

1
26



**Universidad Nacional Autónoma
de México**

**Unidad Académica de los Ciclos
Profesionales y de Postgrado del C.C.H.**

**“Regulación de la degradación del ácido
glutámico por glicina en S. cerevisiae”**

T E S I S

**Que para obtener el Grado de
Licenciado en Investigación Biomédica Básica
p r e s e n t a**

SAUL ROGELIO GUERRERO GALVAN

México, D. F.

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INTRODUCCION

Saccharomyces cerevisiae es un hongo ascomiceto que es utilizado como modelo de estudio en una gran variedad de áreas de la biología, como son la genética, la fisiología y la biología molecular, por su fácil manipulación experimental.

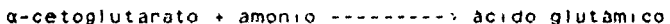
El interés en el estudio de este hongo en particular, se debió, en un principio, a su capacidad de fermentar y producir alcohol. En los inicios de este siglo se observó que un extracto libre de células proveniente de este hongo, podía llevar a cabo la fermentación alcohólica; el fraccionamiento posterior del extracto permitió la identificación de las enzimas individuales involucradas, de sus coenzimas específicas, los sustratos y productos de ellas.

Para la sobrevivencia de la levadura, ésta debe de elaborar un gran número de sustancias como lo son constituyentes estructurales, los medios para la producción de energía y la reproducción, por esto, el nitrógeno es un elemento fundamental para los seres vivos ya que lo requieren para sintetizar moléculas indispensables como son las proteínas y los ácidos

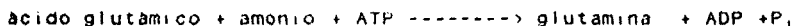
nucleicos.

ASIMILACION DE AMONIO

En el medio ambiente natural de la levadura, (fruta y vegetales en descomposición), el nitrógeno es obtenido de un amplio espectro de compuestos nitrogenados, que son desde compuestos sencillos como las sales, hasta macromoléculas como los ácidos nucleicos y las proteínas. La levadura, en respuesta a esta amplia gama de compuestos que le sirven como fuente de nitrógeno, posee diversas vías de degradación que le permiten llevarlos a sus componentes más sencillos y finalmente hasta amonio. El amonio es asimilado entonces por la actividad de glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP (GDH-NADP) y por la glutamina sintetasa; la primera cataliza la reacción:



-La glutamina sintetasa cataliza la siguiente reacción:



Así pues, la degradación de los compuestos nitrogenados que las células utilizarán para su crecimiento, debe de ser tal que aportén amonio libre para su posterior asimilación en ácido glutámico y glutamina; ya que el nitrógeno celular en su totalidad es distribuido por transaminar y transamidar con estos amino ácidos.

UTILIZACION DE FUENTES ORGANICAS DE NITROGENO

La degradación de proteínas conduce a la obtención de aminoácidos, que son en su mayoría fuentes de nitrógeno para la levadura. En condiciones experimentales y con el objeto de estudiar la degradación de los aminoácidos, la levadura se puede cultivar en algún aminoácido como única fuente de nitrógeno.

El tiempo de duplicación de la levadura cultivada en algún aminoácido como única fuente de nitrógeno, es característico para cada uno de ellos, llamándose buenas fuentes de nitrógeno (fuentes de nitrógeno primarias) a aquellos aminoácidos en los cuales el tiempo de duplicación es similar al encontrado en amonio, y fuentes de nitrógeno pobres (fuentes de nitrógeno secundarias) a aquellos en que el tiempo de duplicación es grande ó la levadura no crece.

Para considerar un compuesto nitrogenado como una buena fuente de nitrógeno, este debe tener atributos como :1.-Transportarse rápidamente al interior de la célula,2.-Degradarse en pocos pasos a ácido glutámico y/o amonio, y 3.- No tener efectos tóxicos sobre la célula (Cooper T.G. 1980).

La regulación de la degradación de los compuestos nitrogenados es llevada a cabo por varios mecanismos, como son: la represión catabólica nitrogenada, la exclusión del inductor y la regulación

de las enzimas específicas para la degradación de un determinado compuesto.

REPRESION CATABOLICA NITROGENADA

Cuando se cultiva una levadura en una combinación de fuentes de nitrógeno, primero se utilizan aquellas que están consideradas como las mejores (fuentes de nitrógeno primarias) a esta observación se le denomina represión catabólica nitrogenada.

La degradación de los compuestos nitrogenados sujetos a represión catabólica ha sido estudiada en *Saccharomyces cerevisiae*; la presencia de amonio, ácido glutámico, asparagina o glutamina en el medio de cultivo, consideradas como las mejores fuentes de nitrógeno, no permite la inducción de las vías de degradación de alantoina, prolina y arginina, consideradas como fuentes de nitrógeno pobres (fuentes de nitrógeno secundarias) (Cooper T.G., 1980; Cooper y Sumrada, 1983).

La naturaleza del efector (correpresor) de la represión catabólica en *Saccharomyces cerevisiae* no ha sido aclarada, pero se piensa -y hay datos que así lo sugieren- que al igual que en *Neurospora crassa* pudiera ser la glutamina (Kang et al, 1982; Marzluf, 1981; Davis, 1986).

En *Neurospora crassa* el efector de la represión catabólica nitrogenada ha sido identificado, siendo este una proteína

nuclear, no histona que tiene afinidad por ADN y por glutamina; esta proteína se encuentra alterada en algunas mutantes que están afectadas de manera general en represión catabólica nitrogenada como en el caso de la denominada nit-2 (Grove, G. et al, 1981).

En *Saccharomyces cerevisiae* se han reportado mutaciones que alteran la represión catabólica nitrogenada, una de ellas denominada gdhCR provoca la desrepresión de algunas vías de degradación (Dunlop et al, 1980). Algunos autores sugieren por estos datos la existencia de un represor general y que la mutación se encuentra en el mismo (Dubois y Grenson, 1976). Otra mutación denominada argNmr afecta también la acción de la represión catabólica nitrogenada pero exclusivamente para la vía de degradación de arginina (Middlehoven, 1981).

Por esto se puede decir que la represión catabólica nitrogenada en *Saccharomyces cerevisiae* posee mecanismos generales y particulares para ser llevada a cabo.

EXCLUSIÓN DEL INDUCTOR

El mecanismo denominado exclusión del inductor, se refiere, como su nombre lo indica, a la exclusión en la entrada que ejerce una fuente de nitrógeno sobre otra. Dado que la inducción de las vías de degradación de algunas fuentes de nitrógeno secundarias,

como la arginina y la alantoina, esta sujeta a la presencia de estas fuentes en el interior de la célula, las enzimas degradativas están en este caso reprimidas por ausencia de su inductor (Deschamps et al ,1979). Como este mecanismo forma parte de la represión catabólica nitrogenada ,son las buenas fuentes de nitrógeno las que impiden el transporte de las fuentes pobres. En *Saccharomyces cerevisiae*, se ha reportado la existencia de una permeasa general para el transporte de aminoácidos que se reprime irreversiblemente por amonio, ácido glutámico y glutamina (Courchesne y Magasanik, 1983) . De igual manera, las permeasas específicas para arginina y prolina son reprimidas por amonio (Grenson et al,1970) .

REGULACION DE LA DEGRADACION DE GLUTAMINA (fuente de nitrógeno primaria)

En la levadura la glutamina, fuente de nitrógeno primaria y represiva de la degradación de fuentes secundarias de nitrógeno,es degradada (para la asimilación de su nitrógeno) por dos actividades de glutaminasa (que catalizan la hidrólisis de glutamina dando como productos ácido glutámico y amonio). Una de ellas es una enzima soluble y la otra se encuentra asociada a membrana. La actividad de glutaminasa soluble se regula negativamente por α -cetoglutarato, piruvato y glioxalato.La

glutamina también es degradada por la transaminasa de glutamina . Esta cataliza la transferencia del grupo amino de la glutamina algún cetoácido dando como productos un aminoácido y 2-oxoglutarato (el cetoácido de glutamina); este último es hidrolizado a amonio y 2-oxoglutarato mediante una enzima llamada la α -amidasa. A esta vía se le conoce como la vía de la α -amidasa . La transaminasa de glutamina esta regulada positivamente por glutamina y negativamente por lisina y glicina. (Soberón, M. 1986) La transaminasa de glutamina utiliza como sustratos a los cetoácidos glioxalato y piruvato, que son inhibidores de la glutaminasa soluble esto sugiere que el funcionamiento de estas dos vías es excluyente y depende de la concentración de estos cetoácidos.

La utilización de glutamina en condiciones de microaerofilia es llevada a cabo por la vía de la α -amidasa y en presencia de fuentes fermentables y de oxígeno la utilización de esta es por la glutaminasa soluble Esto se postula en base a las siguientes evidencias (Soberón, M. 1986):

A) cuando se cultiva a la levadura en condiciones microaerofilicas, hay un aumento en la poza intracelular de piruvato, En esta condición la actividad de glutaminasa soluble es baja. Y B) una mutante afectada en esta enzima crece con un

tiempo de duplicación similar al de la cepa silvestre en condiciones microaerofilicas C) Se han aislado mutantes incapaces de crecer en glutamina como única fuente de nitrógeno en microaerofilia. Estas mutantes parecen estar alteradas en la Q-amidasa .

A las reacciones de transamidación en las cuales el donador de nitrógeno es la glutamina se les asigna, más que un papel degradativo de la glutamina, un papel biosintético para las moléculas a las cuales se une el grupo amido, ya que las enzimas que realizan las reacciones de transamidación están sujetas a inhibición por producto final. (Soberon, M. 1986)

REGULACION DE LA DEGRADACION DE ARGININA (fuente de nitrógeno secundaria) (diagrama 1)

La arginina una vez transportada al interior de la célula es hidrolizada inicialmente por una actividad de arginasa que da como productos ornitina y urea. Esta última es transformada por una actividad de urea carboxilasa a alofanato que a su vez es hidrolizado a CO_2 y Amonio.

La ornitina por su parte es degradada por una reacción de transaminación con α -cetoglutarato, llevada a cabo por la enzima ornitina transaminasa, dando como productos ácido glutámico y glutamato-r-semialdehído, éste espontáneamente se cicliza para

formar β -pirrolin-5-carboxilato, que a través de la enzima pirrolin-5-carboxilato reductasa, es transformado en prolina, la cual se degrada hasta ácido glutámico. Las actividades de arginasa y ornitina transaminasa se inducen en presencia de arginina.

