for synthesis of glutamine synthetase in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:1662-1666.
- Golds H, Magasanik B (1982) Effects of *glnE* and other regulatory loci on regulation of transcription of *glnA* and *glnB* in *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* 150:231-238.
- Groves PC, Heymer HD, Bolivar F, Beckwith J, Beckwith MC, Covarrubias AV, Bachman K, Russell DL, Low KH, Boyer H (1978) A general method for the purification of restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* 6:2373-2380.
- Gutierrez MS, Roberts CJ, Taylor D (1982) Polarity in the *glnA* operon: suppression of 3' Reg⁺ phenotype by *glnA* mutations. *J Bacteriol* 150:1314-1321.

- Kustin S, Burton D, Garcia L, McCarter J, MacLeland S (1979a) Nitrogen control in *Salmonella*: regulation by the *glbR* and *glbP* gene products. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4376-4380
- Kustin S, MacLeland S, McCarter J, Simon H, Ames B (1979b) Nitrogen control in *Salmonella*: *glpX* regulation of synthesis of glutamine synthetase and amino acid transport systems. *J Bacteriol* 138: 738-742
- Lewis JH, Rostkowski J, Laro M, Randall RE (1953) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
- MacNeil JJ (1981) General method using *Klu* M131 deoxyribose to determine the direction of transcription of and promoter elements in the *glbE* region of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 146: 740-748
- MacNeil J, MacNeil JJ, Ecker H (1982) Fine structure deletion map and complementary analysis of the *glbE* and *glbP* regions of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 150: 1367-1373
- Magasanik B (1978) Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Annu Rev Genet Evol* 13: 1-68
- Klaning JM, Moore S, Rowe W, Mestey A (1969) Identification of a methionine S-sulfonamide as the direct repressor of a methionine S-sulfonamide that inhibits glutamine synthetase. *Biochemistry* 8: 2681-2685
- Marmur J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* 3: 208-218
- MacLeland S, McCarter J, Kustin S, Ames B (1981) Nitrogen regulatory locus *glbR* of enteric bacteria is composed by at least two *glbE* and *glbP* subunits of their protein products. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 2138-2140
- Milky P, Brechba J (1981) Methionine S-sulfonamide represses glutamine synthetase from mutants of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 256: 11307-11311
- Milky J (1972) Experiments in molecular genetics. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York
- Palocz G, Zeleny AF, Ecker H (1979) *glbE* gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 133: 139-148
- Palocz G, Ecker H (1979) A new *glbE* linked regulatory gene for glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4844-4848
- Palocz G, Rothstein DM, Magasanik B (1982) Complex *glbE*-*glbP* system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 150: 202-213
- Rowe W, Mestey A (1968) Phosphorylation of methionine S-sulfonamide by glutamine synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA* 65: 164-170
- Rowe W, Mestey A, Mestey A (1969) Studies on the mechanism of inhibition of glutamine synthetase by methionine S-sulfonamide. *Biochemistry* 8: 1066-1075
- Rothstein DM, Magasanik B (1980) Isolation of *Albertyla overtonii* mutants resistant to glutamine synthetase expression. *J Bacteriol* 141: 671-679
- Rothstein DM, Palocz G, Ecker H, Magasanik B (1980) Regulation of expression from the *glbE* promoter of *Escherichia coli* in the absence of glutamine synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 3373-3376
- Rowe W, Rowe R, Mestey A (1969) Inhibition of glutamine synthetase by methionine S-sulfonamide. Studies on methionine S-sulfonamide phosphate. *Biochemistry* 8: 2674-2680
- Southern EM (1979) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-532
- Wu CH, Kustin S (1981) Glutamine auxotrophs with mutations in a nitrogen regulatory promoter that is near *glbE*. *Mol Gen Genet* 181: 397-399
- Woodfolk CA, Shapiro JM, Stadler JR (1966) Regulation of glutamine synthetase. I. Purification and properties of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 116: 177-187

