

03081

(1) 20j



**Universidad Nacional Autónoma  
de México**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL  
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y  
HUMANIDADES**

**Centro de Investigación sobre fijación de Nitrógeno**

**“Oxidación de Glutamina Sintetasa, Glutamato  
Deshidrogenasa biosintética y otras proteínas  
en Neurospora crassa: Relación con la conidia-  
ción”.**

**T E S I S**

Que para obtener el Grado de  
Doctor en Investigación Biomédica Básica

presenta

**JESUS AGUIRRE LINARIS**

**MEXICO, D. F.**

**1988**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.

## INDICE

Introducción General.	1 - 4
Materiales y Métodos no incluidos en las publicaciones.	5 - 10
Resultados	
I.- Aerial growth in <u>Neurospora crassa</u> : Characterization of an experimental model system.	11 - 23
II.- Oxidation of <u>Neurospora crassa</u> Glutamine Synthetase.	24 - 31
III.- Rapid and easy method for <u>N. crassa</u> GDH-NADPH purification.	32 - 38
IV.- Oxidación de GDH-NADPH de <u>N. crassa</u> por radicales de oxígeno.	39 - 55
V.- Posible regulación de la GDH-NADPH de <u>N. crassa</u> por intercambio tiol-disulfuro.	56 - 67
VI.- Oxidación de la GS, la GDH-NADPH y otras proteínas durante el crecimiento aéreo de <u>N. crassa</u> .	68 - 77
Discusión General.	78 - 84
Referencias.	85 - 90

## INTRODUCCION:

La esporulación en microorganismos constituye uno de los modelos experimentales que han sido estudiados para tratar de comprender los mecanismos que inician y controlan los procesos de diferenciación celular. Los factores que se han reportado como inductores de la esporulación son tantos y tan diversos que resulta difícil hacer generalizaciones. Sin embargo, puede afirmarse que todos esos factores son contrarios al crecimiento balanceado y conducen tarde o temprano al desbalance metabólico. También se puede decir que en todos los procesos de esporulación estudiados se ha detectado una degradación exacerbada de la mayoría de los componentes celulares, incluso existen casos como el de las Mixobacterias donde llega a degradarse el 80 % de una colonia para nutrir la diferenciación del 20 % restante. Neurospora tiene en común con muchos otros microorganismos capaces de esporular el hecho de que la privación de nutrientes es una forma efectiva para inducir esta diferenciación. Las limitaciones de carbono o de nitrógeno son probablemente las dos condiciones más usadas para inducir la esporulación en la mayoría de los microorganismos. Consecuentemente algunas fuentes de nitrógeno reprimen notablemente la esporulación (Hansberg, W., 1984). Por esta razón, en nuestro laboratorio se decidió estudiar el metabolismo del nitrógeno durante la conidiación de Neurospora crassa, como un enfoque que podría llevarnos a entender cómo la limitación de nitrógeno puede desencadenar la esporulación y también como las fuentes de nitrógeno inhiben la esporulación.

El modelo experimental que hemos utilizado es la esporulación asexual ó conidiación de N. crassa (figura 1). El método experimental se basa en la exposición directa al aire de un micelio crecido en medio líquido (Stine y Clark, 1967), sistema que posee algunas ventajas notables que han sido analizadas con anterioridad por M.E. Cárdenas (1983).

A grandes rasgos el sistema de Stine y Clark (1967) consiste en crecer N. crassa en líquido en condiciones óptimas para después filtrar el micelio suavemente, formando una masa micelial que se expone directamente al aire. A las 3 h de exposición al aire, es posible observar a simple vista hifas creciendo hacia la fase aérea. Posteriormente el micelio aéreo crece durante 9 h más y conidia en una forma casi sincrónica.

Durante el curso de nuestro trabajo, se descubrió que una vez que se ha filtrado micelio crecido en líquido, las hifas que están en contacto directo con el aire, se adhieren y forman una especie de tejido, que en lo sucesivo se denominará micelio superior, mientras que las hifas que se encuentran por debajo de éste, permanecen sueltas y se les denomina micelio inferior (Cárdenas y Hansberg, 1984). Dado que la formación de micelio superior está asociada con la formación del micelio aéreo, la mayor parte de los estudios que hemos realizado analizan éstos dos estratos miceliales además del micelio inferior.

La regulación de las actividades de la glutamina sintetasa (GS; E.C.6.3.1.2) y la glutamato deshidrogenasa biosintética (GDH-NADPH; E.C.1.4.1.4) ha sido estudiada con detalle durante el crecimiento de *N. crassa*, por J. Mora, R. Palacios y sus colaboradores. Para una revisión reciente del tema, consultar Mora, J. et al. (1988). Estas dos enzimas catalizan la síntesis de glutamina y glutamato respectivamente (Figura 2).

Estudiando el metabolismo de la glutamina en el micelio aéreo, superior e inferior, se encontraron diferencias muy marcadas en las actividades específicas de la GS, la GDH-NADPH y la GDH-NAD (catabólica). Las actividades de la GS y la GDH-NADPH disminuyen progresivamente en el micelio superior, pero se conservan en el micelio inferior. En el micelio aéreo no se detecta actividad de GDH-NADPH y la actividad de GS es intermedia (Cárdenas y Hansberg, 1984).

Los datos del micelio inferior son atípicos ya que previamente se había reportado que ambas enzimas son degradadas en condiciones de limitación de carbón (Mora, Y. et al, 1980; Kapoor y Grover, 1970) y los experimentos antes descritos se llevaron a cabo en ausencia de fuentes de carbón y nitrógeno.

Cuando se induce la esporulación en presencia de un medio completo o de carbón y/o nitrógeno, el comportamiento de las actividades de GS y GDH-NADPH son semejantes al descrito antes en ausencia de nutrientes (ver tabla 1 en la sección VI de resultados). Estos resultados también son inesperados ya que la presencia de nutrientes debería impedir la pérdida de la actividad de éstas enzimas en el micelio superior. Una posible explicación, para la pérdida de actividades enzimáticas en el micelio superior podría ser la muerte de éste por deshidratación, por lo que parte del presente trabajo tuvo como objetivo descartar o confirmar ésta idea.

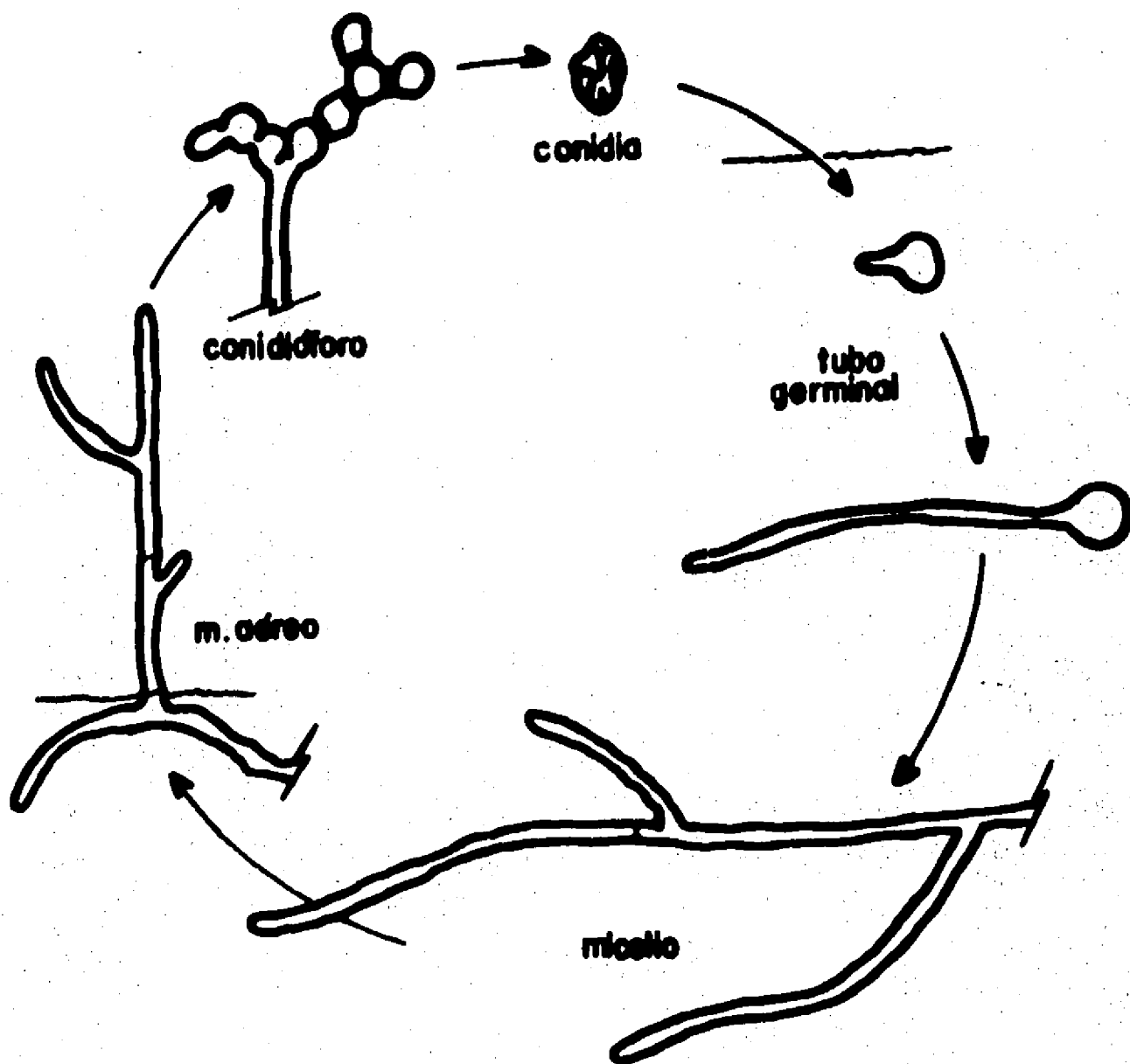
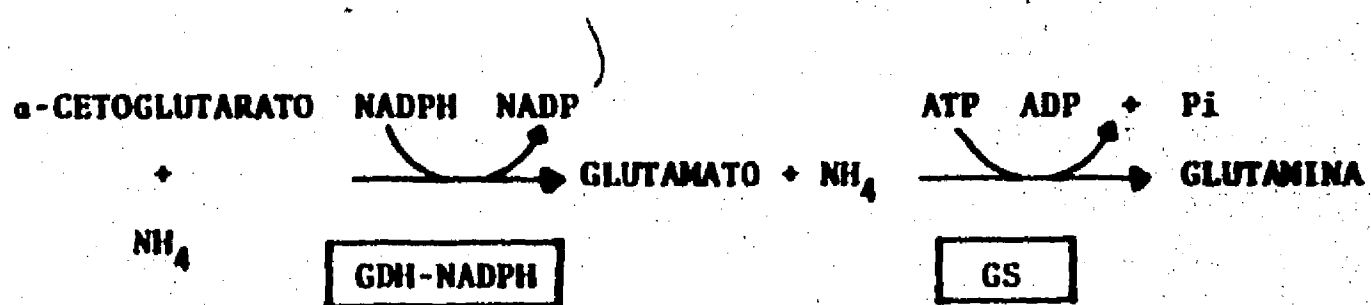


Figura 1. CONIDIACION EN Neurospora crassa.