En *Saccharomyces cerevisiae* se han reportado mutantes en la regulación de la vía de degradación de arginina. Una clase de estas mutantes son las denominadas argR que provocan una expresión constitutiva de arginasa y ornitina transaminasa. Otras tres clases de mutantes denominadas arg80, arg81 y arg82 tienen dos características fundamentales: (1) Producen las enzimas para la biosíntesis de arginina constitutivamente, y (2) son incapaces de utilizar arginina u ornitina como única fuente de nitrógeno. La vía de degradación de arginina, al igual que otras vías que degradan fuentes de nitrógeno secundarias, esta sujeta a la represión catabólica nitrogenada. Cuando la levadura se cultiva en amonio, glutamina o ácido glutámico la inducción de la vía de degradación de arginina no ocurre; la mutación gdhCR en este caso al igual que para otras vías de degradación de fuentes secundarias la libera de esta regulación. Otra mutación que afecta la represión catabólica nitrogenada para esta vía es la denominada argnmr la cual libera de la represión por amonio

glutámico o glutamina exclusivamente a esta vía.

REGULACION DE LA INTERCONVERSION:

ACIDO GLUTAMICO < ----- > AMONIO + α -CETOGLUTARATO

Saccharomyces cerevisiae asimila el amonio principalmente en ácido glutámico (Thomulka y Moat, 1972), que es además una buena fuente de nitrógeno (fuente primaria). Cuando se provee a este hongo de algún aminoácido como única fuente de nitrógeno, se observa que el ácido glutámico es el aminoácido que se encuentra en mayor concentración en el interior de la célula, después de aquel que se está proveyendo como fuente de nitrógeno (Watson, J.D. 1976). Esto puede deberse a que el ácido glutámico es una excelente molécula para almacenar nitrógeno, ya que a través de un solo paso enzimático provee amonio y por otra parte es el donador de nitrógeno en la síntesis de moléculas nitrogenadas junto con la glutamina. Sin embargo la acumulación de glutamina tiene efectos tóxicos en la célula; este efecto tóxico se puede deber a que este aminoácido regula negativamente la utilización de glucosa como fuente de carbono, aunque no queda excluido que el crecimiento celular este reprimido además en algún otro punto. (Soberon, M. 1986)

La síntesis del ácido glutámico también juega un papel muy importante en el balance de carbono-nitrógeno de la célula, ya

que es un aminoácido producto de la unión de una molécula de α -cetoglutarato (sintetizado en el ciclo de Krebs), a la cual se une el amonio, y de ahí, con la adición de otra molécula de amonio, se sintetiza glutamina. Ambos son los donadores universales de nitrógeno en la célula.

La interconversión de ácido glutámico a amonio y α -cetoglutarato, es llevada a cabo por dos actividades enzimáticas, de glutamato deshidrogenasa (GDH), una dependiente de NADP que cataliza la aminación reductiva del α -cetoglutarato y otra de NAD que cataliza la desaminación oxidativa del ácido glutámico. (Holzer y Schneider. 1957). A la primera se le ha asignado un papel anabólico (biosintético), ya que la actividad específica de esta enzima es más alta cuando se cultiva la levadura en amonio como única fuente de nitrógeno, y una actividad específica baja cuando se provee ácido glutámico como única fuente de nitrógeno. A la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD (GDH-NAD) se le ha asignado un papel catabólico (degradativo) por presentar la actividad específica más alta cuando se proporciona ácido glutámico como única fuente de nitrógeno y la actividad específica más baja cuando es provisto amonio como fuente de nitrógeno (Roon and Even 1973).

La actividad específica de ambas GDHs es afectada por amonio; en

el caso de la dependiente de NAD, un incremento en la concentración de amonio en el medio provoca un descenso en la actividad específica de esta enzima y, en la dependiente de NADP, provoca un aumento en la actividad específica. La regulación de estas enzimas por amonio no es clara; para el caso de la GDH-NADP, se observaron niveles altos cuando se cultiva en alantoína y urea (los cuales se degradan hasta amonio), pero es baja en arginina, asparagina y glutamina donde la degradación de estos compuestos provee cantidades equimolares de ácido glutámico y amonio (Roon and Even 1973).

La regulación de la actividad de GDH-NADP (anabólica) de *Saccharomyces cerevisiae* ha sido investigada. Hierholzer y Holzer (1963) reportaron que: la inducción de la actividad es igual en anaerobiosis que en aerobiosis; el incremento en la actividad específica se debe a la síntesis *de novo* de proteína; la presencia de glucosa en el medio de cultivo es esencial para la inducción; las actividades específicas más altas, se encuentran cuando se cultiva la levadura en amonio como única fuente de nitrógeno.

Regulación por carbono de las glutamato deshidrogenasas

La presencia de glucosa es un requisito para la inducción de la enzima de GDH-NADP. Mazon M. (1978) demostró que si a un cultivo

de levadura creciendo en medio mínimo amonio-glucosa se le transfiere a un medio mínimo amonio-sin glucosa, es decir, se priva de glucosa, la actividad de GDH-NADP decae rápidamente y la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD (GDH-NAD) aumenta su actividad entre cuatro y seis veces; por este dato, Hazon postula que las actividades de glutamato deshidrogenasas están reguladas por glucosa, de manera tal que la glucosa reprime la actividad de la catabólica (Hazon 1978).

La pérdida de la actividad de GDH-NADP al ayunar de glucosa a la levadura viene acompañada de una pérdida del antígeno en el extracto por lo que se postula que esta pérdida se debe a la degradación de la proteína (Hazon 1979)

La regulación de la actividad de GDH-NAD por el sistema de represión catabólica no es clara, y la existencia de la mutación gdhCR, la cual altera la represión catabólica nitrogenada de algunas vías degradativas incluyendo la GDH-NAD, sugiere que esta enzima está sujeta a este control (Drillen et al. 1976; Drillen y Lacroute, 1972). Por otro lado el hecho de que la actividad específica de la GDH-NAD sea la misma cuando se cultiva a la levadura en glutamina, asparagina o alantoina, siendo las dos primeras fuentes primarias de nitrógeno y la tercera una fuente secundaria pone en duda si la glutamato deshidrogenasa

dependiente de NAD está sujeta al sistema de represión catabólica . (Roon y Even 1973)

La glicina por su parte es considerada como mala fuente de nitrógeno para *Saccharomyces cerevisiae*, puesto que no es capaz de crecer cuando se presenta como única fuente de nitrógeno. Aún así este aminoácido es susceptible de ser degradado por dos vías, una llevada a cabo por un complejo enzimático de glicina descarboxilasa y da como productos al CO_2 y al amonio y otra por la interconversión de glicina a serina (Ulame y Ogur, 1972).

El fenómeno descrito en esta tesis, consiste en que aparentemente una fuente de nitrógeno pobre (secundaria), la glicina, está regulando negativamente la utilización de una buena fuente, el ácido glutámico (fuente de nitrógeno primaria), a través de impedir la degradación de éste.

RESULTADOS Y DISCUSION

Como se mencionó anteriormente la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de utilizar algunos aminoácidos como única fuente de nitrógeno. Cuando se cultiva a *Saccharomyces cerevisiae* en ácido glutámico como única fuente de nitrógeno, este entra a la célula y es degradado a α -cetoglutarato y amonio por la GDH dependiente de NAD. Esta degradación proporciona el amonio libre indispensable para el crecimiento. La cepa silvestre S288C presenta este comportamiento (Figura 1 A).

Esta reportado que *Saccharomyces cerevisiae* es incapaz de utilizar glicina como única fuente de nitrógeno (Cooper T.G. 1982), por lo que al incubar a esta levadura en esta condición, no hay crecimiento (figura 1 A) . Sin embargo al incubar a la cepa S288C en una combinación ácido de glutámico y glicina como fuentes de nitrógeno, esta no crece. Esto es sorprendente ya que aparentemente un aminoácido que no puede utilizarse como fuente de nitrógeno, la glicina, está impidiendo la utilización de uno que es una buena fuente , el ácido glutámico. Este hecho sugiere

que la glicina esta regulando de alguna manera la utilización del ácido glutámico como fuente de nitrógeno.

Para tratar de aclarar a qué nivel la glicina interfiere con la utilización del ácido glutámico se formularon las siguientes hipótesis alternativas :

A)La glicina interfiere con la utilización del ácido glutámico por impedir su transporte.

B)La glicina permite el transporte del ácido glutámico pero impide su degradación en el interior de la célula.

Con el fin de distinguir entre estas dos alternativas, se determinó la poza intracelular de ácido glutámico y se cuantifico la actividad específica de la deshidrogenasa de ácido glutámico. Los datos presentados en la figura 1B indican que el ácido glutámico es transportado al interior de la célula en presencia de glicina, lo cual descarta la primera hipótesis.

Esto además contrasta con lo observado cuando se crece a la cepa en ácido glutámico como única fuente de nitrógeno (SN ácido glutámico), en donde se observa que este aminoácido se transporta al interior de la célula y es degradado. (Figura 1 B).

En la figura 1 C se muestra la actividad específica de GDH-NAD, en células cultivadas en SN ácido glutámico y en ácido glutámico-glicina . Como se observa en la figura 1 C, la

actividad específica de GDH-NAD en SN ácido glutámico , se incrementa, teniendo un nivel máximo a las 12 horas y decayendo posteriormente. En cambio, si se determina la actividad específica de GDH-NAD en células que se han incubado en ácido glutámico-glicina, se obtienen valores muy bajos o no detectables. Probablemente la falta de crecimiento en ácido glutámico-glicina se debe a la ausencia de actividad de la GDH-NAD, ya que aún habiendo nitrógeno presente dentro de la célula (como ácido glutámico), éste no es degradado para dar amonio libre. Este hecho sugiere que la glicina directa o indirectamente está regulando negativamente la degradación del ácido glutámico, permaneciendo su transporte aparentemente normal (Figura 1).

La ausencia de actividad de GDH-NAD en células cultivadas en ácido glutámico-glicina, no se debe a que la glicina sea un inhibidor de esta actividad, ya que la actividad permanece constante aún en presencia de glicina a una concentración de 0.2M en la mezcla de reacción. (resultado no mostrado).

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UNA MUTANTE GLICINA RESISTENTE

Con el fin de estudiar este fenómeno más a fondo se aisló una mutante a partir de la cepa silvestre S288C, (ver materiales y métodos). Esta cepa es capaz de crecer en ácido glutámico-glicina. Esta cepa se obtuvo buscando colonias de rápido crecimiento en

este medio.