Communicated by G. O'Donovan

Received May 25, July 28, 1983

Nitrogen Regulation of Synthesis of the High Affinity Methylammonium Transport System of *Escherichia coli*

By LUIS SERVÍN-GONZÁLEZ AND FERNANDO BASTARRACHEA*

Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70479, DF 04510, México

(Received 28 February 1984; revised 2 July 1984)

Uptake of $^{14}\text{CH}_3\text{NH}_2$ (methylammonium) was measured as a probe of NH_2^+ transport in intact *Escherichia coli* cells and derivatives impaired in the Ntr regulatory system. The results suggest that expression of the high affinity $^{14}\text{CH}_3\text{NH}_2$ transport system (a) requires *de novo* polypeptide synthesis, (b) is activated by the *glnG* and *glnF* regulatory products under nitrogen limitation, and (c) is repressed under nitrogen excess by the *glnL* product. Cells deficient in glutamate synthase activity by virtue of their harbouring the *gltB3* mutation were unable to activate synthesis of $^{14}\text{CH}_3\text{NH}_2$ transport. This could explain the inability of cells carrying *gltB* mutations to grow on low concentrations of NH_2^+ .

INTRODUCTION

Most micro-organisms assimilate NH_2^+ ions as a sole source of nitrogen and must have mechanisms that ensure penetration of these cations. Some bacteria and fungi have mechanisms that concentrate ammonium ions intracellularly to 100-fold or more across the cell envelope (see Brown, 1980, and Kleiner, 1981 for reviews). Stevenson & Silver (1977) used $^{14}\text{CH}_3\text{NH}_2$ uptake to demonstrate an NH_2^+ transport system in *Escherichia coli*. A genetical analysis of the NH_2^+ transport system has not been pursued in any prokaryote. We decided to determine whether the *E. coli* high affinity NH_2^+ transport system previously described by Stevenson & Silver (1977) was under the general genetic control of nitrogen metabolism, as suggested for *Klebsiella pneumoniae* (Kleiner, 1982). In enteric bacteria the latter system, known as Ntr, regulates the expression of the *glnALG* operon (Pahel *et al.*, 1982) and other genes or operons involved in the transport of several amino acids (Kustu *et al.*, 1979*a*; Wei & Kustu, 1981) and in the subsequent utilization of nitrogen sources such as arginine, proline or histidine (reviewed by Tyler, 1978; Magasanik, 1982). Ntr also regulates the expression of the complex nitrogenase system of *K. pneumoniae* (Streicher *et al.*, 1974; de Bruijn & Ausubel, 1981; Espin *et al.*, 1981; Ow & Ausubel, 1983) and *Rhizobium meliloti* (Sundaresan *et al.*, 1983).

The products of at least three genes, *glnF*, *glnG* and *glnL*, have been identified as the regulatory proteins involved in Ntr control (Kustu *et al.*, 1979*b*; McFarland *et al.*, 1981; Pahel *et al.*, 1982; Chen *et al.*, 1982). Under conditions of nitrogen limitation, the *glnG* product appears to act in concert with the *glnF* product to activate all genes or operons under Ntr control. Under conditions of nitrogen excess, the *glnG* product has been postulated to repress transcription of the same genes in concert with the *glnL* product. The evidence presented here indicates that synthesis of the high affinity NH_2^+ transport system of *E. coli* is also subject to Ntr regulation.

METHODS

All strains used were *E. coli* K12 derivatives. All mutations affecting the Gln and Ntr phenotypes were introduced into MX014 (*E. coli* *Xpr*-*lacI* *hcr80* *coll*) either by mutation or by genetic manipulation (Covarrubias *et al.*, 1980; Osorio *et al.*, 1984), except for MX705, which is derived from strain RR1 (Covarrubias *et al.*, 1980).