**FIGURA 2. ASIMILACION DE AMONIO POR LA VIA GLUTAMATO DESHIDROGENASA BIOSINTETICA (GDH-NADPH)-GLUTAMINA SINTETASA (GS).**

Otra posible explicación para la pérdida de actividad de GS y GDH-NADPH sólo en el micelio expuesto directamente al aire, surgió a partir de algunos trabajos de E. R. Stadtman, R. Levine y sus colaboradores sobre la GS de Escherichia coli.

A grandes rasgos, dichos trabajos demostraron:

a) Que la enzima GS de E. coli se inactiva in vitro por sistemas enzimáticos de oxidación mixta, (citocromo P-450, oxidasa bacteriana dependiente de NADH) y no enzimáticos (ascorbato + FeIII) dependientes de oxígeno molecular y capaces de producir oxígeno activado (Levine, R. et al., 1981). La enzima inactivada es más sensible a degradación proteolítica e incluso, se ha purificado una proteasa de E. coli que específicamente degrada a la GS oxidada (Roseman, J. E. y Levine, R., 1987).

b) Que la GS oxidada tiene un residuo de histidina, al cual se le ha introducido un grupo carbonilo que reacciona con 2,4-dinitrofenilhidrazina. Este carbonilo se detecta en la enzima oxidada in vitro y en distintas preparaciones de la GS pura no oxidada en relación inversa a su actividad específica, lo cual sugiere que la modificación oxidativa ocurre in vivo (Levine, R., 1983).

c) Que otras varias enzimas se inactivan in vitro por los mismos sistemas no enzimáticos que inactivan a la GS de E. coli (Taborsky, G., 1973; Hodgson y Fridovich, 1975; Fucci, L. et al., 1983).

d) Que diversas proteínas de E. coli y de otras fuentes, separadas en geles de poliacrilamida, poseen grupos carbonilo lo cual se considera un buen argumento de que la oxidación de proteínas es un fenómeno que ocurre in vivo en ciertas condiciones fisiológicas (Ahn, B. et al., 1987).

Así pues, decidimos explorar la posible oxidación de las enzimas GS y GDH-NADPH de N. crassa y nos planteamos los siguientes



Otra posible explicación para la pérdida de actividad de GS y GDH-NADPH sólo en el micelio expuesto directamente al aire, surgió a partir de algunos trabajos de E. R. Stadtman, R. Levine y sus colaboradores sobre la GS de Escherichia coli.

A grandes rasgos, dichos trabajos demostraron:

- a) Que la enzima GS de E. coli se inactiva in vitro por sistemas enzimáticos de oxidación mixta, (citocromo P-450, oxidasa bacteriana dependiente de NADH) y no enzimáticos (ascorbato + FeIII) dependientes de oxígeno molecular y capaces de producir oxígeno activado (Levine, R. et al., 1981). La enzima inactivada es más sensible a degradación proteolítica e incluso, se ha purificado una proteasa de E. coli que específicamente degrada a la GS oxidada (Roseman, J. E. y Levine, R., 1987).
- b) Que la GS oxidada tiene un residuo de histidina, al cual se le ha introducido un grupo carbonilo que reacciona con 2,4-dinitrofenilhidrazina. Este carbonilo se detecta en la enzima oxidada in vitro y en distintas preparaciones de la GS pura no oxidada en relación inversa a su actividad específica, lo cual sugiere que la modificación oxidativa ocurre in vivo (Levine, R., 1983).
- c) Que otras varias enzimas se inactivan in vitro por los mismos sistemas no enzimáticos que inactivan a la GS de E. coli (Taborsky, G., 1973; Hodgson y Fridovich, 1975; Fucci, L. et al., 1983).
- d) Que diversas proteínas de E. coli y de otras fuentes, separadas en geles de poliacrilamida, poseen grupos carbonilo lo cual se considera un buen argumento de que la oxidación de proteínas es un fenómeno que ocurre in vivo en ciertas condiciones fisiológicas (Ahn, B. et al., 1987).

Así pues, decidimos explorar la posible oxidación de las enzimas GS y GDH-NADPH de N. crassa y nos planteamos los siguientes.

## OBJETIVOS:

- 1.- Caracterizar nuestro sistema experimental para tratar de definir cual es la participación del micelio superior en el proceso de esporulación de N. crassa.
- 2.- Definir si las enzimas GS y GDH-NADPH son sensibles a algún tipo de modificación oxidativa y si esto tiene algún significado fisiológico durante el crecimiento y la conidiación de N. crassa.
- 3.- Definir si la oxidación de proteínas puede ser un fenómeno general en N. crassa y si ocurre preferentemente en el micelio superior.
- 4.- Explicar como la oxidación de proteínas puede relacionarse con la conidiación en N. crassa.

A continuación se presentarán los materiales y métodos utilizados en los trabajos no publicados, y en seguida los resultados en la misma secuencia que los objetivos. En el caso de los trabajos ya publicados, se ha anexado un resumen que explica la secuencia de los trabajos, sus objetivos y sus resultados. Para facilitar la presentación de los resultados no publicados, éstos han sido incluidos como manuscritos individuales con su propia introducción y discusión. Al final de la tesis se presenta una discusión general y las referencias.

**MATERIALES Y METODOS** que no aparecen en las publicaciones adjuntas:

**Reactivos:**

Los reactivos para electroforesis se compraron en Bio-Rad (EUA) y en algunos casos se usaron anfolinas LKB (Suecia). Los reactivos: cistina, cistamina, glutatión oxidado (GSSG), ditiotreitól (DDT), sulfato de estreptomina, ascorbato, EDTA, FeSO<sub>4</sub>, ferricitrato, HEPES, Trizma base, la GDH bovina y la Sepharosa azul (reactive-blue-Sepharose) se compraron a Sigma Chemical Co. (EUA). La 2,4-dinitrofenilhidrazina y el nitrato de plata se obtuvieron de Merck (RFA); la guanidina-HCl, de Bethesda labs (EUA). Otros compuestos se obtuvieron de Baker (México), grado reactivo.

**Cepas y condiciones de crecimiento**

En todos los experimentos se usó la cepa silvestre 74-A del Fungal Genetics Stock Center. En algunos casos también se usó la mutante am-132 la cual posee una delección en el gene de la GDH-NADPH (Kinsey, J.A. y T.H. Bao-Shin, 1981), por lo que requiere glutamato 5 mM para crecer. Ambas cepas nos las donó el Dr. Jaime Mora, de esta Universidad.

En todos los casos se inoculó medio Vogel (1964) suplementado con sacarosa al 1.5%, con una suspensión concentrada de conidias, hasta obtener una densidad final de un millón de esporas por ml de medio. Se creció de 12-14 h a 30°C con agitación constante a 230 rpm. Una vez crecido, el micelio se filtró y deshidrató con un exceso de acetona y los polvos obtenidos se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Para los experimentos donde se incubó micelio sin fuente de carbono con o sin aire; un cultivo crecido 12 h se centrifugó a 3000 rpm (Sorvall, GS-3) por 5 min a temperatura ambiente, se decantó y resuspendió en medio Vogel sin sacarosa. Este cultivo se dividió en dos partes, una se incubó a 30°C con una relación aire-líquido de 10 y agitación constante a 240 rpm, el resto se incubó en tubos Falcon de 50 ml que se sellaron con Parafilm. A distintos tiempos estos cultivos se filtraron y deshidrataron con acetona.

El micelio aéreo se creció siguiendo el método descrito por Cárdenas y Hansberg (1984).

#### Determinación de la actividad de GDH-NADPH:

Todos los extractos celulares utilizados en este trabajo, se prepararon a partir de micelio deshidratado con acetona. Los polvos de acetona se trituraron con hielo seco hasta obtener un polvo muy fino, el cual se resuspendió en la solución amortiguadora indicada siempre en la relación 100 mg de polvo por cada ml de sol. amortiguadora. La suspensión obtenida se centrifugó en una microfuga Eppendorf durante 10 min y los sobrenadantes se utilizaron en todos los experimentos como extractos celulares. Para determinar la actividad de la GDH-NADPH, los polvos de acetona de distintas condiciones se resuspendieron en amortiguador fosfatos 0.1M, pH 8 y se utilizaron 10  $\mu$ l para los ensayos. La actividad se determinó siguiendo el decaimiento en absorbencia a 340 nm debido a la oxidación del NADPH según el método descrito por Fincham (1957). La actividad específica corresponde a  $\mu$  moles de NADPH oxidado  $\text{min}^{-1}$  mg de proteína $^{-1}$  a 25°C. En todos los casos, la enzima pura o el extracto se preincubaron por 5 min con cetoglutarato y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en el amortiguador de ensayo y la reacción se inició añadiendo el NADPH. La proteína se determinó según el método de Lowry (1951), y en muestras de enzima pura o semipura, por Absorbencia a 230 nm usando una curva estandar de Albúmina bovina.

### Tratamiento de la GDH-NADPH con disulfuros o con las mezclas de oxidación:

Los extractos crudos ó la enzima pura se incubaron en distintas soluciones amortiguadoras a 30°C en presencia de los distintos disulfuros. Estos se usaron recién preparados y se disolvieron en el mismo amortiguador usado para el extracto ó la enzima. La cistina es poco soluble en agua a pH inferior a 9, razón por la cual la solución madre concentrada de cistina (20X) se ajustó con NaOH hasta una concentración final de 0.5 mM y pH 11. La cistina y el resto de los disulfuros se prepararon concentrados 20 veces. Los primeros experimentos con disulfuros en extractos se hicieron incubando primero a pH 8 y después se añadió  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para cambiarlo a pH 6.1, Este cambio se hizo debido a que el intercambio tiol disulfuro es menos eficiente a pH menores de 8. Posteriormente se observó que tal cambio de pH no era necesario para detectar inactivación en estas condiciones. En algunos casos la enzima pura se pretrató con DTT 20 mM por 45 min a 30°C, lo cual produce una activación de aproximadamente 55%. El DTT se eliminó por filtración en Sephadex G-50 y esta preparación se usó para incubar en presencia de disulfuros o mezclas oxidantes.

Las incubaciones con ascorbato,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , FeII, FeIII, EDTA, ferricitrato, y sus distintas combinaciones, se hicieron preparando una solución fresca (20X) de cada compuesto, diluyendolas directamente con el extracto o la enzima pura e incubando a 30°C en presencia de aire. El orden de adición fue siempre EDTA; ferricitrato; Fe; ascorbato;  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Cuando se incubó en presencia del  $\text{O}_2$  ó de  $\text{N}_2$  ésto se hizo pasando una corriente de uno u otro gas por encima de las soluciones y los extractos mientras se agitaban con un Vortex, y posteriormente se taparon y sellaron con Parafilm. Cumplidos los tiempos de incubación, las distintas muestras se trataron como en el caso de los disulfuros ó se filtraron por Sephadex G-50 y se analizaron por electroforesis. Cuando se incubó a la enzima con los sustratos mas algún disulfuro ó coctel de oxidación, los sustratos se añadieron primero.

#### Filtración por minicolumnas de Sephadex G-50:

Con el objeto de cambiar de solución amortiguadora y eliminar los reactivos de un extracto o de la enzima pura en solución, éstos se filtraron a través de Sephadex G-50-80, empacado en jeringas de insulina, centrifugando 1 min en una centrifuga Sorvall TJ-6 a máxima velocidad. Estas minicolumnas se preequilibraron centrifugando cuatro veces 100  $\mu$ l del amortiguador a usar y finalmente se filtraron 100  $\mu$ l del extracto o la enzima, colectando el filtrado en tubos Eppendorf de 0.5 ml. Este método está basado en uno desarrollado por Penefsky (1977).