Esta mutante, denominada G 2, es incapaz de crecer en glicina como única fuente de nitrógeno, al igual que la silvestre. Esto descarta que la capacidad de la cepa mutante para crecer en un medio de ácido glutámico-glicina se deba a que pueda utilizar la glicina como única fuente de nitrógeno (figura 2 A). En el grupo se ha aislado una mutante capaz de crecer en ácido glutámico-glicina la cual puede crecer en glicina como única fuente de nitrógeno (Segal y Gonzalez, en preparación).

La caracterización inicial de la cepa mutante G 2, consistió en hacer una curva de crecimiento, determinar la actividad enzimática de GDH-NAD y la poza intracelular de ácido glutámico cuando éste se provee como única fuente de nitrógeno. Como se observa en la figura 2 A, el crecimiento de la cepa mutante es similar al de la cepa silvestre cuando se le cultiva en este medio. En la figura 2 B se muestra la poza intracelular de ácido glutámico, ésta presenta valores máximos más grandes que los de la cepa silvestre, sin embargo, las variaciones observadas de esta poza en la cepa silvestre son debidas probablemente a que la capacidad de transporte de las levaduras es variable. Esto nos hace suponer que esta diferencia que se observa en las pozas no es significativa. En la figura 2 C se muestra la actividad

especifica de la GDH-NAD en los extractos obtenidos de células cultivadas en SN ácido glutámico. Como se observa, en la figura 2 C esta actividad presenta una cinética y valores similares a los que muestra la cepa silvestre S288C en esta condición (figura 1 C). Por tanto se puede concluir que la mutante G 2 y la silvestre S288C de la cual se deriva, se comportan de manera similar cuando se cultivan en este medio, ya que la velocidad de crecimiento, los niveles de inducción de la actividad específica de la GDH-NAD y la capacidad de transporte del ácido glutámico son similares figuras 1 y 2.

Con el fin de averiguar a qué se debe que la cepa mutante sea capaz de crecer en ácido glutámico-glicina, se planteó como primera hipótesis que la capacidad de crecer vendría acompañada con una inducción en la actividad de la glutámico deshidrogenasa dependiente de NAD (GDH-NAD), ya que como se mencionó anteriormente, esta cepa es, al igual que la cepa silvestre, incapaz de utilizar glicina como única fuente de nitrógeno (Figura 2 A), y debido a que la actividad de la GDH-NAD es la que provee el amonio libre indispensable para el crecimiento, debe de estar presente. Porque como se mencionó en la introducción, el nitrógeno para ser asimilado necesita encontrarse en forma de amonio libre.

Con el fin de corroborar o descartar esta hipótesis, se determinaron las actividades específicas de GDH-NAD en extractos celulares obtenidos a partir de células crecidas en la combinación ácido glutámico-glicina.

Como se muestra en la figura 2 C, el crecimiento en glutámico glicina que presenta la cepa G 2 viene acompañado con una capacidad de inducir la actividad de GDH-NAD, por lo cual se puede afirmar que, en el caso de la mutante, la inducción de la actividad de la GDH-NAD explica su capacidad de crecer en el medio de ácido glutámico más glicina.

Como se observa en la figura 2, la cepa G 2 alcanza su nivel máximo de inducción de GDH-NAD a las quince horas, por tal motivo se cultivó a esta cepa por un tiempo más largo. Como se observa en la figura 3 A, el crecimiento de esta cepa viene acompañado con una inducción de la actividad de GDH-NAD a niveles en los que se encuentra cuando se provee ácido glutámico como única fuente de nitrógeno (tanto en la silvestre como en la mutante) por lo que se puede decir que esta actividad de GDH-NAD es insensible a la presencia de glicina en el medio de cultivo. Así, esta capacidad de crecer en el medio ácido glutámico glicina acompañada con la inducción de la GDH-NAD, supone que el efecto que ejerce la glicina sobre esta actividad enzimática ha sido afectada por la

mutación.

El ácido glutámico es consumido para el crecimiento, mientras la poza de glicina permanece constante (figura 4).

Ahora bien, si la cepa S288C se cultiva en la combinación de ácido glutámico y glicina por un tiempo mayor de 24 horas, se observa que la cepa es capaz de crecer después de un periodo lag de entre 24 y 30 horas (figura 4). Esta observación, nos condujo a plantear las siguientes hipótesis:

A) La capacidad de la cepa silvestre de crecer en ácido glutámico más glicina después de un periodo lag, se debe, como en el caso de la cepa mutante, a que es capaz de inducir la actividad de GDH-NAD y, por lo tanto, degradar el ácido glutámico a amonio y α -cetoglutarato y de esta manera crecer, o

B) La capacidad que tiene para crecer la cepa silvestre se debe a alguna otra estrategia, que incidiera en la capacidad de utilizar glicina como fuente de amonio.

Para distinguir entre estas dos hipótesis alternativas, se determinaron las pozas de ácido glutámico y de glicina, y la actividad específica de GDH-NAD a los extractos obtenidos a diferentes puntos a lo largo del crecimiento. Como se observa en la figura 4, el ácido glutámico y la glicina son degradados y se detectan niveles bajos de la actividad de GDH-NAD.

La degradación del ácido glutámico en estas condiciones de cultivo, en los cuales la actividad de GDH-NAD se encuentra a niveles muy bajos, hace suponer que la degradación de este compuesto es conducida por otras vías, probablemente por transaminación y/o glutamino sintetasa y debido a esto ácido glutámico no está aportando amonio libre.

Por otro lado, como se observa la glicina es sujeta a degradación durante el crecimiento; esto debe ser lo que provee el amonio libre indispensable para que la cepa crezca. Este dato sugiere que la glicina es fuente de nitrógeno para la levadura, pero que su degradación y/o utilización no es posible cuando se le provee como única fuente.

Como se puede observar en la figura 3 la cepa mutante G 2, al contrario de la cepa silvestre S288C, no degrada la glicina cuando crece en ácido glutámico-glicina. Este hecho confirma que la razón por la cual crece la cepa mutante es por que es capaz de inducir su GDH-NAD y a través de ésta obtener el amonio necesario para crecer.

Resumiendo: 1. La glicina tiene un efecto negativo sobre la actividad de GDH-NAD, 2. En la cepa mutante este efecto no se presenta ya que la cepa crece antes que la cepa silvestre en el medio de ácido glutámico-glicina al inducirse esta enzima y por

ende degradar el ácido glutámico .3. La cepa silvestre S288C es capaz de crecer después de un periodo lag más prolongado en este medio por degradar la glicina (figura 4).

Para determinar si la glicina o algún producto de su degradación es la causa del fenómeno descrito en esta tesis; se incubó a las cepas silvestre (S288C) y mutante (G 2) en un medio mínimo sin nitrógeno complementado con ácido glutámico, y con glioxilato, ya que este es el cetoácido de la glicina.

Como se observa en la figura 5, tanto la silvestre como la mutante son incapaces de crecer en este medio, aún a tiempos muy largos de incubación. Esto hace pensar que el glioxilato tiene, al igual que la glicina, un efecto sobre el crecimiento cuando se provee ácido glutámico como única fuente de nitrógeno, pero el hecho de que la mutante sea incapaz de crecer sugiere que este efecto es distinto al de la glicina. Teniendo el antecedente de que este cetoácido inhibe *in vitro* a la glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP (GDH-NADP) (González et al 1987) se le hizo una cinética de inhibición con glioxilato a la GDH-NAD y, como se muestra en la figura 6, este cetoácido inhibe a la enzima.

Para averiguar si la cepa G 2 es una mutante estructural en GDH-NAD, se hicieron curvas de termosensibilidad (como se describe en los materiales y metodos). En la figura 7 se muestran las

cinéticas de pérdida a 55 °C de las GDH-NAD provenientes de cultivos de ambas cepas en SN ácido glutámico ; como se observa, ésta es idéntica para las dos cepas. Esto sugiere que la mutación presente en la cepa G 2 es tal, que la GDH-NAD no está afectada en su estructura.

Con el fin de averiguar a que nivel podría estar la glicina actuando. Se hicieron curvas de termosensibilidad a la GDH-NAD provenientes de un cultivo en ácido glutámico-glicina de las cepa silvestre .En la figura 7, se muestran los datos. Como se ve, la cinética es distinta a la mostrada por esta enzima cuando proviene de células crecidas en SN ácido glutámico. Esto conduce a pensar que el efecto que está ejerciendo la glicina sobre la actividad de GDH-NAD, es a un nivel tal, que provoca un cambio en la estructura de la enzima.

Probablemente se deba a este cambio de estructura, el hecho de que la actividad específica sea baja, cuando se cultiva a la cepa en el medio ácido glutámico-glicina, aunque esto no descarta la posibilidad de que la regulación de la expresión de la actividad a nivel genético, este jugando algún papel.

Teniendo como antecedentes: 1) que la enzima GDH-NAD, esta probablemente regulada a nivel postraducciona l por la glicina, y 2) que la sensibilidad a la temperatura de la enzima de la cepa

mutante G 2 y la silvestre S288C cultivada en SN ácido glutámico, es idéntica.

Se hizo una curva de termosensibilidad a la actividad de GDH-NAD presente en extractos celulares de la cepa mutante G 2 cultivada en el medio de ácido glutámico-glicina.

En la figura 7, se muestra la cinética de pérdida de la actividad de GDH-NAD de la cepa mutante G 2 cultivada en ácido glutámico-glicina. Como se observa, esta es diferente tanto a la cinética de la misma cepa pero cultivada en SN ácido glutámico, así como para la de la cepa silvestre cultivada en ácido glutámico-glicina. Esto hace pensar que la mutación presente en la cepa G 2 es tal, que altera la estructura de la enzima con respecto a la de la cepa silvestre, cuando la cepas son cultivadas en ácido glutámico-glicina.

Así, del conjunto de datos obtenidos de la sensibilidad a la temperatura de la enzima glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD (GDH-NAD) de ambas cepas y en las diferentes condiciones de cultivo, se puede concluir que:

- 1) La glicina regula muy probablemente a la GDH-NAD a nivel postraducciona;l;
- 2) La mutación presente en la cepa G 2, afecta de algún modo esta regulación. (ya sea alterando la estructura de la GDH-NAD o

bien, afectando de alguna manera este sistema de regulación)

En *Saccharomyces cerevisiae* hay reportadas mutantes en las actividades de glutamato deshidrogenasa. Estas pueden agruparse fenotípicamente en tres clases. En la tabla I se muestran estas clases. Las mutantes agrupadas en gdh₁, carecen de la actividad de GDH-NADP, estas se encuentran alteradas en la enzima a nivel estructural. (Cooper T.G. 1982).