Strains were grown aerobically in liquid NN minimal medium (Covarrubias *et al.*, 1980) with 0.2% glucose as carbon source, and the indicated nitrogen source. ^{14}C -NH $_4^+$ was obtained from New England Nuclear (50 mCi/mmol), ^3H -CH $_3$ (1000 Ci/mmol), specific activity was lowered to 5.0 mCi/mmol with non-radioactive CH $_3$ -NH $_4^+$. ^{14}C -H $_2$ NH $_2$ uptake assays were performed as described by Stevenson & Silver (1977) using 50 mM-Tris-HCl, 72 mM-NaCl, 0.2% glucose (pH 7.0) as assay buffer, and substituting M9 medium for NN minimal medium. ^{14}C radioactivity was counted in a Packard Tri-Carb liquid scintillation spectrometer using 10 ml Bray's scintillation mixture per liter (Peng, 1977). Specific activity determinations are expressed as nmol methylammonium accumulated min $^{-1}$ (g cell dry mass) $^{-1}$. These were highly reproducible for duplicates of a given culture but varied from ± 10 to 25% for independent cultures. Protein was determined by the method of Lowry. L-[^{14}C]glutamine was obtained from New England Nuclear, non-radioactive CH $_3$ -NH $_2$ and amine acids were from Sigma. NH $_4^+$ concentrations were measured with an ammonium electrode (Beckman model 39565). Glutamine synthetase (L-glutamate: ammonia ligase (ADP-forming) EC 6.3.1.2) activity was measured by the γ -glutamyl transferase assay (Covarrubias *et al.*, 1980).

RESULTS

General properties of the ^{14}C -NH $_4^+$ transport system

Several characteristics of the ^{14}C -NH $_4^+$ high affinity transport system described by Stevenson & Silver (1977) for *E. coli* strain ML308-225 were found in strain MX614 (Table 1). We confirmed: (a) uptake at pH values of 7 and 9, (b) energy dependence of the concentrative uptake as shown by its inhibition by cyanide, (c) inhibition of uptake by NH $_4^+$ ions but not by glutamate, and (d) variability in the levels of uptake (Table 2). In addition we found that glutamate at concentrations equivalent to those of NH $_4^+$ ions strongly inhibited ^{14}C -NH $_4^+$ uptake (Table 1). Since we found that at equivalent concentrations neither CH $_3$ -NH $_2$ nor NH $_4^+$ ions inhibited L-[^{14}C]glutamine uptake (data not shown), the possibility that we were measuring ^{14}C -NH $_4^+$ transport via the high affinity glutamine transport system (Weiner & Heppel, 1971; Willis *et al.*, 1975; Hetteridge & Ayling, 1976) was ruled out. Contamination of our glutamine preparations with NH $_4^+$ ions was found to be of the order of less than 0.14%, by mass, too low to account for the inhibitory effect of glutamine.

Attenuation and repression of ^{14}C -NH $_4^+$ transport

MX614 cells grown under nitrogen limitation (0.5 mM-NH $_4^+$ or 6.8 mM-glutamine) developed a high capacity for ^{14}C -NH $_4^+$ uptake (Table 2). By contrast, cells grown with an excess of nitrogen (15 mM) or with a combination of 15 mM-NH $_4^+$ plus 6.8 mM-glutamine took up background amounts of ^{14}C -NH $_4^+$. These results suggest that synthesis of the ^{14}C -NH $_4^+$ transport system is regulated by nitrogen availability in a manner similar to that of several amino acid transport systems (Kustu *et al.*, 1979a; Wei & Kustu, 1981). The kinetics of activation of ^{14}C -NH $_4^+$ transport was measured by transferring MX614 cells previously grown on 15 mM-NH $_4^+$ to nitrogen limiting conditions. The ^{14}C -NH $_4^+$ concentrative capacity increased significantly 60 min after the shift (Fig. 1a). The highest rate was observed when no nitrogen was added to the culture after the shift, a slightly lower rate was observed for cells grown on 0.5 mM-NH $_4^+$ and the lowest rate for those grown on glutamine. The highest rate obtained when no nitrogen was added following the shift cannot be taken as evidence to suggest that the lack of nitrogen is the event that triggers activation; these cells, even though they were washed after growth on 15 mM-NH $_4^+$, probably contained intracellular amounts of NH $_4^+$ ions which could act as the effector. The *de novo* synthesis of the ^{14}C -NH $_4^+$ carrier, and its polypeptide nature, were also suggested by the observation that chloramphenicol (34 $\mu\text{g ml}^{-1}$) completely inhibited its formation under otherwise derepressing conditions (Fig. 1a). A slow repression was observed when MX614 cells fully activated for ^{14}C -NH $_4^+$ transport were shifted to a 15 mM-NH $_4^+$ medium (Fig. 1b). This slow onset of repression may be the consequence of a prolonged time required for cells to make active repressor, to a long half life of the previously synthesized carrier, or to both.