#### Purificación de la GDH-NADPH:

Ver manuscrito adjunto: Aguirre, J. and Hansberg, W., Rapid and easy method for Neurospora crassa GDH(NADPH) purification.

#### Obtención de anticuerpos:

Los anticuerpos usados en estos experimentos, se obtuvieron inmunizando dos veces, con 20 días de diferencia a un conejo Nueva Zelanda, con 800  $\mu$ g de GDH-NADPH purificada. Una semana después de la segunda inmunización se sangró al conejo de la vena periférica de la oreja, y se aisló la fracción de gamaglobulinas del suero total con tres precipitaciones con sulfato de amonio al 50 % de saturación. Después de la última precipitación, el precipitado se resuspendió en PBS, en la mitad del volumen del suero original y se almacenó a -20 °C.

#### Electroforesis en geles de poliacrilamida:

Los geles en presencia de SDS se hicieron de acuerdo con Laemmli (1970) y los geles de 2 dimensiones de acuerdo con O'Farrell (1975). Los electroenfoques desnaturizantes, se hicieron adaptando la metodología de O'Farrell para la primera dimensión (1975) a un gel plano, de 0.75 mm de espesor. Para los electroenfoques nativos se siguió la metodología descrita por Giulian, G. en el catálogo Hoefer Scientific Instruments (1986). Los geles con anfolinas se hicieron con Coomassie R-250 según lo reportado en éste mismo catálogo y después con plata según el método de Wray et al., (1981).

### Inmunoprecipitación directa de la GDH-NADPH y la GS.

A 0.6 mg de proteína de un extracto crudo, se le añadió 30  $\mu$ l de anticuerpo y se incubó a 4°C por 4 h en presencia de albúmina 1 mg/ml (concentración final), en un volumen final de 200  $\mu$ l de amortiguador HEPES 100 mM, pH 8. Después de éste tiempo esta mezcla se centrifugó en un gradiente discontinuo de sacarosa (100  $\mu$ l de sacarosa 1 M + 50  $\mu$ l de 0.5 M).

La GS se inmunoprecipitó siguiendo la técnica de Palacios et al. (1977). Los inmunoprecipitados se resuspendieron directamente con la solución amortiguadora indicada para cada sistema de electroforesis.

### Medición de los grupos carbonilo en la proteína total:

Para medir grupos carbonilo en proteína total se utilizó un método publicado originalmente para detectar grupos carbonilo en la GS pura oxidada de E. coli (Levine, R. 1984), y que fue modificado posteriormente para detectar carbonilos en proteína de extractos crudos (Starke, P. et al., 1987 y Ahn, B., et al., 1987). Este método se basa en la reacción de los grupos carbonilo con la 2,4-dinitrofenilhidrazina, produciendo una hidrazona estable que se detecta por su absorbencia a 375 nm.

Se prepararon extractos crudos del micelio superior en la relación de 100 mg polvos acetona por 1 ml de solución amortiguadora fosfatos 100 mM, pH 7. Dado que los ácidos nucleicos contienen grupos carbonilos, éstos se eliminaron de cada extracto precipitándolos con sulfato de estreptomina al 1% durante 5 min, a 4°C y luego centrifugando en una microfuga por 10 min. Los sobrenadantes se dividieron en dos alícuotas idénticas y se precipitaron dos veces con TCA al 10% en tubos cónicos. Una alícuota se trató con 1 ml de HCl 2 N y la otra con 1 ml de 2,4-dinitrofenilhidrazina al 0.2% (p/v) disuelta en HCl 2 N. Ambas muestras se incubaron a 25°C por 1 h con agitación frecuente. Cumplido el tiempo las muestras se reprecipitaron con 1 volumen de TCA al 20% y después se lavaron 2 veces con 2 ml de eter-etanol (1:1). Las pastillas se secaron y se disolvieron en guanidina 6 M, fosfato de potasio 20 mM, pH 6.5, y se les efectuó un espectro diferencial entre 500 y 200 nm.

La cantidad de grupos carbonilo se puede calcular a partir de la absorbencia a 375 nm, tomando en cuenta un valor promedio de 21.0 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para la absorbencia milimolar de los derivados alifáticos de la 2,4-dinitrofenilhidrazina y la cantidad de proteína usada para cada determinación (Starke, P., 1987). Sin embargo en este trabajo reportamos la absorbencia a 375 nm/mg de proteína.

Para las muestras oxidadas in vitro, se procedió de la misma manera sólo que se usaron los extractos de la condición 12 h de crecimiento (0 h de crecimiento de micelio aéreo) y se oxidaron in vitro, después de la precipitación de ácidos nucleicos, con las mezclas EDTA + FeIII + ascorbato ó FeIII + ascorbato + Azida de Sodio.



## RESULTADOS:

- I.- Aerial growth in Neurospora crassa: Characterization of an experimental model system.  
Ivonne Toledo, Jesús Aguirre and Wilhelm Hansberg. 1986  
Experimental Mycology 10:114-125

## RESUMEN:

Cuando el micelio de N. crassa crecido en líquido se filtra y se expone al aire, este forma rápidamente hifas aéreas que conidian de una manera sincrónica. El micelio expuesto al aire se puede separar en dos capas: una capa superior de micelio adherido y otra capa inferior compuesta de hifas sueltas. Para determinar si la pérdida de las actividades de las enzimas GS y GDH-NADPH en el micelio superior, en ausencia y presencia de nutrientes, se debían a la muerte por deshidratación del micelio superior o a un proceso activo, fué necesario caracterizar nuestro sistema experimental. Se determinó el papel de dicho micelio en el crecimiento aéreo de N. crassa en cuanto a la temporalidad de su formación, su actividad metabólica y a su contribución al crecimiento del micelio aéreo.

Se encontró que la adhesión de las hifas del micelio superior ocurre en menos de 30 min y que la actividad metabólica de este estrato es mucho mayor que la del micelio inferior, juzgando ésto por la incorporación de aminoácidos radioactivos hacia el interior de las hifas de ambos estratos y por la incorporación de la marca radioactiva en macromoléculas.

Se encontró que es el micelio superior el que forma al micelio aéreo. La contribución del micelio inferior para el crecimiento del micelio aéreo es indirecta y posiblemente a través de la excreción al medio de compuestos que posteriormente pueden incorporar el micelio superior o el micelio aéreo. Tanto en el micelio superior como en el inferior se detectó un aumento en la septación, en la vacuolización de las hifas y la disminución progresiva del número de núcleos. El micelio aéreo también mostró septación y vacuolización en la base de las hifas, mientras que el número de núcleos se incrementó en las partes altas de las hifas y en los conidióforos. Al igual que en otros sistemas biológicos, el amonio, el nitrato y la glutamina inhiben la esporulación, mientras que sacarosa la estimula. A partir de éstos resultados, se revaloró la formación del micelio superior como el verdadero inicio del proceso de diferenciación.

## Aerial Growth in *Neurospora crassa*: Characterization of an Experimental Model System

IVONNE TOLEDO, JESÚS AGUIRRE, AND WILHELM HANSBERG<sup>1</sup>

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Chamilpa, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, México

Accepted for publication November 11, 1965

TOLEDO, I., AGUIRRE, J., AND HANSBERG, W. 1966. Aerial growth in *Neurospora crassa*: Characterization of an experimental model system. *Experimental Mycology* 10, 114-125. Liquid-grown *Neurospora crassa* mycelia, when filtered and exposed to the air, rapidly formed aerial hyphae that conidiated in a synchronous manner. The air-exposed mycelial mat could be separated into two different layers: an upper layer of adherent mycelia and a lower layer of loose mycelia. Adhesion of the hyphae occurred in less than 0.5 h and the hyphae were characteristically arranged in interconnecting bundles. This upper layer produced the aerial hyphae that could be seen after 3 h exposure to air. Aerial hyphae grew during the next 9 h, conidiophores were formed after about 9 h exposure to air, and at 12 h loose conidia were obtained. In both layers, profuse septation occurred during the first hours of incubation, vacuolation increased, and the number of nuclei diminished with time. Aerial hyphae were also septated and vacuolation was observed at their bases; numerous nuclei were seen in the aerial hyphae and conidiophores. The lower layer also contributed to the formation of aerial hyphae in an indirect manner. The lower layer was metabolically much less active than the upper layer with regard to incorporation of labeled amino acids into both hyphae and macromolecules. Translocation of label from the lower layer to the upper layer and to the aerial hyphae was detected. Ammonium, nitrate, and glutamine inhibited, whereas sucrose stimulated aerial growth. © 1966 Academic Press, Inc.

INDEX DESCRIPTORS: conidiation; sporulation; aerial and mycelium or hyphae; nitrogen and inhibition; model system; *Neurospora crassa*.

Aerial growth and conidiation of *Neurospora crassa* occur when conidia are used to inoculate solid minimum media and the cultures are incubated under appropriate conditions for several days. The whole process is probably asynchronous: submerged mycelial growth overlaps in time with aerial growth, conidiophorogenesis, and conidiation. When a liquid culture of *N. crassa* is filtered and the resulting mycelial mat is exposed to the air in a temperature, light, and humidity controlled chamber, aerial growth is induced and synchronous conidiation is obtained (Stine and Clark, 1967; Cárdenas and Hansberg, 1964a). In exposing the mycelium to the air, growth ceases and part of the mycelium is transformed into aerial hyphae and conidia. After 3 h exposure to air, aerial mycelium

appears over the whole surface of the mycelial mat. The aerial hyphae grow evenly during the next 9 h and conidiate thereafter in a burst of a few hours. The conidia produced in this experimental system can start a new life cycle with its characteristic vegetative growth and reproduction (Stine and Clark, 1967; Cárdenas and Hansberg, 1964a). We have observed that the hyphae that were in direct contact with the air adhered to each other forming a tight tissue (Cárdenas and Hansberg, 1964a). This layer could be easily separated from the aerial mycelium and the loose mycelia below. The three fractions (aerial, upper, and lower mycelia) were analyzed and differences in metabolic activities were detected (Cárdenas and Hansberg, 1964b). In order to gain a better understanding of the physiology of aerial growth, it was important to determine the contribution of the

<sup>1</sup> To whom reprint requests should be addressed.

adherent mycelia of the upper layer (UL)<sup>2</sup> and the nonadherent mycelia of the lower layer (LL) to the development of the aerial hyphae (A). In this paper we present data which indicate that the UL of the mycelial mat is the one that forms the aerial mycelium. The lower layer contributes little to aerial growth and probably in an indirect manner. Septation, vacuolation, and differences in nuclear number were observed in all three structures. Also the effect of different nitrogen sources and sucrose upon aerial growth is reported.

#### MATERIALS AND METHODS

*N. crassa* strains and chemicals. The wild type strains 74-A and the proline auxotroph, *prol 3A*, were provided by J. Mora of this university; the adenine auxotroph, *ade 9a*, came from the Fungal Genetics Stock Center, The University of Kansas, Kansas City, Kansas.

The labeled amino acids were purchased from Amersham, and proline, adenine, albumin, and glutamine from Sigma; all other chemicals were Baker reagent grade.

*Growth conditions.* Conidial preparations were obtained from cultures grown in 250-ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml Vogel's minimum medium (Vogel, 1964) and 2% (w/v) agar and supplemented with 1.5% (w/v) sucrose (V + S). Cultures were incubated for 3 days in the dark at 29°C followed by 2 days in the light at 25°C and 80% relative humidity. Media for the *ade 9a* and the *prol 3A* strains were supplemented with 2 mM adenine and 1.7 mM L-proline, respectively. Conidia collected from the flasks were resuspended in distilled water and filtered through glass wool. Liquid media were inoculated with the conidial

suspension to give a final concentration of  $1 \times 10^6$  conidia/ml and cultures were incubated in a gyrotory shaker (240 rpm) at 30°C for 12 to 14 h.