Las mutantes agrupadas en gdhCR tienen alterada la regulación de ambas GDH's teniendo 30 veces más actividad de GDH-NAD y un tercio de la GDH-NADP que la cepa silvestre cuando se cultivan en amonio como fuente de nitrógeno; cuando se cultivan en SN ácido glutámico estas tienen entre tres y cuatro veces más actividad de la GDH-NAD y la mitad de la dependiente de NADP, comparadas con la cepa silvestre. Las gdhCR, son monogénicas y es por esta razón se dice que las actividades de glutamato deshidrogenasa tienen un elemento común de regulación genética (Drillen y Lacroute, 1972; Drillen et al 1973).

La tercera clase de mutantes, las gdhCS, poseen una actividad baja constitutiva de GDH-NAD a niveles semejantes a los encontrados cuando se provee amonio como única fuente de nitrógeno. Por lo que esta mutación está provocando un "congelamiento" en la represión de esta actividad, esta mutación

no altera la estructura de la GDH-NAD por lo que se supone que es regulatoria para esta actividad (Grenson et al ,1974).

Hay que hacer notar que en la literatura no se encuentran reportadas mutantes que alteren la estructura de la enzima GDH-NAD, es decir, todas las mutaciones reportadas en esta enzima están a nivel regulatorio.

Para tratar de establecer si la mutante G 2 pertenecía a algún grupo reportado de mutantes en las actividades de glutamato deshidrogenasa . Se determinaron las actividades específicas de GDH-NADP de extractos de células cultivadas en amonio o en SN ácido glutámico .

Las actividades de GDH-NADP de la cepa mutante G 2 y de la cepa silvestre S288C cultivadas en SN ácido glutámico, como se observa presentan valores similares, así como los datos obtenidos de ambas cepas cuando se proporciona amonio como única fuente de nitrógeno, (tabla II) por lo tanto se puede afirmar que la cepa mutante posee una actividad silvestre de GDH-NADP, descartando de esta manera que pudiera pertenecer al grupo de las mutantes gdhCR, así como a las gdhI .

Se determinó la actividad de GDH-NAD en extractos de células que fueron cultivadas en amonio como única fuente de nitrógeno. En este caso también, la cepa silvestre y la mutante son

indistinguibles bajo este parametro. Ademas como se mostro anteriormente la cinética y actividades de GDH-NAD en SN ácido glutámico como son similares para ambas cepas (figuras 1 y 2), descartando la posibilidad de que perteneciera al grupo de las gdhCS . Por lo tanto se puede concluir que la cepa mutante G 2 no pertenece a algún grupo de las mutantes reportadas.

El analisis genético de la cepa G 2 no fue posible, debido a que el fenotipo (la capacidad de crecer en ácido glutámico-glicina) no es claro en las cepas del laboratorio con el tipo de apareamiento opuesto.

La capacidad que tiene la cepa S288C para crecer en ácido glutámico-glicina es afectada por las condiciones del precultivo (cultivo de el cual se obtienen las células para inocular los experimentos): Si al inocular un medio que contenga ácido glutámico y glicina como unicas fuentes de nitrógeno se emplean células que provienen de un precultivo incubado por 12 horas en YPD se observa que la cepa no crece durante un tiempo aproximado de 24 horas ; si es inoculado de un precultivo en YPD con 24 horas de incubación, se observa que la duración del lag que precede al crecimiento en ácido glutámico-glicina es menor que en el caso anterior, y es aproximadamente de 15 horas.(figura 5)

La cepa mutante no presenta este comportamiento, es decir, la

duración del lag se mantiene constante independientemente de las condiciones del precultivo (Figura 8).

Con el objeto de precisar cual era la causa de la variación en el comportamiento de la cepa silvestre S288C en ácido glutámico-glicina con respecto a las condiciones del precultivo y teniendo como posibles causas de esta variación:

A) El estado de crecimiento en el que se encuentran las células al ser cosechadas para inocular (porque un cultivo con 12 horas está creciendo y uno de 24 horas se encuentra en un periodo estacionario) y B) la composición de el medio (debido a que está variando por el crecimiento celular).

Se realizó el siguiente experimento:

Se cosecharon células de un precultivo de 12 horas (condición en la cual al inocular un medio con la combinación de ácido glutámico-glicina el crecimiento se inicia aproximadamente a las 24 horas) y se incubaron en agua, en medio mínimo sin nitrógeno SN y en medio mínimo sin glucosa SG por 4 horas. Después de este tratamiento, las células se usaron para inocular medios de cultivo ácido glutámico-glicina.

Como muestra la figura 9 A, las células que fueron preincubadas en agua o en medio mínimo sin glucosa, crecieron antes que las preincubadas en ausencia de nitrógeno, esto condujo a pensar que

es la composición del medio y específicamente la cantidad de glucosa del medio del cual se obtienen las células para inocular, lo que está influenciando el comportamiento de la cepa silvestre, quedando descartada la velocidad de crecimiento de la cepa en el precultivo, ya que en los tres casos de preincubación la cepa no está creciendo, en el momento de ser cosechada para inocular el medio de ácido glutámico-glicina. Con el fin de corroborar esto, se cosecharon células de un precultivo en YPD de 24 horas (condición en la cual al inocular en la combinación ácido glutámico-glicina el crecimiento se inicia aproximadamente a las 24 horas) y se incubaron en un medio mínimo sin nitrógeno SN por una o cuatro horas y después de este tratamiento, se pusieron a incubarse en el medio ácido glutámico-glicina. Se observó que en aquellas que permanecieron durante cuatro horas en SN la duración del lag fue mayor que las que solo estuvieron una hora preincubándose en SN (figura 9 B). Como se puede observar en la figuras 8 y 9 B la duración del lag que presenta la cepa G 2 es constante, lo cual, corrobora que la cepa silvestre y la mutante crecen en el medio ácido glutámico-glicina por estrategias diferentes.

La observación de que el aumento en la duración del lag está en relación directa al tiempo de incubación en un medio mínimo

sin nitrógeno y con glucosa, conduce a pensar que este incremento refleja el hecho de que es al transportar al interior de la célula y/o degradar la glucosa lo que está provocando que la duración del lag sea mayor, probablemente por impedir la degradación de la glicina.

En la figura 10 se muestran las pozas de glicina de la cepa silvestre y de la mutante cuando son cultivadas en SN ácido glutámico. Como se puede observar tanto la S288C (cepa silvestre) como la cepa mutante G 2 acumulan glicina hasta aproximadamente las nueve horas, misma que después se degrada. Esta acumulación con su subsecuente degradación, ocurre sólo cuando las células con las cuales se inocula el cultivo provienen de un precultivo no saturado (con doce horas de incubación). Como se observa en la figura 10 si las células provienen de un precultivo saturado la aparición de glicina en el interior de la célula no ocurre. Esta variación puede deberse como en el caso de la duración del lag de la cepa silvestre a la cantidad y/o degradación de glucosa en el interior de la célula, (figuras 5 y 6). Por lo que podemos concluir que cuando se cultiva a la levadura en SN ácido glutámico se sintetiza una alta poza de glicina dado que hay una concentración y/o degradación alta de glucosa en el interior de la célula. Esto además explica el porqué la cepa G 2 no degrada

la glicina (figura 3) ya que al ser capaz de degradar ácido glutámico por GDH-NAD, y teniendo una alta concentración de carbono en el interior de la célula, sintetiza glicina al igual que cuando se utiliza SN ácido glutámico, y es por esta razón que la poza de glicina permanece constante. Aunque esto no descarta la posibilidad de que la cepa mutante por ser capaz de crecer antes que la cepa silvestre, este acabando con algún constituyente de el medio y sea esta la limitación para que la cepa mutante no degrade glicina para proseguir con su crecimiento.

Especulamos que la degradación del ácido glutámico, provee glicina de la siguiente manera:

El ácido glutámico al degradarse provee una alta poza de α -cetoglutarato al ciclo de krebs, lo cual provoca que se abra el ciclo del glioxilato (Galbraith; 1969)

El glioxilato da glicina por la reacción que cataliza la enzima alanina-glioxalato-aminotransferasa, la cual utiliza como sustratos alanina y glioxilato. Esta enzima puede utilizar además de alanina, al ácido glutámico como donador del grupo amino.

La glicina puede sintetizarse también, por la interconversión de serina a glicina (Ulane y ogur, 1972). Suponemos que la glicina que se sintetiza cuando se crece en ácido glutámico no es

producida por esta vía, por no encontrar serina en alguno de los puntos de el crecimiento.

El papel fisiológico de la regulación de la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD (GDH-NAD) por glicina, se vislumbra por el hecho de que al crecer a las células en SN ácido glutámico, se produce glicina, en la condición que la célula tiene una alta cantidad de carbono en su interior. Esto da pie a especular que la glicina, por ser producto de degradación del ácido glutámico cuando hay alto carbono, es una señal tal, que informa a la célula de que hay el suficiente nitrógeno para crecer y que además la concentración de carbono es alta por lo que la degradación del ácido glutámico, que provee α -cetoglutarato (carbono) y amonio (nitrógeno) debe detenerse y la forma de lograrlo es disminuyendo la actividad de glutamato deshidrogenasa.

La forma de disminuir la actividad de GDH-NAD es modificándola postraduccionalmente de manera que su actividad baje. En la cepa mutante G 2 esta modificación parece estar dañada por la mutación, por lo cual esta cepa es capaz de crecer en la combinación ácido glutámico-glicina.

El hecho de que la cepa silvestre crezca en ácido glutámico-glicina en ausencia de la actividad de GDH-NAD indica que la

glicina es fuente de nitrógeno para la levadura pero su utilización no es posible cuando se provee como única fuente, el por que de esto, sigue siendo una pregunta sin respuesta.

fin

MATERIALES Y METODOS

CEPAS:

La cepa silvestre S288C (mat alfa mal gal 2) proviene de los laboratorios de Cold Spring Harbor; Nueva York.

La cepa mutante G 2 se obtuvo a partir de la cepa silvestre como se describe adelante.

MEDIOS DE CULTIVO:

Para el crecimiento de precultivos (ver abajo) se utilizó medio YPD (Extracto de levadura 1 %, peptona de caseína 2 % y glucosa 2 %). El medio mínimo se preparó con sales, elementos traza y vitaminas siguiendo la fórmula de Difco yeast nitrogen base. Como fuente de carbono se utilizó glucosa al 2 %. La fuente de nitrógeno se adicionó según se explica en texto, para crecimientos en ácido glutámico (SN ácido glutámico) la concentración final fue 500 microgramos por litro; en amonio 40 mM de sulfato de amonio; para la combinación de ácido glutámico y glicina (ácido glutámico-glicina), el ácido glutámico se adicionó en la misma concentración que usa cuando se provee como única

fuelle y finalmente la glicina 50 mM, pero cuando fue utilizada glicina como fuente de nitrógeno se adicionó con 6.6 mM.