Ntr regulation of synthesis of the ^{14}C -NH $_4^+$ transport system

^{14}C -NH $_4^+$ uptake assays were performed on strains harbouring mutations in several genes known to be involved in Ntr regulation. The strains were grown under nitrogen limiting or

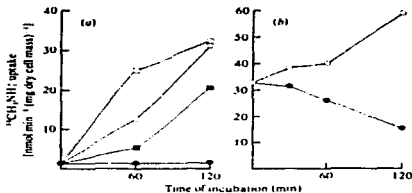


Fig. 1. Kinetics of derepression (a) and repression (b) of the high affinity ${}^{14}\text{C}_3\text{NH}_3$ transport system of *E. coli*. (a) *E. coli* MX614 cells were grown aerobically on glucose/15 mM- NH_4Cl NN medium. When they reached a turbidity of 80 Klett units they were washed three times and growth was continued in nitrogen limiting media, i.e. 0.5 mM- NH_4Cl (O), 6.8 mM-L-glutamine (■), or without nitrogen (□). Growth was also continued in the same 15 mM- NH_4Cl medium as a control and in the three nitrogen limiting media in the presence of 34 μg chloramphenicol ml^{-1} , all of which resulted in lack of derepression of ${}^{14}\text{C}_3\text{NH}_3$ transport (◐). (b) *E. coli* MX614 cells were grown aerobically on glucose/0.5 mM- NH_4Cl NN medium. When they reached a turbidity of 80 Klett units the culture was divided and growth was continued in the same 0.5 mM- NH_4Cl medium (O) or in 15 mM- NH_4Cl medium (●). Samples were taken at appropriate intervals, washed, and tested for 6 μM - ${}^{14}\text{C}_3\text{NH}_3$ uptake.

Table 1. Effect of inhibitors on ${}^{14}\text{C}_3\text{NH}_3$ uptake by *E. coli*

E. coli MX614 cells were grown aerobically on glucose-glutamine NN medium. When they reached a turbidity of 100 Klett units they were washed twice and assayed for 6 μM - ${}^{14}\text{C}_3\text{NH}_3$ uptake, as described in Methods. Inhibitors were added 5 min before reactions were started by addition of ${}^{14}\text{C}_3\text{NH}_3$. Results are the means of two experiments. ND, Not determined.

Addition	Uptake [nmol min^{-1} (g cell dry mass) $^{-1}$]		Percentage inhibition at pH 7.0
	pH 7.0	pH 9.0	
None	13.8	19.7	—
1 mM-KCN	0.9	ND	93.5
50 μM - NH_4Cl	0.4	ND	97.1
50 μM -L-Glutamate	12.8	ND	7.2
50 μM -L-Glutamine	0.3	ND	97.8

Table 2. Effect of nitrogen availability on the capacity of *E. coli* to synthesize a CH_3NH_3 transport system

See Table 1 for growth and assay conditions. Results are the means of three experiments \pm s.e.