*Growth of aerial mycelium.* Mycelia were obtained from liquid cultures grown for 12 to 14 h and filtered through a Whatman No. 41 filter paper in a Buchner funnel. The resulting mycelial mats were washed with twice the culture volume of cold 0.03 M phosphate buffer, pH 6.1 (Cárdenas and Hansberg, 1984a). During investigation of the effect of nutrient addition on aerial growth, phosphate buffer was supplemented with different concentrations of either  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KNO}_3$ , glutamine, or sucrose. Once excess buffer was eliminated, the mycelial mats were transferred to petri dishes and incubated in a chamber at 80% relative humidity and 25°C. After different incubation times one or several mycelial mats were taken out of the chamber and harvested. The aerial mycelium adheres to a spatula and could therefore be detached by simply passing a spatula over the entire surface of the mycelial mat. The mycelial mats were then washed with a jet of cold distilled water to separate the loose mycelia (LL) from the very tightly adherent mycelia of the uppermost layer (UL). All three mycelial fractions were collected, placed in 5% (w/v) trichloroacetic acid, and used for protein determinations.

*Incorporation of labeled amino acids.* Continuous label and pulse-chase label experiments were done using 5–8 ml per mycelial mat of 30 mM phosphate buffer, pH 6.1, containing 0.63  $\mu\text{Ci/ml}$  of either L-[U- $^{14}\text{C}$ ]glutamine (40 mCi/mmol) or L-[U- $^{14}\text{C}$ ]proline (200 mCi/mmol) or 0.1 mCi/ml of L-[ $^3\text{H}$ ]glutamate (50 Ci/mmol). Pulses were applied for 10 min and the mat was then washed by incubating successively seven times for 2 min each in 40 ml of fresh phosphate buffer. Thereafter one mycelial mat was separated into UL and LL and the radioactivity and protein were

<sup>2</sup> Abbreviations used: UL, upper layer; LL, lower layer; A, aerial hyphae; V + S, Vogel's minimum medium supplemented with sucrose; V - N, Vogel's minimum medium without  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

determined. The other mycelial mats were incubated in a humid chamber to form aerial mycelium. All protein determinations were carried out using the method of Lowry *et al.* (1951) with albumin as a standard.

For the translocation labeling experiments, the *prol 3A* strain (after 12 h growth in V + S supplemented with 0.9 mM L-proline) was labeled by adding 19.5  $\mu\text{Ci}$  L-[U- $^{14}\text{C}$ ]proline to a 150-ml culture and continuing incubation for another 3 h. Then, 50, 35, 25, and 15 ml of the labeled *prol 3A* culture were filtered in a 4.5-cm-diameter Buchner funnel and washed as usual. Similar amounts of an *ade 9a* 15-h culture (grown in V + S, supplemented with 2 mM adenine) were filtered and washed in a 5.5-cm-diameter Buchner funnel. Mixed strain mycelial mats were made by layering the *ade 9a* mats on top of the labeled *prol 3A* mats, completely covering these to give 50 ml culture per mat. The mats were maintained on agar slants without nutrients and incubated for 15 h or 5 days in a humid chamber. Thereafter, the mats were separated into LL, UL, and A and the radioactivity per milligram of protein was determined in each fraction. An aliquot of the 5-day-old aerial hyphae was used for spot-testing and mating-type tests, according to Davies and de Serres (1970).

**Microscopy.** The LL, UL, and A fractions were collected in distilled water and either examined immediately in a Zeiss phase-contrast microscope and photographed, or stained in one of the following ways: (a) samples were incubated 20 min in a 1% (w/v) solution of cotton blue at room temperature, placed on slides, and rinsed carefully with distilled water; (b) to see if there was extensive cell death in the mycelial mat, the samples were incubated up to 2 h in a 1% (w/v) solution of methylene blue; (c) to determine the amount of nuclei present in the hyphae, samples were stained with DAPI and viewed with fluorescent light (Martegani and Trezzi, 1979).

## RESULTS

### *Formation and Microscopy of the Upper Layer, Aerial Hyphae, and Conidia*

The hyphae in a mycelial mat in direct contact with the air adhered to each other forming a UL with the consistency of a tight tissue. Adhesion of the hyphae occurred very rapidly since after 20 minutes exposure to air the UL could already be separated from the LL (Fig. 1). During the first hour the UL became thicker at the expense of mycelia in the LL. As previously observed (Cárdenas and Hansberg, 1984b), protein degradation in the mycelial mat was enhanced. Mycelial mats which contained approximately 20 mg of protein at the beginning of incubation, lost about 20% of the protein during the initial 15 h incubation. After 5 days all the mycelia were in the UL and the total protein content had diminished more than 60% from the initial value (protein determinations of the experiment are shown in Table 1).

Aerial mycelium over the entire mycelial

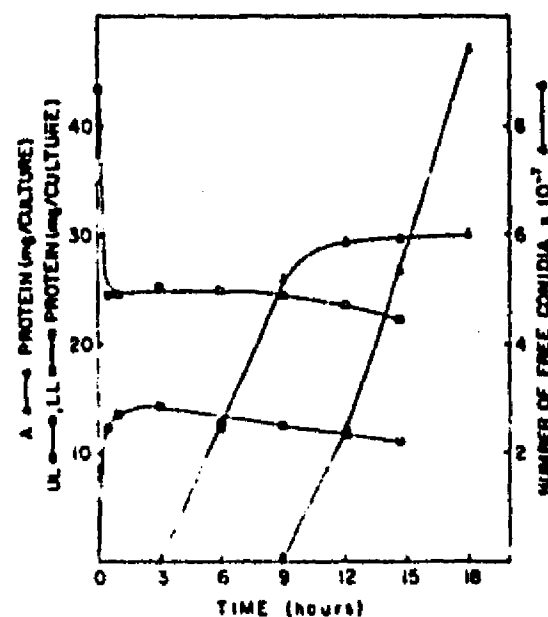


FIG. 1. Time course for protein content of hyphal layers and free conidium formation. Mycelial mats were exposed to the air and separated into LL, UL, A, and free conidia at the times indicated. Protein content in LL, UL, and A was determined and conidia were counted in a Neubauer chamber. Mean values are of two different experiments.

TABLE I  
Mixed Strain Mycelial Mats: Label Translocation and Analysis of Auxotrophy and Mating Type of the Resulting Conidia

Initial total protein* (mg)							Auxotrophy (%)		Mating type	
<i>prol 3A</i>	<i>ade 9a</i>	U1. after 15 h cpm/mg prot	U1. after 15 h cpm/mg prot	A after 15 h cpm/mg prot	U1. after 5 days cpm/mg prot	A after 5 days cpm/mg prot	<i>prol</i>	<i>ade</i>	<i>a</i>	<i>A</i>
24.4 (50 ml)		106,297	61,414	91,356	101,152	112,515	87	0	0	++++
14.3 (35 ml)	3.6 (15 ml)	80,081	42,049	48,743	90,865	67,505	47	20	..	+++
10.2 (25 ml)	6.0 (25 ml)	68,965	20,057	22,921	83,171	43,847	33	56	+++	++
6.1 (15 ml)	8.4 (35 ml)	40,479	12,832	9,875	50,564	35,493	0	57	++++	0
	12.1 (50 ml)	—	—	—	—	—	0	100	++++	0

\* Various amounts of liquid-grown adenine auxotroph, *ade 9a* (241  $\mu$ g protein/ml culture) was layered on top of various amounts of L-[U-<sup>14</sup>C]proline-labeled mycelium of the proline auxotroph, *prol 3A* (407  $\mu$ g protein/ml culture).

mat could be detected visually at 3 h incubation. The aerial mycelium grew during the next 9 h and loose conidia were obtained between 12 and 18 h incubation (Fig. 1).

Under the light microscope, three very distinct features could be observed: (1) extensive septation occurred during the first hours in the LL and UL; septation was also observed in *A* (Figs. 2,3); (2) vacuolation increased with time in LL and UL (Fig. 2) and was also detected at the bases of the conidiophores (Fig. 3); and (3) the number of nuclei diminished considerably in the LL and UL and were very numerous in the conidiophores (Fig. 4). The UL mycelia was characteristically arranged in interconnecting bundles of hyphae (Fig. 2).

#### Contribution of UL and LL to Aerial Growth

Mycelial mats with various amounts of mycelial biomass but with same diameter were induced to form aerial hyphae and after 15 h the protein content in the UL, LL, and *A* was determined. Cultures having less than 7 mg final protein had only

UL and were able to form aerial hyphae (Fig. 5). Increasing the biomass per culture gave higher amounts of aerial mycelium and also thicker UL and more LL. More than 25 mg of final protein per culture did not increase further the amount of aerial mycelium; the higher protein content in the UL with more than 35 mg final protein was due to increased area in the lateral surface of the mycelial mat, but most of the mycelium remained in the LL (Fig. 5).

To characterize further the UL and LL contribution to aerial growth, the following experiment was done: increasing amounts of mycelia of the adenine auxotroph strain, *ade 9a*, were layered on top of decreasing amounts of mycelia of a labeled proline auxotroph *prol 3A*; all combined mycelial mats had similar total amount of biomass and the same total exposed surface area. Different mating types were used in order to prevent formation of heterokaryons. After 5 days incubation, the conidia were harvested and analyzed with regard to their mating type and auxotrophy. As shown in Table 1, most of the conidia analyzed were of the *a* mating type and presented adenine



FIG. 2. Micrographs of growing hyphae, lower layer and upper layer hyphae. (a) Growing hypha after 12 h incubation in liquid medium, stained with cotton blue; (b) LL hyphae from a 3-h mycelial mat, unstained; (c) LL hyphae from a 9-h mycelial mat, unstained; (d) vacuolated LL hypha from a 12-h mycelial mat, stained with cotton blue; (e) nonvacuolated hyphal tip from the LL of a 12-h mycelial mat, unstained; (f) septated hyphae of an UL at 3 h air exposure, stained with cotton blue; (g) bundles of hyphae of an UL at 3 h air exposure, unstained; (h) vacuolated bundles of hyphae of an UL at 9 h air exposure, unstained. Magnification:  $\times 1350$ .