Los medios de incubación Sin Nitrógeno (S N) se prepararon como el medio mínimo sin adicionar fuente de nitrógeno; para el medio Sin Glucosa (S G) se utilizó la receta de medio mínimo pero sin adicionar glucosa.

CRECIMIENTOS:

La magnitud del crecimiento se midió a través de la determinación de la absorbancia de los cultivos a 650 nanómetros en un colorímetro.

Los cultivos se incubó a 30 grados Centígrados y a 200 RPM.

Precultivos e inoculación

Las células utilizadas para los crecimientos se obtuvieron precultivando la cepas en medio YPD durante distintos tiempos según se indica en el texto. Las células se cosecharon por centrifugación y se lavaron dos veces (con agua tridestilada) , se resuspendieron en la misma y con esta suspensión se inoculó el medio deseado a una absorbancia de 0.05 a 650nm.

MUTAGENESIS Y SELECCION DE MUTANTES:

La cepa S288C se mutagenizó con etil metano sulfonato (EMS) siguiendo el método de Fink (Fink 1970).

Después de la mutagenesis, las células se esparcieron en agar en

medio sólido sin nitrógeno adicionado con ácido glutámico-glicina y de ahí, se seleccionaron las colonias de crecimiento más rápido; se purificaron por subcultivos en medio sólido y se corroboró el fenotipo por crecimientos de las mutantes en el medio SN ácido glutámico-glicina en líquido. De este proceso se obtuvo la cepa mutante G 2

DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS:

Las células se colectaron filtrando el medio de cultivo através filtros " Millipore " del tipo Ra 1,2 mM ; las células se resuspendieron en amortiguador de extracción de GDH que contiene fosfato de potasio 0.1 M pH=7.0, EDTA 1mM y 2-mercaptoetanol 5 mM.

Las células se rompieron en un aparato homogenizador Braun; el homogenado se centrifugo a 15,000 rpm en una microfuga Beckman durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. En este sobrenadante se determinó la actividad enzimática.

Para el caso de la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Fosfato de potasio 1 M pH 7.0 -----	1.0 ml
Alfacetoglutarato 0.1 M -----	0.3 ml
Cloruro de amonio 0.05 M-----	0.5 ml
NADH 10mg/ml -----	0.12 ml

Agua tridestilada ----- 8.0 ml

Para el caso de la glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP la mezcla de reacción fue la siguiente

Fosfato de potasio 1 M pH: 7.6 ----- 1.0 ml

Alfacetoglutarato 0.1 M ----- 0.3 ml

Cloruro de amonio 0.05 M ----- 0.5 ml

NADPH 10 mg/ml ----- 0.12 ml

Agua tridestilada ----- 8.0 ml

Para determinar la actividad, se puso un mililitro de la mezcla de reacción dentro de una celda de cuarzo y se comenzó la reacción por adición del extracto. Paralelamente se corrieron tres controles: sin alfacetoglutarato, sin amonio y amortiguador con NADH o NADP dependiendo del caso. El progreso de la reacción se sigue midiendo la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro. Las actividades se expresan en micromoles de NAD o NADP consumidas por minuto por miligramo de proteína.

DETERMINACION DE PROTEINA:

La concentración proteína en los extractos celulares o en los cultivos se cuantificó de acuerdo al método de Lowry (Lowry et al, 1951), usando albúmina sérica bovina como estandar. La concentración del estandar se rectificó por su absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro.

DETERMINACION DE POZAS DE AMINOACIDOS:

La extracción y cuantificación de las pozas intracelulares de aminoácidos de la levadura se llevaron a cabo siguiendo un método descrito previamente (Gonzalez et al 1985).

OBTENCION DE CURVAS DE TERMOSENSIBILIDAD DE LA ACTIVIDAD DE GLUTAMATO DESHIDROGENASA DEPENDIENTE DE NAD:

Para este tipo de experimento, los extractos celulares (obtenidos como se describió anteriormente) se trataron a 55 grados centígrados, durante 5 minutos, después de este tratamiento el extracto fue centrifugado a 15,000 rpm en una microfuga Beckman por 10 minutos, y se recuperó el sobrenadante, esto se realizó con el fin de purificar parcialmente el extracto (factor de purificación para la GDH-NAD = 1.5x).

Para la obtención de la curva de termosensibilidad, se incubaron alícuotas del extracto obtenido en el paso anterior a 55 grados centígrados por los tiempos indicados en la Fig 7 y se determinó la actividad enzimática de GDH-NAD como se describió arriba.

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE GLUTAMATO DESHIDROGENASA DEPENDIENTE DE NAD, POR GLIOXILATO:

La inhibición de la actividad de la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD por glioxilato se realizó agregando diferentes cantidades del mismo a la mezcla de reacción,

determinándose la actividad de GDH-NAD como se describió arriba.

REFERENCIAS

- Bossinger J. Lawther R.P. Cooper, T.G. (1974) J. Bacteriol., 118 : 821
- Brandis, M. Magasanik B. (1979) J. Bacteriol 140 : 498
- Cooper T.G. (1982) The molecular biology of yeast *Saccharomyces* . Metabolism and Gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; Nitrogen Metabolism p 39
- Courchesne, W.E. Magasanik, B> (1983) Mol. Cel. Biol. 3 : 672
- Cooper T. G. Sumrada R.A. (1983) J. Bacteriol., 155 : 623
- Cooper, T.G. (1980) TIBS Dec pp. 332
- Davis, R. (1986) Microbiol. Revs 50 : 280
- Deschamps, J. Dubois, E. Wiame, J-H. (1979): Mol. Gen. Genet. 174 : 225
- Drillen. Lacroute (1972) J. Bacteriol., 109 : 203
- Drillen, R. Aige, M. Lacroute, F. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 53 : 367
- Dubois , E.L. Grenson, M. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 60 : 150

- Dubois, E., Vissers, M., Grenson, M., Wiame (1977) Biochem. Biophys. res. Commun. 75 : 233
- Dubois, E., Grenson, M., Wiame, J.-M. (1974) Eur. J. Biochem. 48 : 603
- Dunlop, P.C., Meyer, G., Roon, R.J. (1980) J. Bacteriol. 143 : 422
- Fink G. R. (1970) Meth. in Enzymol. 17 58
- Galbraith, J., Smith, J. (1969) Can. J. Microbiol. 15 : 1207
- González A., Rodríguez L., Folch J., Soberón M., Olivera H. (1987) J. Gen. Microbiol. 133 : 2497
- González, A., Olivera H., Rodríguez L., Soberón, M. (1985) J. Gen. Microbiol. 135 : 2565
- Grenson, M., Hou, C., Grabeol, M. (1970) J. Bacteriol. 103 : 770
- Grenson, M., Hou (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 48 : 749
- Grenson, M., Dubois, E., Piotrowska (1974) Molec. Gen. Genetics. 128 : 73
- Grove, G. G. A., Marzluf (1981) J. Biol. Chem. 256 : 463
- Hierholzer G., Holzer H. (1963) Biochem. Z. 339 : 361
- Holzer H., Schneider S. (1957) Biochem. Z. 329 : 361
- Kang, L., Meyer, M., Dunlop, P.C., Roon, R.J. (1982) J. Bacteriol. 151 : 25
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) 193 : 285
- Marzluf G.A. (1981) Microbiol. revs 45 : 437

- Mazon, M. (1978) J. Bacteriol. > 133 : 780
- Mazon, M. (1979) J. Bacteriol. 139: 686
- Middelhoven, W.J. (1977) J. Gen. Microbiol. 100 : 257
- Middelhoven W.J. Hoogkamer-Te-Niet (1981) FEMS Microbiol. Lett. 10 : 307
- Room, R, J. Even H.L. (1978) J. Bacteriol. 116 : 367
- Soberon Chavez M. (1986) Asimilación de glutamina en *Saccharomyces cerevisiae* Tesis Maestría en IBB.
- Thomulka K.W. y Moat A.G. (1972) J. Bacteriol. 109 : 25
- Ulame. Ogur J. Bacteriol. (1972) 109 :34
- Watson, J.D. (1975) J. of Gen Microbiol. 96 : 263

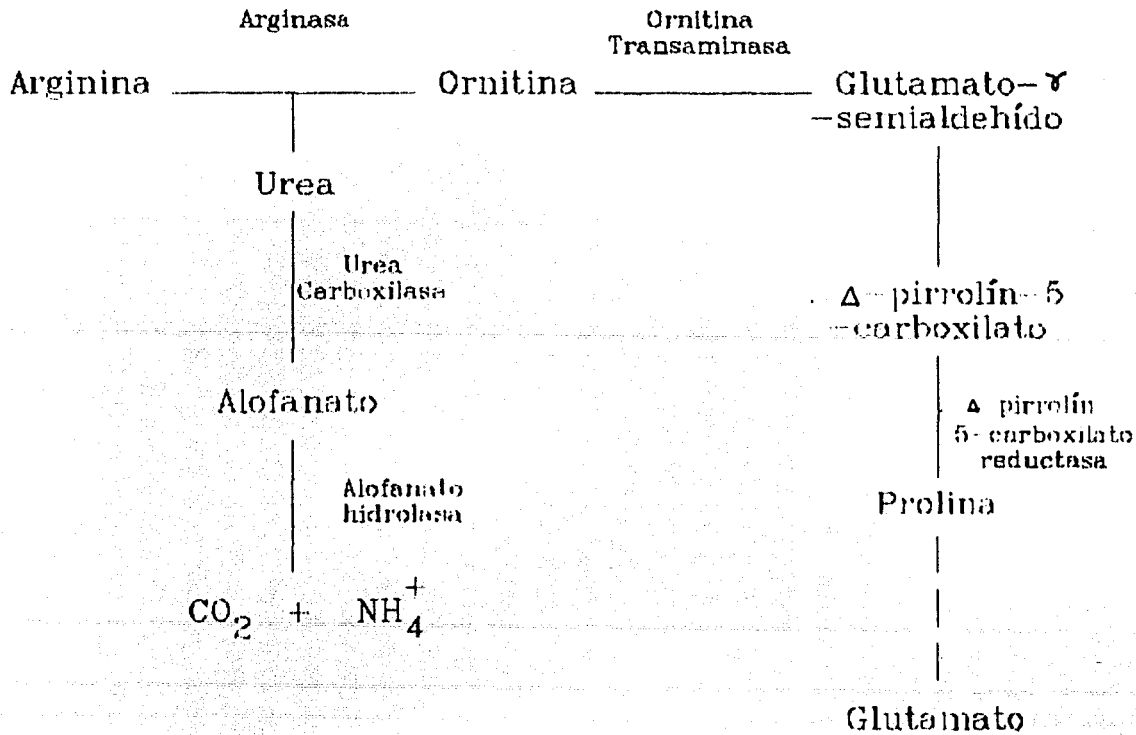


Diagrama 1 degradación de arginina

Tabla I Mutantes afectadas en las actividades de glutamato deshidrogenasa: (+) silvestre; (-) mutante sin actividad(++) mutante con actividad mayor que la silvestre(+/-) mutante con actividad menor que la silvestre