Nitrogen source	${}^{14}\text{C}_3\text{NH}_3$ uptake [nmol min^{-1} (g cell dry mass) $^{-1}$]
15 mM- NH_4Cl	0.6 \pm 0.1
0.5 mM- NH_4Cl	01.0 \pm 0.3
6.8 mM-L-Glutamine	16.0 \pm 3.9
15 mM- NH_4Cl + 6.8 mM-L-Glutamine	11 \pm 0.3

Table 3. Glutamine synthetase activity and $^{14}\text{C}_3\text{NH}_3$ uptake by *E. coli* strains grown under nitrogen limiting or excess conditions

Strains were grown under nitrogen limiting (6.8 mM-glutamine) or excess (15 mM- NH_4Cl) conditions. See Table 1 and Methods for growth and assay conditions. Representative results from several experiments are shown.

Strain	Relevant genotype	Glutamine synthetase activity [nmol min ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]		$^{14}\text{C}_3\text{NH}_3$ uptake [nmol min ⁻¹ (g cell dry mass) ⁻¹]	
		15 mM- NH_4Cl	6.8 mM-L-glutamine	15 mM- NH_4Cl	6.8 mM-L-glutamine
MX614	Wild-type	150	1270	0.6	16.6
MX705	<i>glnA70</i>	NG	< 10	NG	0.2
MX727	<i>glnA71::Tn5</i>	NG	< 10	NG	0.4
MX852	<i>ΔglnA</i>	NG	< 10	NG	0.6
MX856	<i>glnL4</i>	NG	50	NG	0.5
MX902	<i>glnL274::Tn5</i>	50	50	ND	0.6
MX960	<i>glnL2::Tn5</i>	80	230	0.5	0.3
MX1019	<i>glnL3</i>	1160	1410	3.7	8.2
MX1029	<i>glnL2::Tn5 glnG85</i>	1170	2030	5.0	6.0
MX848	<i>glnF73::Tn5</i>	NG	< 10	NG	0.5
MX988	<i>gltB31</i>	110	260	ND	0.5

ND, Not done. NG, no growth.

excess conditions. None of the strains carrying mutations that lead either to the Gln⁻ or the Ntr⁻ phenotypes, or both, were able to activate synthesis of the $^{14}\text{C}_3\text{NH}_3$ transport system. The strains tested carried mutations in either *glnA*, *glnF*, *glnG* or *glnD*. This last mutation, by affecting the ability of *E. coli* cells to synthesize uridylyltransferase, leads to low levels of highly adenylated glutamine synthetase and to the Gln⁻ Ntr⁻ phenotypes (Bloom *et al.*, 1978). Strains MX705 and MX727 probably owe their Ntr⁻ phenotype to polarity effects exerted by their *glnA* mutations on *glnG* expression.

We also examined two strains with mutations in the *glnL* gene. One of these, MX1019, carries the *glnL3* mutation which we assume is non-polar to *glnG* due to its ability to exhibit the GlnC and NtrC phenotypes. The other strain, MX960, carries the *glnL2::Tn5* mutation which seems to be polar to *glnG* as suggested by its GlnR and Ntr⁻ phenotypes. MX960 cells were unable to activate synthesis of the $^{14}\text{C}_3\text{NH}_3$ transport system whereas MX1019 cells did so (Table 3). Moreover, MX1019 cells built up a capacity to transport $^{14}\text{C}_3\text{NH}_3$ under both nitrogen limitation or excess, i.e. they were constitutive for $^{14}\text{C}_3\text{NH}_3$ transport as well as for glutamine synthetase (Table 3).

A mutation tightly linked to *glnL2::Tn5* was isolated in strain MX960. The new strain, MX1029, carried in addition to *glnL2::Tn5* a secondary mutation tentatively termed *glnG85* which probably acts by relieving the polarity exerted by *glnL2::Tn5* on *glnG* (J. C. Urbina & F. Bastarrachea, unpublished results). MX1029 turned out to be GlnC and NtrC, and thus constitutive for both $^{14}\text{C}_3\text{NH}_3$ transport and glutamine synthetase (Table 3). Whether *glnG85* affects a *glnG* regulatory region or creates a strong promoter within Tn5 in MX1029 cells, has not been determined.