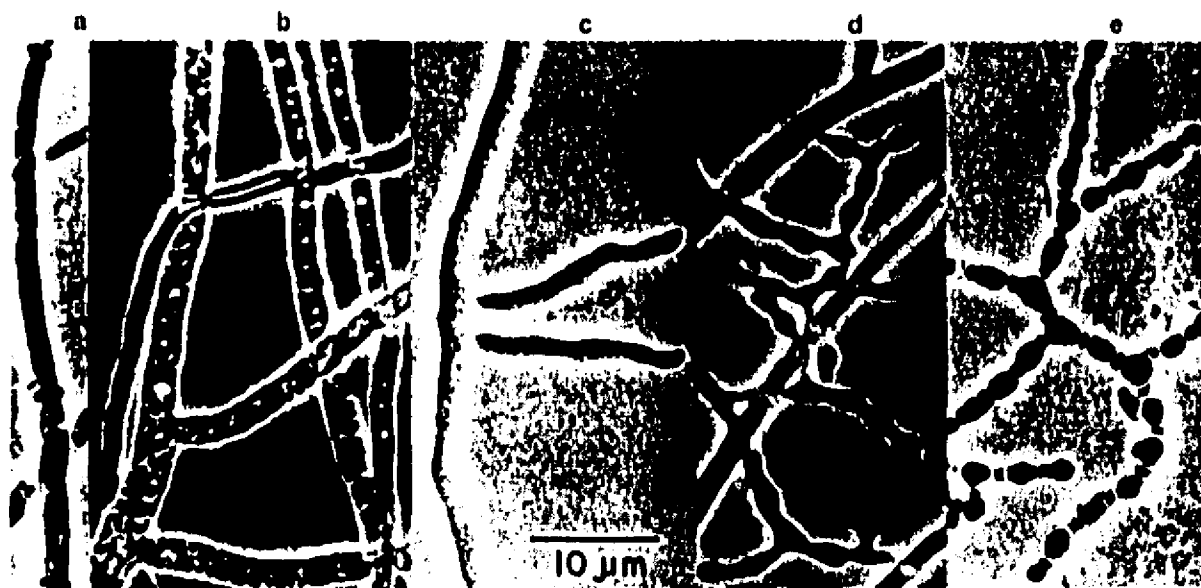


FIG. 3. Micrographs of aerial hyphae and conidiophores. Mycelial mats were separated into LL, UL, and A at different times and analyzed at the light microscope. (a) Septate aerial hypha at 6 h air exposure, stained with cotton blue; (b) vacuolation at the bases of aerial hyphae 6 h incubation, stained with cotton blue; (c) tips of an aerial hypha at 6 h, unstained; (d) nonseptate conidiophores at 9 h, unstained; (e) conidiophore with double septa between conidia, 12 h, stained with methylene blue. Magnification:  $\times 1400$ .

auxotrophy, i.e., were *ade 9a* conidia. Some *prol 3A* conidia were also detected, which were more abundant the lesser the amount of adenine auxotrophic mycelium was layered on top of the *prol 3A* mycelia. Conidia of the adenine auxotroph gave very small but visible colonies after 6 days on proline plates.

After 15 h incubation, the label of the *prol 3A* strain was detected in the UL and A (Table 1). This was also observed in the mixed strain mycelial mats which did not produce *prol 3A* conidia. Higher amounts of label were detected in A after 5 days incubation.

These experiments suggested that the UL was the one which formed the aerial hyphae and that the LL had an indirect effect on aerial mycelium growth. This conclusion is also sustained by the next two experiments. We asked ourselves if the LL also had the capacity to grow aerial mycelium. Mycelial mats with both layers were turned upside down at the times indicated in Fig. 6A, and the amount of aerial myce-

lium was determined 12 h later. It was observed that the loose mycelia of the LL adhered to each other turning into an UL which formed aerial mycelium. After 1 h the LL had a full capacity to form aerial mycelium. The amount of aerial hyphae formed decreased with longer incubation times (Fig. 6A).

In another experiment we asked ourselves how many times could a mycelial mat grow aerial mycelium. The aerial mycelium of mycelial mats with only UL or with both UL and LL were harvested and quantified every 12 h. Both cultures formed aerial mycelium, three times, each time a lesser amount, but the mats with both layers gave somewhat greater amounts of aerial mycelium (Fig. 6B).

#### *Metabolic Activity in the UL and LL*

From the experiments mentioned above it seemed clear that there was a different contribution of the LL and the UL to aerial growth. This could also be reflected in their metabolic activities. Labeled amino acid



FIG. 4. Nuclei in different mycelial layers. Mycelial mats were separated into LL, UL, and A at different times, stained with DAPI, and photomicrographed with normal and fluorescent light in a Zeiss phase-contrast microscope with camera. Fluorography of an LL hypha (a) at 3 h and (b) at 12 h air exposure. Fluorography of an UL hypha (c) at 3 h and (d) at 12 h air exposure. Fluorography of an aerial hypha (e) at 6 h and (f) at 9 h. (g) Conidiophore at 12 h and (h) its fluorography. Magnification:  $\times 1900$ .

incorporation experiments were performed in order to measure the amount of label that was transported into the mycelium in both layers, how much of this label was incorporated into acid precipitable material

and how much of it remained soluble. Experiments with labeled glutamine are shown in Fig. 7; labeled glutamate and proline gave similar results. When the radioactive amino acid was added to the mycelial



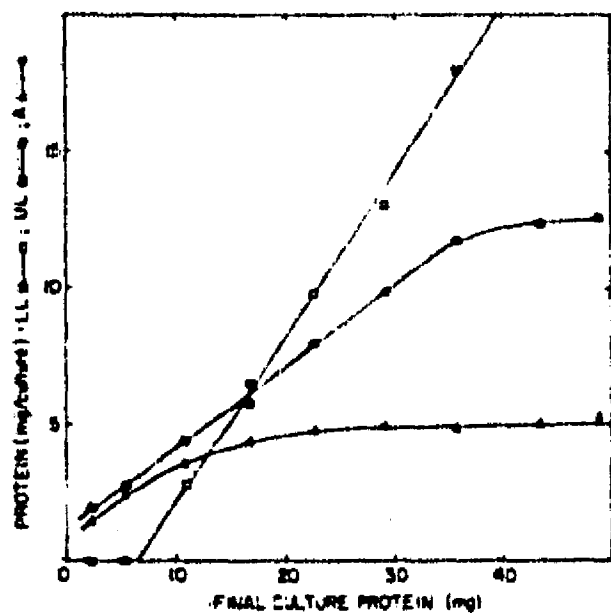


FIG. 5. Protein content of the layers in mycelial mats with different biomass but the same area. Mycelial mats were separated into LL, UL, and A after 15 h exposure to air and the protein content was determined for each fraction. Mean values of three mycelial mats ( $\sigma_2$ : LL < 0.69; UL < 0.91; A < 0.27)

mat from the beginning of incubation and the UL, LL, and A were analyzed after different times, twice as much label was found in the UL compared with the LL (Fig. 7A). After 9 h the label in the UL started to de-

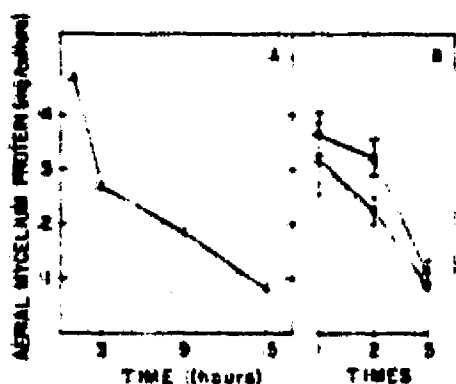


FIG. 6. The capacity of upper and lower mycelial layers to form aerial hyphae as indicated by protein content. (A) Mycelial mats with LL and UL were turned upside down after different times of air exposure and aerial hyphae were quantified 12 h later. Mean values of two different experiments. (B) Amount of aerial hyphae harvested every 12 h from mycelial mats with only UL (11 mg initial protein) or with LL and UL (21 mg initial protein). Each point represents the mean value of three mycelial mats.  $\Delta$ , UL only;  $\bullet$ , UL and LL.

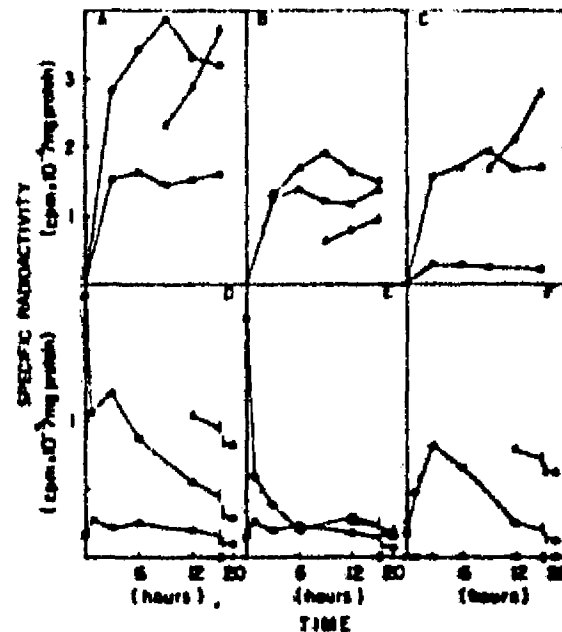


FIG. 7. Incorporation of 1-[U- $^{14}$ C]glutamic acid into different mycelial layers. (A), (B), and (C) are, respectively, total, soluble, and acid precipitable cpm/mg of protein in a continuous label experiment. (D), (E), and (F) are, respectively, total, soluble and acid precipitable cpm/mg of protein after a 10-min pulse at 3.5 h exposure to air.  $\square$ , LL;  $\bullet$ , UL;  $\Delta$ , A.

crease and increasing amounts of label were found in A (Fig. 7A). In the LL the label was incorporated into the hyphae predominantly during the first 3 h and most of the label remained soluble. In contrast, much of the label of the UL was in the acid precipitable fraction (Figs. 7B, C).

When a 10-minute pulse of labeled amino acid was given at 3.5 h exposure to air and analyzed thereafter at different times, the UL incorporated 12 times more label than the LL (Fig. 7D). Most of this label was initially soluble (Fig. 7E), but was rapidly incorporated into the acid precipitable fraction and then lost from this fraction (Figs. 7E, F). Label was also translocated into the aerial mycelium and was incorporated mainly into acid precipitable material (Figs. 7D-F). Most of the label incorporated into the LL mycelium remained soluble and only a negligible amount entered into acid precipitable material (Figs. 7D-F). About 30% of the total label initially incorporated into the mycelial mat was lost after 15 h in-

cubation, probably as labeled  $\text{CO}_2$ , since almost no label was found outside the mycelium and labeled  $\text{CO}_2$  evolution has been measured under similar experimental conditions (not shown).

#### Effect of Nutrient Additions

All of the preceding experiments were done under starvation conditions; i.e., the mycelium was washed with phosphate buffer before it was exposed to the air. When the mycelium was washed instead with media having the composition of Vogel's medium, with or without  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , and with or without sucrose, an inhibitory effect on aerial hypha formation of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  and a stimulatory effect of sucrose was observed (Fig. 8). Phosphate buffer and Vogel's medium without  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (V - N) gave higher amounts of aerial mycelial than distilled water. The inhibitory effect on aerial hypha production observed with complete Vogel's medium (V) was partially canceled by sucrose (V + S). Comparing the protein content of the UL and the aerial mycelium of these experiments it was observed that the greater the amount of aerials obtained the lower the amount of protein detected in the UL after 15 h exposure to air.

As shown in Fig. 9A, increasing amounts of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  or glutamine added to mycelial mats in phosphate buffer caused increased inhibition of aerial growth;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  or  $\text{KNO}_3$  at 20 and 40 mM had an effect similar to that of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (data not shown). When sucrose was added to the mycelial mats in phosphate buffer, an inhibition of aerial hypha production was observed at a 0.5% (w/v) sucrose concentration but stimulation of aerial growth was obtained between 1 and 3% (w/v) sucrose (Fig. 9B).