	GDH-NAD	GDH-NADP
GDH 1	+	-
GDH-CR	++ (NH ₄ ⁺)	+/- (NH ₄ ⁺)
GDH-C6	+/- (GLU)	+
G 2	+	+

CAPAZ DE INDUCIR LA GDH-NAD
EN GLUTAMATO GLICINA

Tabla II Tabla comparativa de las actividades de las glutamato deshidrogenasas de las cepas silvestre S288C y mutante G 2 en ácido glutámico o amonio como única fuente de nitrógeno. Actividad específica como micromoles de NAD consumido por miligramo de proteína

	GDH-NADP (BIO)		GDH-NAD (CAT)			
	GLU		NH ₄ ⁺		NH ₄ ⁺	
	S288C	G2	S288C	G2	S288C	G2
6 hrs	0.49	0.049	0.81	0.692	N.D. #	N.D.
12 hrs	0.25	0.45	0.57	0.543	N.D.	N.D.
24 hrs	0.095	0.18	0.095	0.127	0.027	0.043

N.D. No Detectable

Figura (1) Cepa silvestre S288C. Panel A: Crecimiento, determinado por densidad óptica a 650 nm (D.O.); Panel B: Pozas de ácido glutámico intracelular en micromoles por mg de proteína; Panel C: actividad específica de glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD (GDH-NAD) expresada en micromol de NAD consumido por minuto por miligramo de proteína.

S 288 C (SILVESTRE)

- SN glu
- SN gli
- ▲ SN glu gli

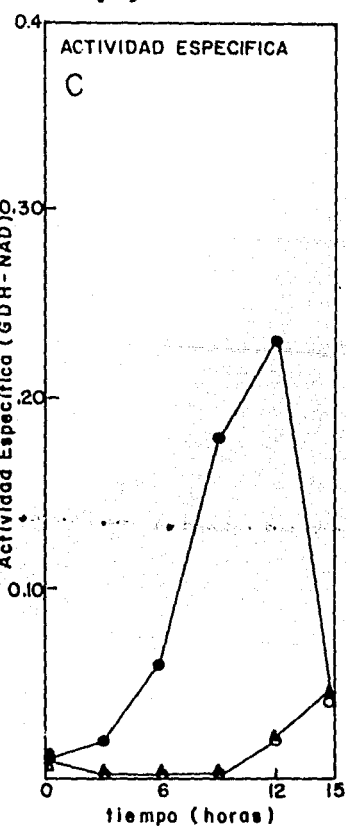
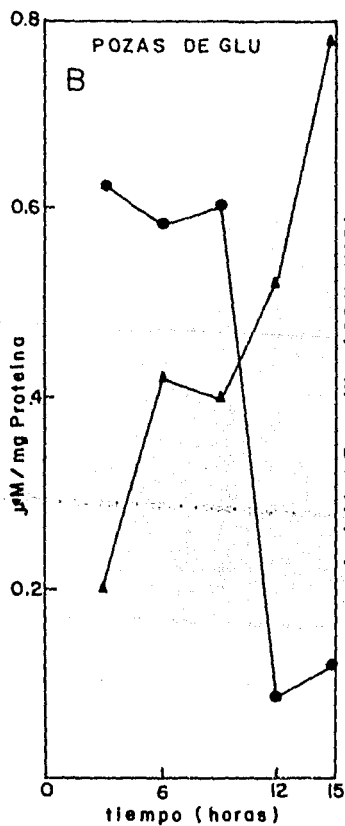
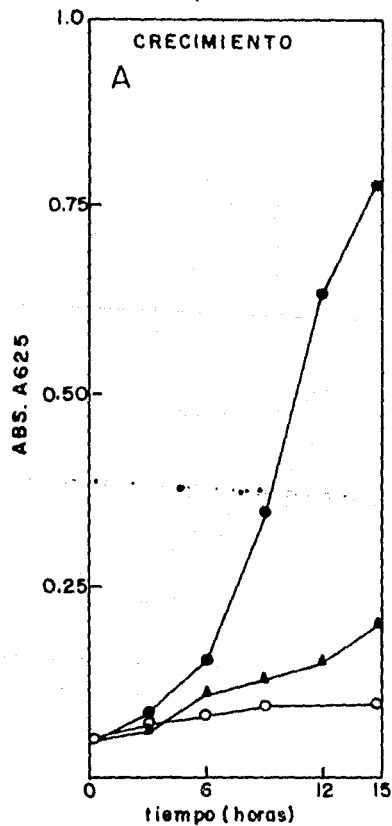


Figura (2) Cepa mutante G 2. Panel A: Crecimiento, determinado por densidad óptica a 650 nm (D.O.); Panel B: Pozas de ácido glutámico intracelular en micromoles por mg de proteína ; Panel C: actividad específica de glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD (GDH-NAD) expresada en micromoles de NAD consumido por minuto por miligramo de proteína.

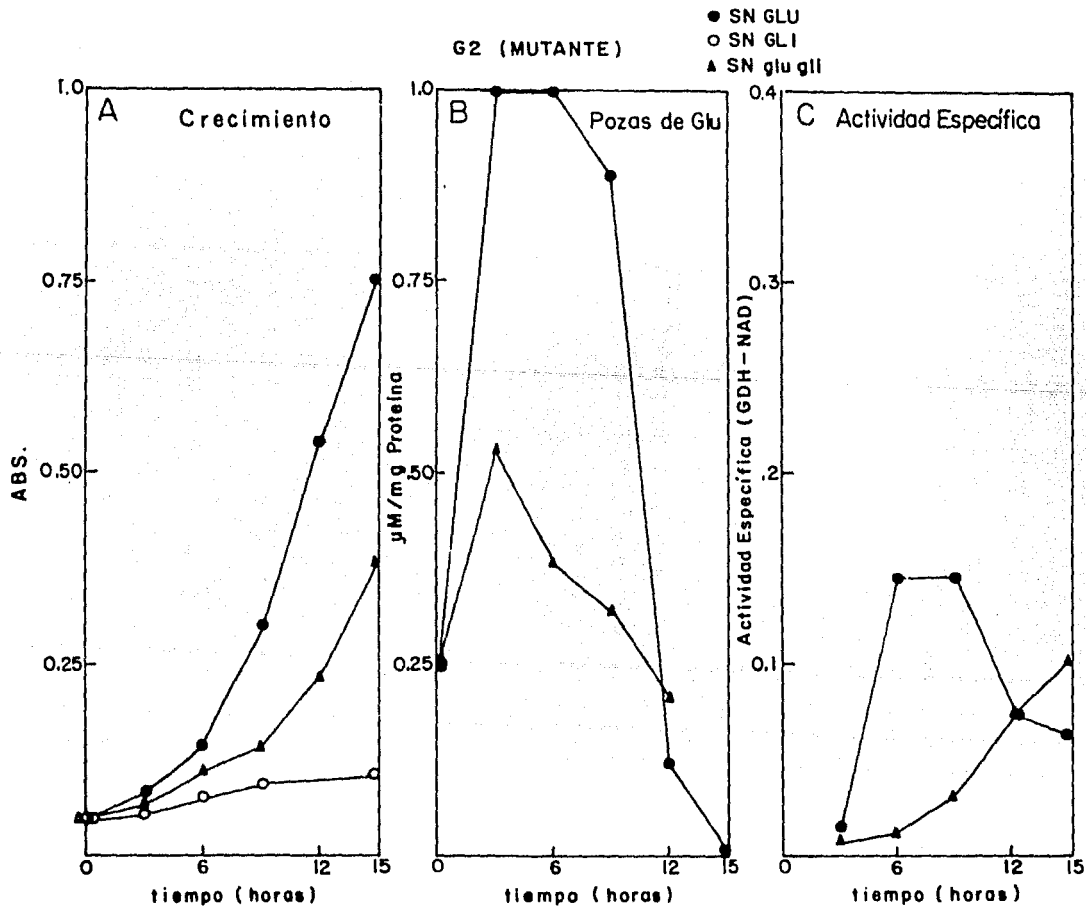


Figura (3): Cepa mutante G 2, cultivada en ácido glutámico-glicina. Panel A: Crecimiento determinado por densidad óptica a 650 nm (D.O.) y actividad específica de GDH-NAD; Panel B: pozas de glicina (derecha) y ácido glutámico (izquierda).