In *E. coli*, the *gltB* gene which maps at minute 68 of the standard map (Pahel *et al.*, 1978) is said to code for glutamate synthase [L-glutamate:NADP⁺ oxidoreductase (transaminating), EC 1.4.1.13]. Cells carrying the *gltB* mutation were also unable to activate synthesis of their $^{14}\text{C}_3\text{NH}_3$ transport system. These results are in agreement with previous ones (Pahel *et al.*, 1978) showing that *gltB* mutants of *E. coli* fail to grow or grow poorly on NH_4^+ ion concentrations lower than 0.1 mM or on nitrogen sources such as arginine or proline, i.e. they are Ntr⁻.

It is known that *gltB* mutations are suppressed to Ntr⁺ by *glnL* secondary mutations (Pahel *et al.*, 1978). Interestingly, while the *glnL2::Tn5* mutation alone was unable to suppress the Ntr⁻ phenotype conferred by the *gltB31* mutation, it did so in combination with *glnG85* as well as did *glnL3* (data not shown). The *glnG85* mutation apparently allows synthesis of the *glnG* product in a constitutive manner (J. C. Urbina & F. Bastarrachea, unpublished results). Mutations

leading to *glnG* constitutivity provide *E. coli* cells with a potential constitutivity for all Ntr regulated systems (NtrC), since the other product required for activation, the *glnF* product, is naturally constitutive (Castano & Bustarache, 1984).

All the ¹⁴CH₃NH₂ uptake assays described in Table 3 were carried out at pH 7.0. The fact that strains MX902 (*glnG74::Tn5*) and MX988 (*gltB31*) failed to take up ¹⁴CH₃NH₂ at pH 9.0 (specific activities of 0.8 and 1.7, respectively, data not shown), apparently indicates that the same carrier is responsible for the transport of ¹⁴CH₃NH₂ at either pH value.

Collectively these results provide good evidence that the products of *glnG* and *glnF* are required to activate expression of the ¹⁴CH₃NH₂ carrier system, and that a functional *glnL* product is necessary to achieve its repression. They also suggest that a functional *glnL* product is not necessary for its activation.

DISCUSSION

Our results confirm and extend those of a previous report by Stevenson & Silver (1977) on the capacity of *E. coli* cells to express an energy-dependent concentrative uptake system for ¹⁴CH₃NH₂. Moreover, the results show that this system is activated by growth of cells under nitrogen limitation and repressed under conditions of nitrogen excess. Synthesis of the ¹⁴CH₃NH₂ carrier showed a strict dependence for *de novo* polypeptide synthesis, as demonstrated by its inhibition by chloramphenicol. Once activated, ¹⁴CH₃NH₂ uptake could be inhibited by NH₂ ions but not by glutamate. Surprisingly, ¹⁴CH₃NH₂ uptake was also inhibited by glutamine. Further evidence suggested that ¹⁴CH₃NH₂ does not enter the cells via the high affinity glutamine transport system. Glutamine inhibition of ¹⁴CH₃NH₂ uptake is difficult to explain on the basis of a structural similarity between these compounds that would allow their competition for binding at the carrier molecule. On the other hand, if we invoke the formation of a metabolic product of glutamine as responsible for the inhibition, an immediate mol per mol conversion of glutamine into NH₂ ions (and glutamate) should take place in order for cells to attain the 0.05 mM external concentration required to inhibit ¹⁴CH₃NH₂ transport by 90% (Table 1). The fact that glutamine acts as a nitrogen limiting substrate for activation of expression of ¹⁴CH₃NH₂ transport further suggests that a high external concentration of NH₂ ions is not built up by *E. coli* cells when they are grown on 6.8 mM-glutamine (1 mg ml⁻¹) as the only nitrogen source. If such were the case, they would be unable to activate their ¹⁴CH₃NH₂ transport system under this condition. More experimentation is required to explain the nature of the inhibition of ¹⁴CH₃NH₂ uptake by glutamine.