#### DISCUSSION

A mycelial mat of *N. crassa* exposed to air rapidly forms aerial mycelium and con-

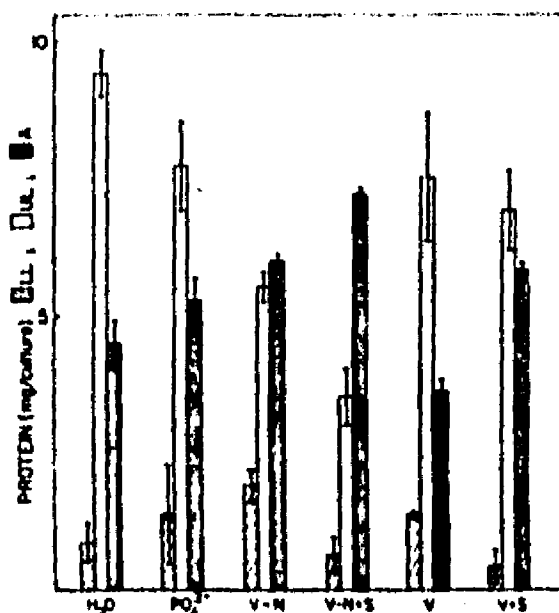


FIG. 8. Amounts of different layers in mycelial mats washed with different media before exposure to the air. V, Vogel's minimum medium and V - N, same without  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; V + S, Vogel's minimum medium with 1.5% sucrose and V - N + S, same without  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ;  $\text{PO}_4^{3-}$  represents phosphate buffer 0.03 M, pH 6.1. Bars indicate the mean values of two or three experiments with two mycelial mats for each medium, analyzed after 15 h.

diates in a synchronous manner (Stine and Clark, 1967; Cárdenas and Hansberg 1984a) (Fig. 1). Using this experimental system to study the physiology of aerial growth, we observed that in less than 0.5 h the mycelial mat could be separated into two fractions, an upper layer of adherent mycelia and a lower layer of loose mycelia (Figs. 1, 2). Since glutamine synthetase, NADPH dependent glutamate dehydrogenase, glutamate synthase, glutamine transaminase, and alanine transaminase specific activities were lost in the UL (Cárdenas and Hansberg, 1984b) it was first thought that the UL represented a dehydrated layer of dying mycelia. This turned out to be false. Vital dyes are excluded from the mycelia of both layers and only occasionally are segments delimited by full septa permeable to such dyes. Mycelia from both layers and also the aerial mycelia were able to grow when transferred to liquid media. The mycelia from the UL (15

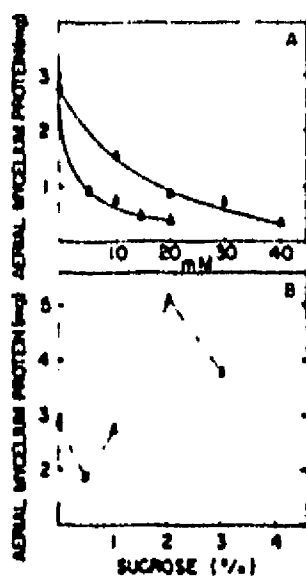


FIG. 9. Aerial growth inhibition with different nitrogen sources and stimulation by sucrose. Mycelial mats, washed with various amounts of either  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KNO}_3$ , glutamine, or sucrose, were separated at 15 h air exposure and protein content in aerial hyphae was determined. (A)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\Delta$ ; glutamine,  $\blacktriangle$ . (B) Sucrose: Mean values of two experiments.

h) reassumed growth in liquid minimum medium without an appreciable lag. Furthermore, as shown in this paper, the UL is the one that mainly forms the aerial mycelia. This conclusion is sustained by the following results: (a) Mycelial mats with only UL do form aerial hyphae (Figs. 5, 6B). (b) The mats with mycelia of an auxotrophic strain stratified on top of another strain formed conidia which had mainly or exclusively the genetic background of the auxotroph (Table 1). (c) The LL mycelia adhered to each other, i.e., turned into UL, before they could produce aerial mycelia (observation of the experiment shown in Fig. 6A). (d) The UL was much more active than the LL in incorporating labeled amino acids into the hyphae and into acid precipitable material (Fig. 7). (e) Most of the label incorporated in A is probably translocated from the UL (Fig. 7, Table 1).

Adhesion of the mycelia seems to us an important event related to the formation of aerial hyphae. In *N. crassa*, as we have also observed in other filamentous fungi such as *Aspergillus nidulans*, *Mucor rouxi*,

*Phycomyces blakesleeanus*, adhesion of the hyphae occurred or was enhanced whenever the mycelia were inhibited in growth. Stationary cultures of *N. crassa* also formed an upper layer of adherent mycelia and a lower layer of loose mycelia. In these cultures different enzymatic activities and amounts of carotenoids were found in the UL as compared to the LL (Zalokar, 1954, 1959). Polyoxyethylenesorbitan (Tween) is frequently used in order to avoid adhesion of the hyphae. When the mycelium of *N. crassa* was washed with 0.1% of Tween 80 solution before being induced to form aerial mycelium, no UL was formed and no aerial growth was obtained. Further experiments are in progress in order to establish whether adhesion of the hyphae in *N. crassa* is related to, or required for, aerial growth.

The LL of the mycelial mat also contributes to aerial growth since higher amounts of aerial mycelia are formed when both layers are present as compared with mycelial mats with only UL (Figs. 5, 6). Its contribution probably comes via degradation of macromolecules and excretion of the degradation products to the medium where these can be taken up by the UL. This interpretation is sustained by the observed loss in protein content (Cárdenas and Hansberg 1984b), excretion of  $\text{NH}_4^+$  to the medium (Cárdenas and Hansberg 1984b), increased vacuolation in the hyphae (Fig. 3), loss in the amount of nuclei (Fig. 4), and transfer of label from the LL to the UL and A (Table 1).

It has been reported that ammonium ions or glutamine inhibits sporulation in some microorganisms (Galbraith and Smith, 1969; Freese *et al.*, 1972; Elmerich and Aubert, 1975; Le'John *et al.*, 1978; Schindler and Sussman, 1979). We also found a strong inhibitory effect of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KNO}_3$ , and, particularly, glutamine on the formation of aerial hyphae in *N. crassa*. Glutamine is probably the repressor in the nitrogen catabolic circuit

(Marzluf, 1981) and catabolic enzymes, specifically proteases and amino acid oxidases, could play an important role in the conversion of a growing mycelium into a mycelium in the process of forming aerial hyphae (J. Aguirre, I. Toledo, and W. Hansberg, unpublished results). Sucrose, between 1 and 2% had a stimulatory effect on aerial growth. This effect partially cancels the inhibitory effect of 25 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Stimulation of sporulation by a carbon source has been observed with other multicellular microorganisms (Henney and Maxey, 1975) and gluconeogenic carbon sources are required for sporulation of unicellular microorganisms (Fowell, 1969; Schaeffer, 1969).

Finally, we stress that the model system analyzed in this paper offers advantages for the study of conidiation. Of most importance is the fact that the different structures can be separated. Separation is done with ease and is precise since very few conidiophores remained attached to the UL and the loose mycelia are washed away from it. Sufficient amounts of the different fractions can be obtained from one mycelial mat to allow biochemical analysis. The whole differentiation process is observed in the course of 1 day's work. The system is very reproducible and whichever variable is manipulated, the LL can be taken as a convenient control for what is specifically occurring in the UL. Different conditions are defined where the differentiation process is either stimulated or inhibited. We are confident that further analysis of this experimental system using different strains and incubation conditions will give us much information on the physiology of conidiation in *N. crassa*.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported in part by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Grant PCCBBNA 023644 to W. Hansberg. J. Aguirre was supported by a UNAM fellowship.

*Note added in proof.* A similar model system was used to isolate genes differentially expressed during conidiation (Berlin, V., and Yanofsky, C. 1985. *Mol. Cell. Biol.* 5:849-855.)

#### REFERENCES

- CÁRDENAS, M. E., AND HANSBERG, W. 1984a. Glutamine requirement for aerial mycelium in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 130: 1723-1732.
- CÁRDENAS, M. E., AND HANSBERG, W. 1984b. Glutamine metabolism during aerial mycelium growth of *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 130: 1733-1741.
- DAVIES, R. H., AND DE SERRES, F. J. 1970. Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. In *Methods in Enzymology* (H. Taboa, and C. W. Taboa, Eds.), Vol. 17A, pp. 79-142. Academic Press, New York.
- ELMERICH, C., AND AUBERT, J. P. 1975. Involvement of glutamic synthetase and the purine nucleotide pathway in repression of bacterial sporulation. In *Sporrs VI* (P. Gerhardt, R. N. Costlow, and H. L. Sadoff, Eds.), pp. 385-390. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- FEWELL, R. R. 1969. Sporulation and hybridization of yeasts. In *The Yeasts* (A. H. Rose and J. S. Harrison, Eds.), Vol. 1, pp. 303-306. Academic Press, New York.
- FRESE, E., OH, Y. K., FRESE, E. B., DIESTERHAFT, M. D., AND PRASAD, C. 1972. Suppression of sporulation of *Bacillus subtilis*. In *Sporrs V* (H. O. Halverson, R. S. Hanson, and L. L. Campbell, Eds.), pp. 212-221. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- GALBRAITH, J. C., AND SMITH, J. E. 1969. Sporulation of *Aspergillus niger* in submerged liquid culture. *J. Gen. Microbiol.* 59: 31-45.
- HENNEY, H. R., AND MAXEY, G. 1975. Nutritional control of differentiation (sclerotization) of the myxomycete *Physarum flavicomma*. *Canad. J. Biochem.* 53: 810-818.
- LE'JOHN, H. B., CAMERON, I. E., KLASSEN, G. R., AND MEUSER, R. V. 1978. Effects of L-glutamine and HS compounds on growth and sporulation metabolism of *Achlya*. *Canad. J. Biochem.* 56: 227-236.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., AND RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MARTEGAM, E., AND TREZZI, F. 1979. Fluorescent staining of *Neurospora maclei* with DAPI. *Neurospora Newsletter*, 26: 20-21.
- MARZLUF, G. A. 1981. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. *Microbiol. Rev.* 45: 437-461.
- SCHAEFFER, P. 1969. Sporulation and the production of

- antibiotics, enzymes, and exotoxins. *Bacteriol. Rev.* 33: 48-71.
- SCHEMELER, J., AND SUREMAN, M. 1979. Inhibition by ammonia of intracellular AMP accumulation in *Dicellaethium discoideum*: Its significance for the regulation of morphogenesis. *Dev. Genet.* 1: 13-20.
- STINE, G. J., AND CLARK, A. M. 1967. Synchronous production of conidiophores and conidia of *Neurospora crassa*. *Canad. J. Microbiol.* 13: 447-453.
- VORILL, H. J. 1964. Distribution of lysine pathways among fungi: Evolutionary implications. *Amer. Nat.* 98: 435-446.
- ZALOKAR, M. 1954. Studies on Biosynthesis of Carotenoids in *Neurospora crassa*. *Arch. Biochem. Biophys.* 50: 71-80.
- ZALOKAR, M. 1959. Enzyme activity and cell differentiation in *Neurospora*. *Amer. J. Bot.* 46: 555-559.

Se encontró que la GS de N. crassa se inactiva in vitro por ascorbato + FeIII o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + FeII, pura o en extractos crudos. La reacción de inactivación por ascorbato + FeIII es dependiente de oxígeno molecular, se inhibe por MnCl<sub>2</sub> o EDTA y se estimula en extractos por azida de sodio. Los polipéptidos y de la GS se modifican por estas reacciones dando lugar a dos polipéptidos con un punto isoeléctrico más ácido y del mismo peso molecular. Esta modificación se observó en la enzima pura y también en la enzima inmunoprecipitada de extractos incubados con NAD(P)H. Los polipéptidos modificados se detectaron in vivo cuando el micelio de N. crassa se privó de carbono en presencia de aire, condiciones en las que previamente se había reportado que la GS era degradada (Mora, Y. et al., 1980). La GS modificada in vitro es más susceptible a una actividad proteolítica del extracto crudo. Esta actividad es insensible a PMSF, inhibida por MnCl<sub>2</sub> y estimulada por EDTA.