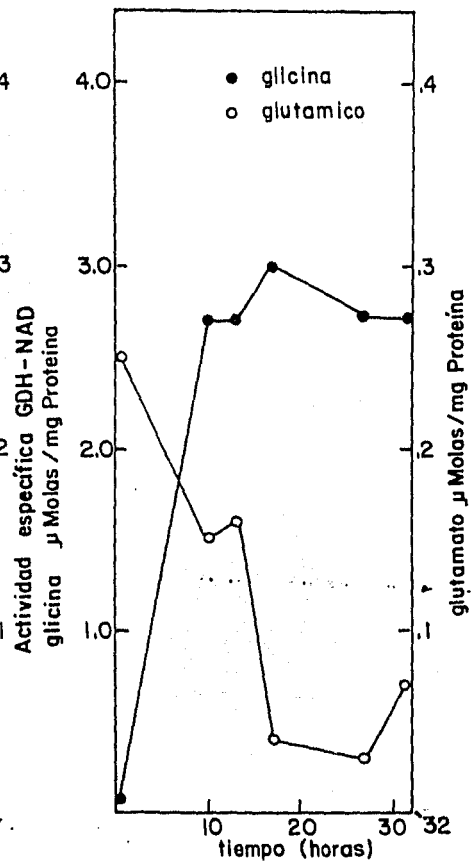
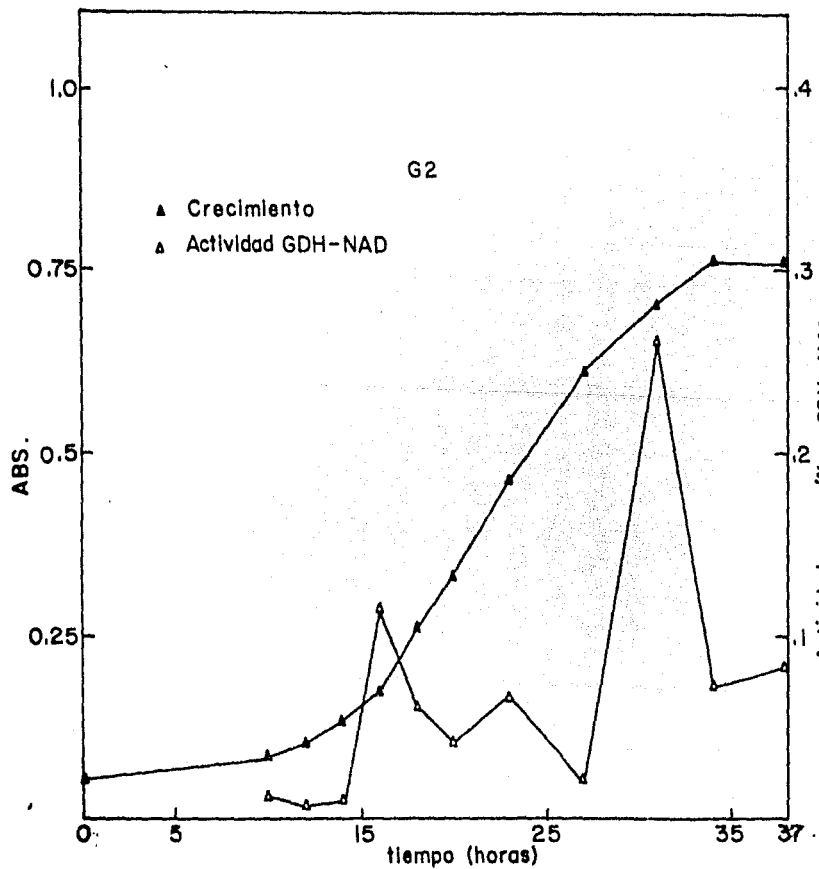


Figura (4) Cepas silvestre S288C, cultivada en ácido glutámico-glicina Panel A: Crecimiento determinado por densidad óptica a 650 nm (D.O.) y actividad específica de GDH-NAD; Panel B: pozas de glicina (derecha) y ácido glutámico (izquierda).

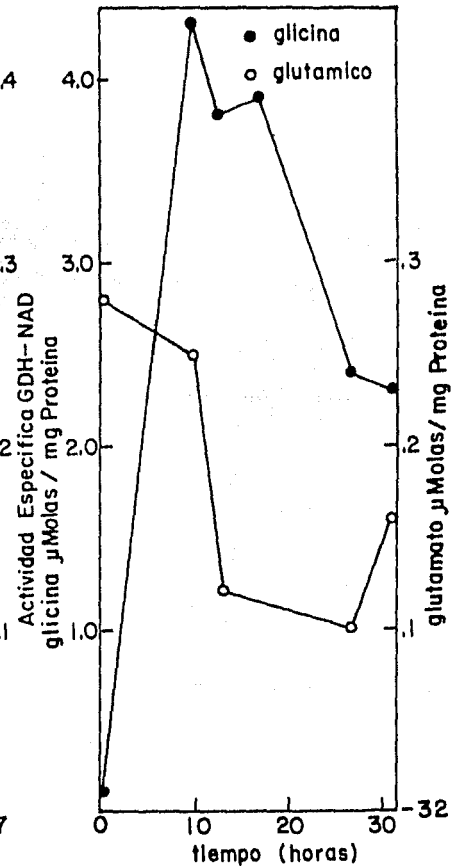
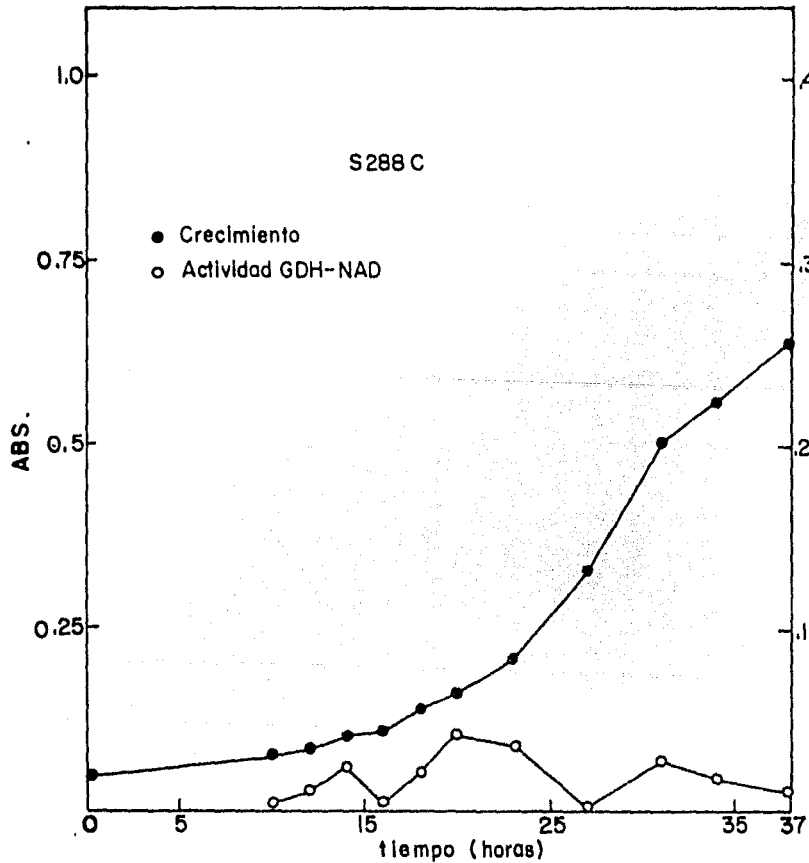


Figura (5) Crecimiento de las cepas mutante G 2 y silvestre S288C en ácido glutámico-glioxilato determinado por densidad óptica (D.O.)

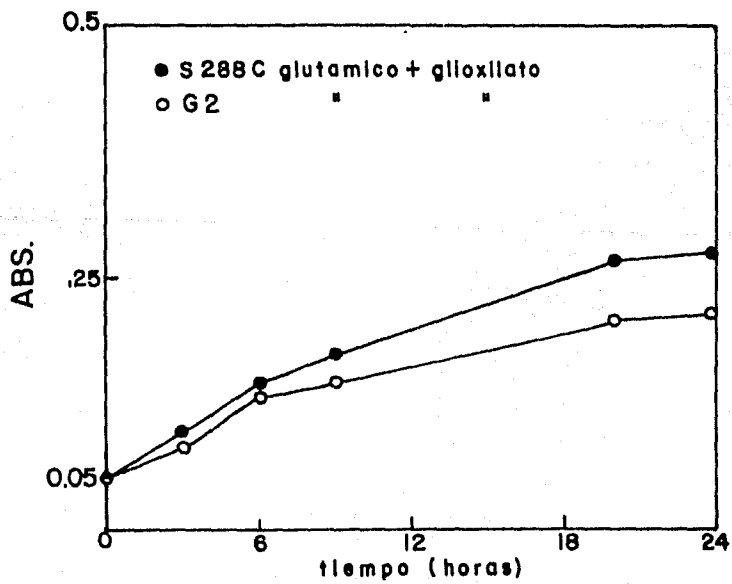


Figura (6) Inhibición *in vitro* de la actividad de glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD por glioxilato.

INHIBICION POR GLIOXILATO DE GDH-CATABOLICA (GDH-NAD)

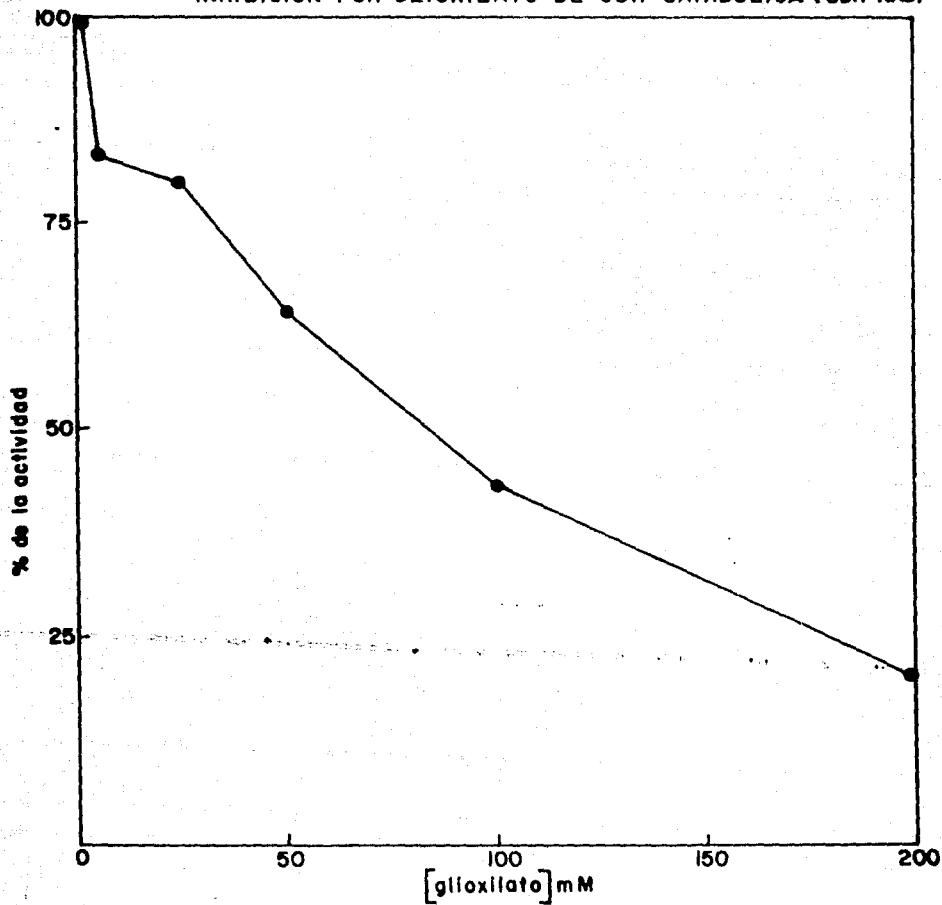


Figura (7) Sensibilidad a la temperatura de la actividad de glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD de las cepas silvestre y mutante cultivadas en ácido glutámico como única fuente de nitrógeno y en ácido glutámico-glicina. Actividad expresada como porcentaje de la actividad inicial.