Results presented in Tables 2 and 3 show that in wild-type *E. coli* cells synthesis of both glutamine synthetase and ¹⁴CH₃NH₂ transport are simultaneously activated by nitrogen limitation and repressed by conditions of nitrogen excess. By use of mutants affected in Ntr regulation we demonstrated that both *glnG* and *glnF* products are required to activate synthesis of the ¹⁴CH₃NH₂ transport system. The results also show that the *glnL* product is required for its repression. Mutation *glnL3* or the combination *glnL2::Tn5-glnG85* leads to constitutivity of both glutamine synthetase and ¹⁴CH₃NH₂ transport. Even though strains MX1019 (*glnL3*) and MX1029 (*glnL2::Tn5-glnG85*) were constitutive, they were unable to attain full derepression for both ¹⁴CH₃NH₂ uptake and glutamine synthetase, particularly when grown on 15 mM-NH₂ medium (Table 3). An explanation for this is not available. It could be related to the fact that the control region of the *glnALG* operon has three potential promoters (Covarrubias & Bustarache, 1983), the functionality of which have not been ascertained. We still do not know how they respond to different physiological conditions or to qualitative and quantitative changes of the *glnG* and *glnL* regulatory proteins.

Finally, we found that MX988 cells carrying the *gltB31* mutation are also impaired in their ability to activate expression of ¹⁴CH₃NH₂ transport and to derepress glutamine synthetase fully (Table 3). These results were expected, since *gltB* mutants are known to be affected in their ability to synthesize glutamate synthase, to be phenotypically Ntr⁻ (Pahel *et al.*, 1978) and unable to increase their levels of glutamine synthetase in response to nitrogen limitation (Magasanik, 1982). The inability of *gltB31* cells to activate synthesis of their ¹⁴CH₃NH₂

transport system strongly suggests this, rather than the high substrate K_m values of glutamate dehydrogenase (Tyler, 1978), as the most likely explanation for their inability to grow on low NH_4^+ ion concentrations. The reasons for the failure of cells carrying *glbB* mutations to activate other Ntr regulated systems, however, is still unknown.

We are grateful to J. C. Urbina and A. Osorio for some of the glutamine synthetase activity determinations, and to David G. Patriquin for his review of the manuscript. This work was supported in part by a research grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico).