Los resultados anteriores nos colocaron en condiciones de poder detectar a la GS oxidada durante el crecimiento aéreo, y abrieron la posibilidad de que otras enzimas también pudieran ser oxidadas, en particular la GDH-NADPH.

## Oxidation of *Neurospora crassa* Glutamine Synthetase

JESÚS AGUIRRE AND WILHELM HANSBERG\*

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

Received 16 August 1965/Accepted 10 March 1966

The glutamine synthetase of *Neurospora crassa*, either purified or in cell extracts, was inactivated by ascorbate plus  $\text{FeCl}_3$  and by  $\text{H}_2\text{O}_2$  plus  $\text{FeSO}_4$ . The inactivation reaction was oxygen dependent, inhibited by  $\text{MnCl}_2$  and EDTA, and stimulated in cell extracts by sodium azide. This inactivation could also be brought about by adding NADPH to the cell extract. The  $\alpha$  and  $\beta$  polypeptides of the active glutamine synthetase were modified by these inactivating reactions, giving rise to two novel acidic polypeptides. These modifications were observed with the purified enzyme, with cell extracts, and under in vivo conditions in which glutamine synthetase is degraded. The modified glutamine synthetase was more susceptible to endogenous phenylmethylsulfonyl fluoride-sensitive proteolytic activity, which was inhibited by  $\text{MnCl}_2$  and stimulated by EDTA. The possible physiological relevance of enzyme oxidation is discussed.

Our research on the regulation of nitrogen metabolism during the formation of *Neurospora crassa* aerial mycelia suggested that in the mycelium forming the aerial hyphae (1: I. Toledo, J. Aguirre, and W. Hansberg, *Exp. Mycol.*, in press), the glutamine synthetase (GS; EC 6.3.1.2.) was regulated at the level of enzyme degradation (2). Considering that *Escherichia coli* GS is site-specifically oxidized, yielding an inactive enzyme which is more susceptible to proteolytic attack than the unmodified one (6, 8-10, 15), we set out to determine whether the GS of *N. crassa* was also inactivated by oxidation. We report that oxidation of *N. crassa* GS  $\alpha$  and  $\beta$  polypeptides inactivated the enzyme, giving rise to two novel acidic polypeptides which were more susceptible to proteolysis than the unmodified ones. The data also suggest that the modification reaction can occur in vivo and is related to the physiological conditions of the fungus.

### MATERIALS AND METHODS

**Reagents and chemicals.** Reagents for enzyme determinations, HEPES (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid) buffer, nucleotides, and ascorbate were purchased from Sigma Chemical Co. The electrophoresis reagents were obtained from Bio-Rad Laboratories, and all other chemicals were Baker reagent grade.

**Strains and culture conditions.** Wild-type *N. crassa* strain 74A came originally from the Fungal Genetics Stock Center at the University of Kansas, Kansas City. The *gln-1hR8* strain, a revertant of the glutamine auxotrophy mutation *gln-1b*, which lacks the  $\beta$  polypeptide of GS (3), was kindly provided by G. Dávila from this university. This strain has completely regained the ability to grow in minimal medium.

Cultures were grown from a conidial inoculum of  $10^6$  conidia per ml for 12 to 14 h at 30°C in Vogel minimal medium (22) supplemented with 1.5% sucrose. Aeration was provided by a gyratory shaker at 240 rpm. In some experiments cultures were transferred after 12 h of growth into fresh minimal medium without sucrose. Thereafter, these cultures were divided in two parts. One was agitated under the same conditions but at a high air-to-liquid volume ratio (about 20); the other was incubated without agitation at the same temperature in a closed flask filled to the top to eliminate any air chamber. At different times samples of

these cultures were taken and dehydrated with acetone. Acetone powders of these and other cultures were stored at -20°C until used.

**Cell extracts and enzyme assays.** Acetone powders were ground with dry ice and suspended in 50 mM HEPES buffer (pH 7.2)-10 mM KCl for GS activity assays or in 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7) for catalase activity assays.

GS activity was assayed by the method of Ferguson and Sims (5). Transferase and synthetase activities are expressed as micromoles of  $\gamma$ -glutamyl hydroxamate per milligram of protein produced in 1 minute at 30°C. Protein was determined by the method of Lowry et al. (12).

Catalase (EC 1.11.1.6) activity was assayed with 15 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  by the method of Munkres et al. (14) and expressed as the  $\Delta A_{240}$  per minute per milligram of protein, because catalase activity units have not been defined due to abnormal kinetics. Sodium azide (10 mM) inhibited 96% of the catalase activity at 4°C.

**Inactivation of GS.** Purified GS was inactivated by addition of an ascorbate solution (neutralized with NaOH) at a final concentration of either 15 or 20 mM and an  $\text{FeCl}_3$  solution at a final concentration of 0.4 mM. Both solutions were freshly prepared. Incubation was carried out at 4 or 22°C. Samples were taken at different times and assayed directly for GS activity.

The inactivation of GS in cell extracts was done with 20 mM ascorbate and 0.4 mM  $\text{FeCl}_3$  at 4 or 30°C, usually in the presence of 10 mM  $\text{NaN}_3$  to inhibit endogenous catalase activity (10). Freshly prepared  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{FeSO}_4$  solutions (0.2 and 0.4 mM final concentration, respectively) were also used to inactivate the cell extract GS at 4°C. A third way to inactivate the cell extract GS was by adding a freshly prepared NADPH solution to a final concentration of 5 or 10 mM and incubating at 4 or 30°C.

**Susceptibility of GS to endogenous protease activity.** A cell extract in 50 mM HEPES (pH 6.1)-10 mM KCl, treated with ascorbate- $\text{FeCl}_3$  and  $\text{NaN}_3$  and untreated, was incubated at 37°C for up to 4 h. Under these conditions only half of the endogenous protease activity was sensitive to 40  $\mu\text{M}$  phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), as measured by solubilization of radioactive proteins in 10% trichloroacetic acid (W. Hansberg, unpublished results). Following proteolysis, samples with 30 mU of initial GS activity were run for 18 h at 50 V in a quantitative immunoelectrophoresis system as

\* Corresponding author.

TABLE 1. Oxidative inactivation of purified GS\*

Addition	Activity remaining (%)
None	100
ASC	76.4 ± 2.8
FeCl <sub>3</sub>	98.0 ± 2.0
ASC + FeCl <sub>3</sub>	55.0 ± 4.6
ASC + FeCl <sub>3</sub> , (10) atm.	85
ASC + MnCl <sub>2</sub>	90.3 ± 8.7
ASC + FeCl <sub>3</sub> + EDTA	86.0 ± 8.5
ASC + EDTA	83.3 ± 6.8
ASC + NaN <sub>3</sub>	77.0 ± 0

\* Activity was assayed following incubation for 20 min at 22°C. Transferase activity without treatment was about 0.1 U/ml. Values are means for two or three determinations. Final concentrations were: ascorbate (ASC), 0.15 mM; FeCl<sub>3</sub>, 0.1 mM; MnCl<sub>2</sub>, 4 mM; EDTA, 1 mM; NaN<sub>3</sub>, 0.5 mM.

described by Laurell (7). Goat antibody against purified GS was used (20). After the gel was stained and dried, the relative area of each precipitation peak was determined by cutting off the peaks from a photocopy and weighing them.

**Immunoprecipitation of GS.** Samples of cell extracts (0.4 mg of protein) in 50 mM HEPES (pH 7.2)-50 mM glutamate-10 mM KCl were immunoprecipitated by adding a polyclonal rabbit antibody against purified GS (20). The reaction was carried out for 12 h at 4°C in the presence of 0.4 mM PMSF, 3.5 mM β-mercaptoethanol, 3.3 mM bisulfite, 2.3 mg of bovine albumin per ml, and 4 mM MnCl<sub>2</sub> to avoid oxidation during immunoprecipitation. Immunoprecipitates were layered on top of discontinuous sucrose gradients and centrifuged at 9,000 × g for 30 min at 4°C (17).

**Electrophoresis and staining.** The immunoprecipitates were analyzed by two-dimensional electrophoresis in polyacrylamide gels by the method of O'Farrell (16). The final voltage pulse in the first dimension was omitted, and the second dimension was run with urea (19). The gels were stained either with Coomassie brilliant blue or by the silver stain procedure of Wray et al. (23).

## RESULTS

**Oxidative inactivation of purified GS.** Purified GS of *N. crassa* was treated with ascorbate (9) and then assayed for GS activity. Treatment with ascorbate partially inactivated the enzyme (Table 1). This inactivation was strongly enhanced by FeCl<sub>3</sub> and was dependent on molecular oxygen, since it did not occur under a CO<sub>2</sub> atmosphere (Table 1). Manganese and EDTA suppressed inactivation in the presence of air. These results suggested that the GS of *N. crassa*

TABLE 2. Oxidative inactivation of GS in cell extracts\*

Addition	Activity remaining (%)
None	100
NaN <sub>3</sub>	95.2 ± 2.0
NaN <sub>3</sub> + ASC	100.2 ± 4.3
NaN <sub>3</sub> + FeCl <sub>3</sub>	103.3 ± 4.7
ASC + FeCl <sub>3</sub>	79.8 ± 4.1
NaN <sub>3</sub> + ASC + FeCl <sub>3</sub>	10.3 ± 5.4
NaN <sub>3</sub> + ASC + FeCl <sub>3</sub> + MnCl <sub>2</sub>	95.9 ± 4.1
NaN <sub>3</sub> + ASC + FeCl <sub>3</sub> + EDTA	93.1 ± 2.9

\* Inactivation was done at 4°C for 60 min. Sodium azide (10 mM) was used to inhibit endogenous catalase activity. Initial specific activity, 0.5 U/mg of protein. Values are means for three determinations. Concentrations: ascorbate (ASC), 20 mM; FeCl<sub>3</sub>, 0.4 mM; MnCl<sub>2</sub>, 4 mM; EDTA, 1 mM.

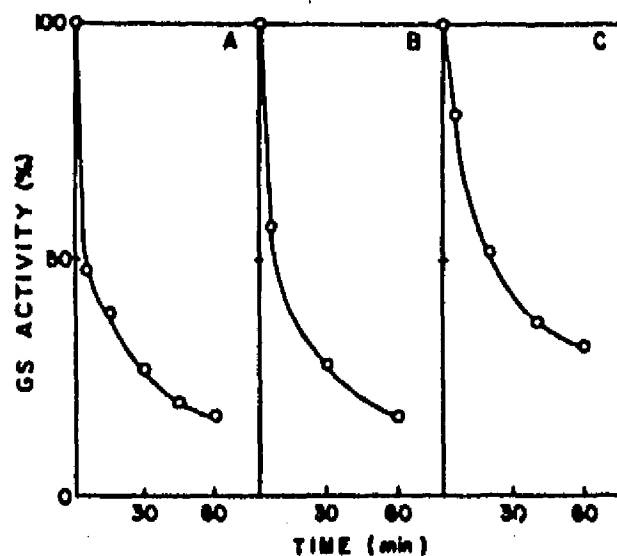


FIG. 1. Ascorbate-FeCl<sub>3</sub> inactivation of GS in cell extracts. Inactivation was done in the presence of sodium azide (10 mM) with 20 mM ascorbate and 0.4 mM FeCl<sub>3</sub> for 60 min at 4°C. (A) Transferase activity in a wild-type strain 74A cell extract after 14 h of growth. β/α ratio was about 3. (B) Synthetase activity in the same cell extract. (C) Transferase activity in a cell extract of the *gln-16R8* mutant strain, which lacks the GS β polypeptide.

underwent an oxidative inactivation similar to the one described for the *E. coli* GS by Stadtman and Levine and their co-workers (6, 8-10, 15).