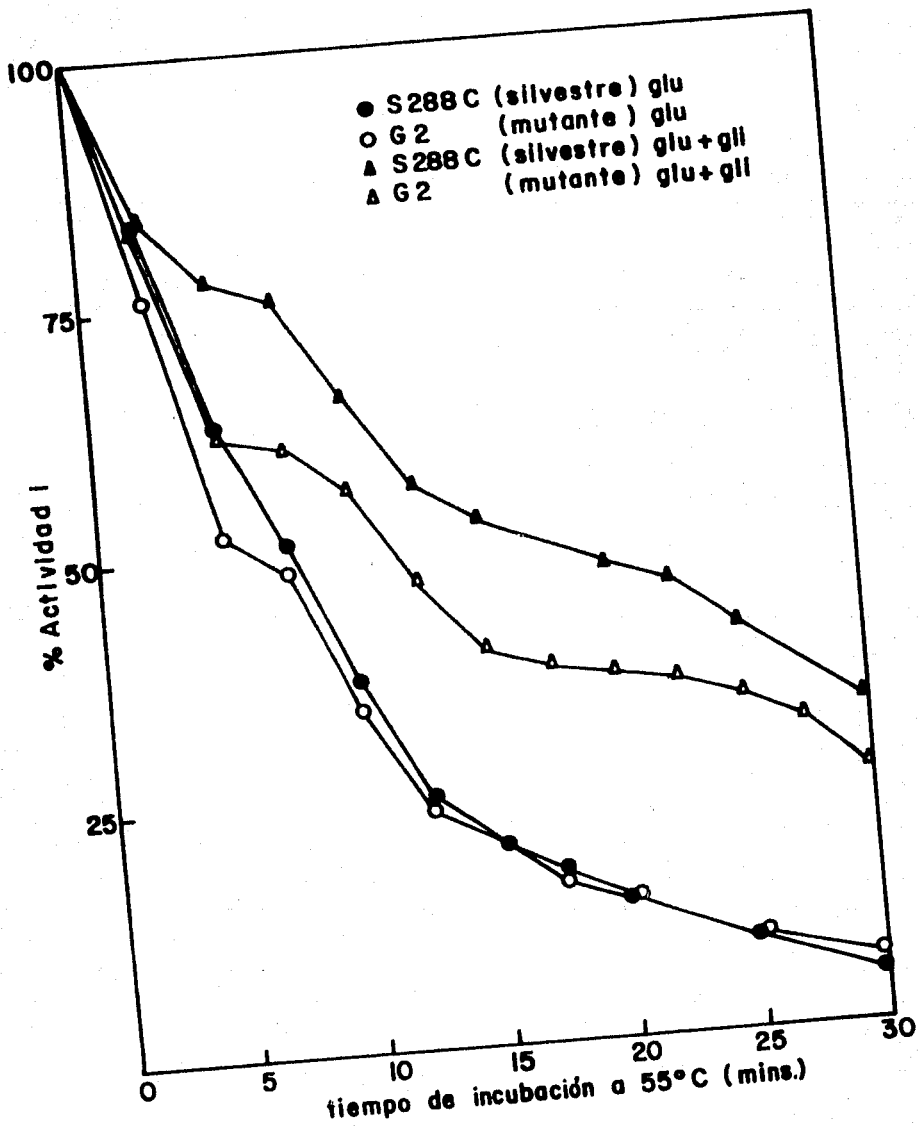


Figura (8) Crecimiento en ácido glutámico-glicina de las cepas S288C y G 2, estos crecimientos fueron inoculados con precultivos crecidos por 12 ó 24

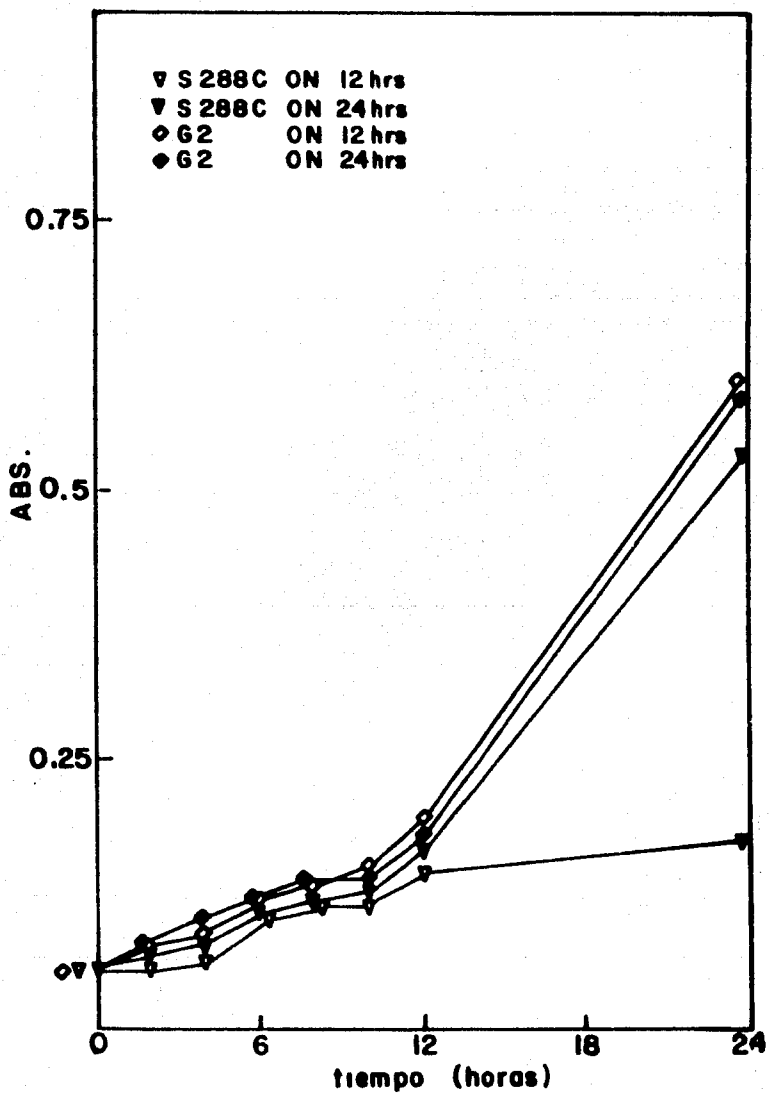


Figura (9) Panel A: Crecimiento de la cepa S288C en ácido glutámico glicina, después de haber sido preincubada por 4 hrs en SN :medio mínimo sin nitrógeno, SG :medio mínimo sin glucosa, ó H₂O Panel B:Crecimiento de las cepas S288c y G 2 en ácido glutámico glicina, después de haber sido preincubadas por 1 y 4 hrs en SN: medio mínimo sin nitrógeno

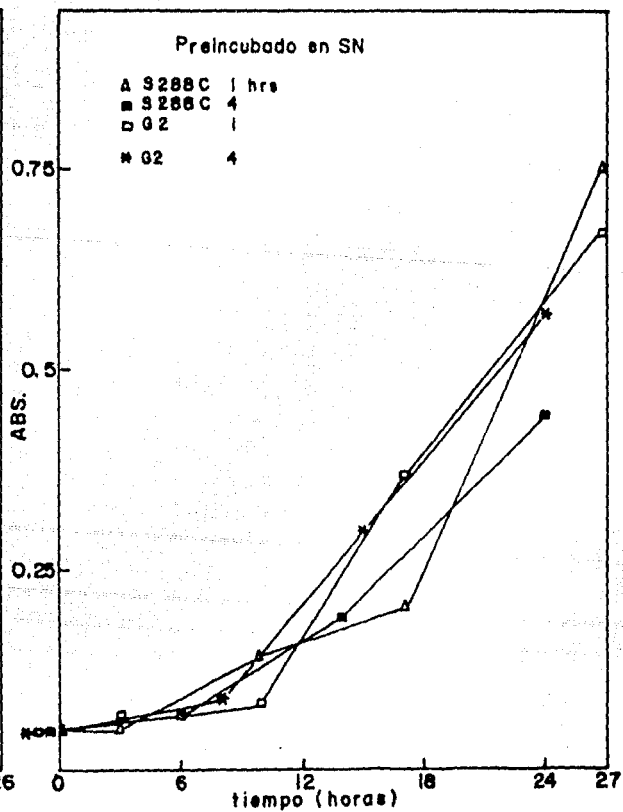
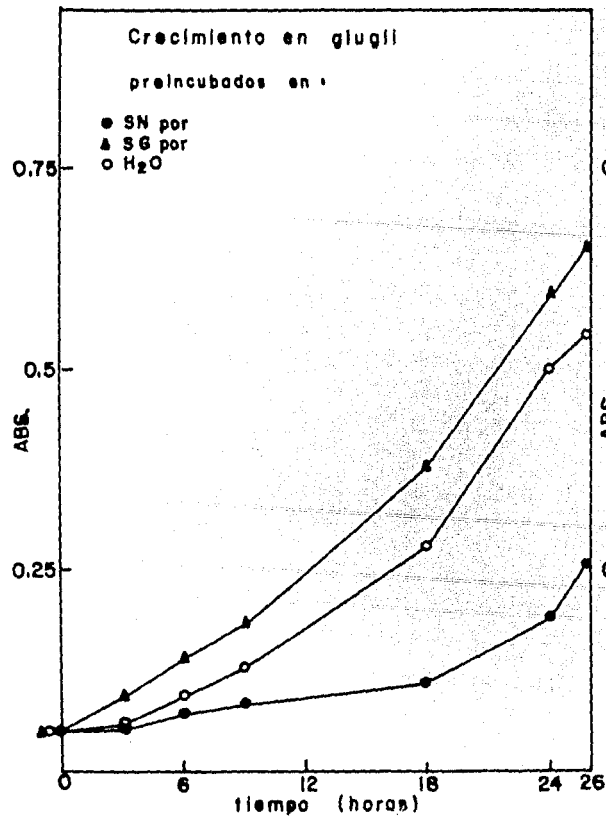


Figura (10) Pozas de glicina de las cepas silvestre S288C y mutante G 2 cultivadas en ácido glutámico como única fuente de nitrógeno. Panel A: Experimento inoculado con células que provienen de un precultivo de 24 hrs saturado ;Panel B: Experimento inoculado con células que provienen de un precultivo de 12 hrs no saturado