REFERENCES

- BETTERIDGE, P. R. & AYLING, P. D. (1976) The regulation of glutamine transport and glutamine synthetase in *Salmonella typhimurium*. *Journal of General Microbiology* **95**, 324-332.
- BLOOM, F. R., LEVIN, M. S., FOOTE, I. & TYLER, H. (1978) Regulation of glutamine synthetase formation in *Escherichia coli*: characterization of mutants lacking widely distributed genes. *Journal of Bacteriology* **134**, 569-577.
- BROWN, C. M. (1980) Ammonia assimilation and utilization in bacteria and fungi. In *Microorganisms and Nitrogen Sources*, pp. 511-535. Edited by J. W. Payne. Chichester: John Wiley & Sons.
- DE BRUIN, F. J. & ASSUMEL, F. M. (1981) The cloning and transposon Tn5 mutagenesis of the *gluA* region of *Klebsiella pneumoniae*: identification of *gluR*, a gene involved in the regulation of the *nit* and *hut* operons. *Molecular and General Genetics* **183**, 289-297.
- CASTAÑO, I. & BASTARRACHIA, F. (1983) *gluZ* fusions in *Escherichia coli*: studies on *gluZ* expressions and its chromosomal orientation. *Molecular and General Genetics* **198**, 225-234.
- CHEN, Y.-M., BACKMAN, K. & MAGANANIK, B. (1982) Characterization of a gene, *gluZ*, whose product is involved in the regulation of nitrogen utilization in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **150**, 214-220.
- COVARRUBIAS, A. A. & BASTARRACHIA, F. (1983) Nucleotide sequence of the *gluZ* control region of *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics* **190**, 171-175.
- COVARRUBIAS, A. A., SANCHEZ-PENCADOR, R., OSORIO, A., BOLLIVAR, F. & BASTARRACHIA, F. (1980) Coli hybrid plasmids containing *Escherichia coli* genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine. *Plasmid* **3**, 140-164.
- ESPINE, G., ALVAREZ-MORALES, A. & MERRICK, M. (1981) Complementation analysis of *gluA*-linked mutations which affect nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae*. *Molecular and General Genetics* **184**, 213-217.
- KLEINER, D. (1981) The transport of NH_4^+ and NH_2^+ across biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **636**, 41-52.
- KLEINER, D. (1982) Ammonium (methylammonium) transport by *Klebsiella pneumoniae*. *Biochimica et Biophysica Acta* **688**, 702-708.
- KUSTU, S. G., MCFARLAND, N. C., HUL, S. P., FESON, B. & AMES, G. F. (1979a) Nitrogen control in *Salmonella typhimurium*: co-regulation of synthesis of glutamine synthetase and amino acid transport systems. *Journal of Bacteriology* **138**, 218-234.
- KUSTU, S., BURTON, D., GARCIA, E., MCCARTER, I. & MCFARLAND, N. (1979b) Nitrogen control in *Salmonella*: regulation by the *gluR* and *gluZ* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4576-4580.
- MAGANANIK, B. (1982) Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Annual Review of Genetics* **16**, 135-168.
- MCFARLAND, N., MCCARTER, I., ARTZ, S. & KUSTU, S. (1981) Nitrogen regulatory locus *gluR* of enteric bacteria is composed of domains *nitB* and *nitI* and identification of their products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 2138-2140.
- OSORIO, A., SERVÍN-GONZÁLEZ, L., RIVERA, M., COVARRUBIAS, A. A. & BASTARRACHIA, F. (1984) *gluZ* dominant, glutamine synthetase constitutive mutations of *Escherichia coli* independent of activation by the *gluA* and *gluK* products. *Molecular and General Genetics* **194**, 114-123.
- OW, D. W. & ASSUMEL, F. M. (1981) Regulation of nitrogen metabolism genes by *nitI* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature London* **301**, 407-410.
- PAHEL, G., ZELLENZ, A. D. & TYLER, H. (1978) *glbB* gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **133**, 139-148.
- PAHEL, G., ROTHSTEIN, D. M. & MAGANANIK, B. (1982) Complex *gluA* *gluZ* *gluB* operon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **150**, 702-713.
- PENG, C. T. (1977) *Sample Preparation in Liquid Scintillation Counting*. Amersham, U.K.: Amersham International.
- STEVENS, R. & SILVER, S. (1977) Methionine uptake by *Escherichia coli*: evidence for a bacterial NH_2^+ transport system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **78**, 1183-1189.
- STREICHER, S. L., SHAMMIGAN, K. T., ASSUMEL, F., MORANDI, C. & GOLDBERG, R. H. (1974) Regulation of nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae*: evidence for a role of glutamine synthetase as a regulator of nitrogenase synthesis. *Journal of Bacteriology* **120**, 815-821.
- STENDERAS, V., OW, D. W. & ASSUMEL, F. M. (1983) Activation of *Klebsiella pneumoniae* and *Rizobium meliloti* nitrogenase promoters by *gluZ* (*nitZ*) regulatory proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**, 4030-4034.
- TYLER, H. (1978) Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Annual Review of Biochemistry* **47**, 1127-1162.
- WEI, G. R. & KUSTU, S. (1981) Glutamine auxotrophs

with mutations in a nitrogen regulatory gene, *ntrC*, that is near *glnA*. *Molecular and General Genetics* 183, 392-399.

- WEINER, J. H. & HEPPEL, L. A. (1971). A binding protein for glutamine and its relation to active transport in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 246, 6931-6941.
- WILLI, R. C., IWATA, K. K. & FURLONG, C. E. (1975). Regulation of glutamine transport in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 122, 1032-1037.