**Biochemical characterization of GS inactivation by ascorbate.** In an extract of *N. crassa* wild-type strain 74A mycelium, GS was also inactivated when treated with ascorbate plus FeCl<sub>3</sub> at 4°C (Table 2). This inactivation was stronger when sodium azide was used to inhibit the catalase activity of the extract (10). Catalase activity in this extract was 1.09 ΔA<sub>240</sub> per mg per min and was 96% inhibited by the concentration of azide used. Therefore, all subsequent assays with cell extracts were done in the presence of azide. As shown for the purified GS, the inactivation reaction in the cell extracts was also suppressed by MnCl<sub>2</sub> and EDTA. GS transferase and synthetase activities were inactivated by ascorbate plus FeCl<sub>3</sub> (Fig. 1A and B).

*N. crassa* has two polypeptides with GS activity, which are called α and β (3, 19). In the wild-type extract, the β/α ratio was about 3; the α polypeptide had a higher affinity for substrates but a lower turnover number than the β polypeptide (J. Guzmán and J. Mora, manuscript in preparation). The loss of activity suggested that both polypeptides had been inactivated. This result was confirmed by the fact that in the *gln-16R8* mutant strain, which has only the α polypeptide (3), the GS was also inactivated by ascorbate plus FeCl<sub>3</sub>, although not as much as the wild-type GS (Fig. 1A and C).

The GS activity in the wild-type strain was to some extent protected from inactivation by ascorbate plus FeCl<sub>3</sub> when the substrates of the synthetase activity were present, particularly ATP or ATP plus glutamate (Fig. 2). Ammonium ions did not protect it, and phosphate ions and glutamine made the enzyme slightly more susceptible to inactivation (Fig. 2).

**Molecular characterization of oxidized GS.** It has been suggested that the *E. coli* GS is inactivated by oxidation of a single histidine residue, yielding a carbonylated imidazole derivative (18). When *N. crassa* wild-type mycelium extract



was immunoprecipitated with antibodies against purified GS and subjected to two-dimensional electrophoresis in a polyacrylamide slab gel, the two polypeptides,  $\alpha$  and  $\beta$ , were observed. Careful observation revealed two other polypeptides with similar molecular weights, but having a slightly more acidic isoelectric point. When the extract was treated with the ascorbate- $\text{FeCl}_3$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$ - $\text{FeSO}_4$  oxidizing systems prior to immunoprecipitation, the amount of  $\alpha$  and  $\beta$  polypeptides in the gel diminished and the two more acidic polypeptides increased in intensity (Fig. 3). Pure GS treated with ascorbate plus  $\text{FeCl}_3$  gave the same result (data not shown). These data suggested that the  $\alpha$  and  $\beta$  polypeptides were partially modified by the ascorbate- $\text{FeCl}_3$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$ - $\text{FeSO}_4$  oxidizing systems, giving two more acidic polypeptides. These modified  $\alpha$  and  $\beta$  polypeptides are called  $\alpha'$  and  $\beta'$  polypeptides hereafter. Beside these polypeptides, two other polypeptides of lower molecular weight than  $\alpha$  and  $\beta$  were present in the oxidized cell extracts. The significance of these two polypeptides is not known and is under investigation.

Under the conditions used in the above experiment, the inactivation of GS was about 80% of the initial enzyme activity. The relative intensities of  $\alpha$  and  $\alpha'$  and  $\beta$  and  $\beta'$  were not in accord with the degree of inactivation. It was probable that oxidative modification of few monomers in the oligomeric structure, principally octamers (11), caused the loss of most of the activity. On the other hand, complete inactivation was never observed. To detect higher  $\beta'/\beta$  ratios, pure GS containing almost exclusively  $\beta$  polypeptide was inactivated under dissociating conditions (1 M NaCl at 4 or 20°C) and electrophoresed in two-dimensional gels (Fig. 3). The  $\beta$  polypeptide diminished in intensity, while the  $\beta'$  polypeptide remained about the same; but at least two other more acidic polypeptides of same molecular weight were visible (Fig. 3F).

Sensitivity of inactivated GS to endogenous protease activity. To measure the susceptibility of the active and inactivated GS to endogenous proteolytic activity, a mycelial extract was incubated under conditions in which endogenous proteases were active and then analyzed with a quantitative immunoelectrophoresis system. The ascorbate- $\text{FeCl}_3$ -

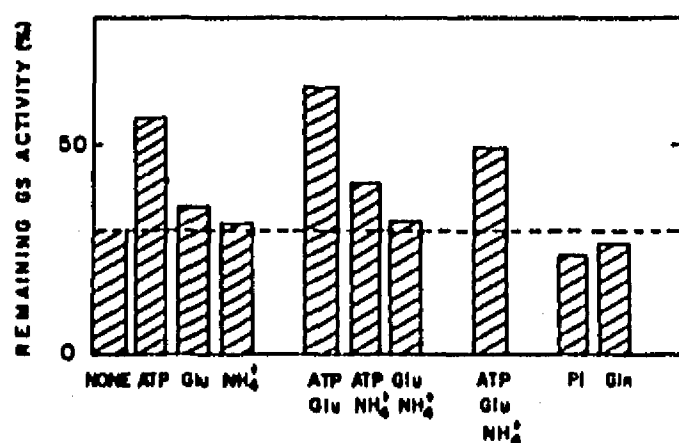


FIG. 2. Effect of substrates and products on inactivation of GS of ascorbate- $\text{FeCl}_3$ . The conditions were as for Fig. 1 except that the wild-type enzyme activity was assayed after 30 min of inactivation. Values above the dashed line indicate protection from inactivation; values below indicate labilization of the enzyme to inactivation. Final concentrations: ATP, 15 mM; glutamate, 5 mM;  $\text{NH}_4^+$ , 10 mM; glutamine, 14 mM; P<sub>i</sub>, 1 mM.

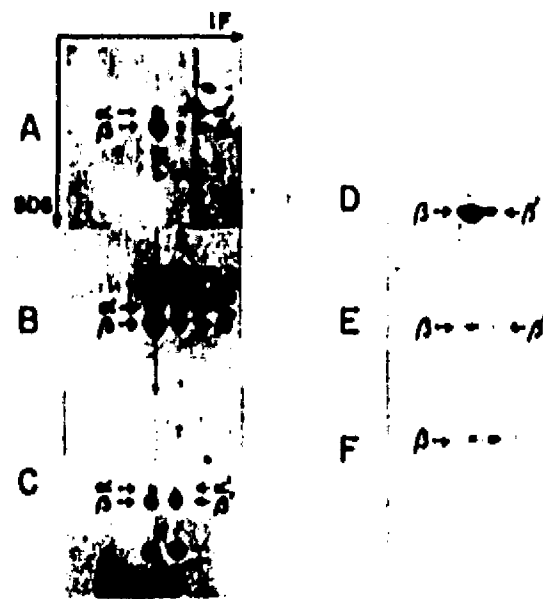


FIG. 3. Oxidative modification of  $\alpha$  and  $\beta$  polypeptides. Inactivation with ascorbate- $\text{FeCl}_3$  was done as described in the legend to Fig. 1. Inactivation with  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.2 mM) plus  $\text{FeSO}_4$  (0.4 mM) was carried out for 60 min at 4°C. GS immunoprecipitates and purified GS were separated by two-dimensional electrophoresis in polyacrylamide gels. (A) Nonoxidized cell extract; (B) ascorbate- $\text{FeCl}_3$ -treated cell extract; (C)  $\text{H}_2\text{O}_2$ - $\text{FeSO}_4$ -treated cell extract; (D) purified GS from a mycelium which had almost exclusively  $\beta$  polypeptide; (E) the same enzyme incubated with 1 M NaCl at 4°C and then treated with ascorbate- $\text{FeCl}_3$ ; (F) the same enzyme incubated with 1 M NaCl at 20°C and then treated with ascorbate- $\text{FeCl}_3$ . (A, B, C) Silver stained; (D, E, F) stained with Coomassie brilliant blue.

inactivated GS in the presence of sodium azide was more susceptible to proteolytic attack than the GS treated with either ascorbate,  $\text{FeCl}_3$ , or azide alone (Table 3). It was also observed that proteolysis of the inactivated GS antigen was stimulated by EDTA (68% with 1.5 mM EDTA), was inhibited by  $\text{MnCl}_2$  (65% with 4 mM  $\text{MnCl}_2$ ), and was not affected by PMSF (16% activation with 3 mM PMSF). (The loss of antigen without any addition, about 30%, was taken as 100% proteolysis). After 4 h of proteolysis, only one-third of the active GS antigen was lost, while the inactivated GS antigen was completely lost in the same period (Fig. 4). To exclude a possible effect of ascorbate and  $\text{FeCl}_3$  on the proteolytic assay, a cell extract was divided into two fractions. One was treated with ascorbate- $\text{FeCl}_3$ , and then  $\text{MnCl}_2$  was added; the other fraction had  $\text{MnCl}_2$  added first and was then incubated with ascorbate- $\text{FeCl}_3$ . Both extracts were then incubated under proteolysis conditions and run in the quantitative immunoelectrophoresis system. Manganese partially inhibited both oxidation by the ascorbate- $\text{FeCl}_3$  system and proteolytic activity. Nevertheless, loss of the GS antigen was higher in the GS inactivated with ascorbate- $\text{FeCl}_3$  before the addition of manganese, compared with the GS which was treated with the oxidizing system in the presence of manganese (Fig. 4). These data show that the ascorbate- $\text{FeCl}_3$ -inactivated GS was preferentially degraded by an endogenous protease activity which was sensitive to divalent cations and not inhibited by PMSF.

Inactivation of GS by NADPH. Oxidation of *E. coli* GS is thought to be a physiological response mediated by a mixed-function oxidation enzyme which requires NADPH (10). We incubated a cell extract with NADPH in the presence of sodium azide. GS was inactivated by NADPH or NADH in

TABLE 3. Disappearance of GS antigen in extracts with proteolytic activity\*

Addition	% Loss of antigen
None	0
FeCl <sub>3</sub>	4
NaN <sub>3</sub>	10
Ascorbate	22
Ascorbate + NaN <sub>3</sub>	27
FeCl <sub>3</sub> + NaN <sub>3</sub>	28
Ascorbate + FeCl <sub>3</sub>	37
Ascorbate + FeCl <sub>3</sub> + NaN <sub>3</sub>	46

\* Incubation was done at 4°C for 60 min. Incubation for proteolysis was for 4 h at 37°C with 1.5 mM EDTA. Final concentrations: FeCl<sub>3</sub>, 0.4 mM; NaN<sub>3</sub>, 10 mM; ascorbate, 20 mM.

the extract (Fig. 5). Manganese and also EDTA inhibited the inactivation reaction, and FeCl<sub>3</sub> stimulated it (Table 4). There was 25% more inactivation of GS at room temperature than at 4°C (Fig. 5), indicating a probable enzyme activity in the extract.

To be certain that the inactivation mediated by NADPH was equivalent to the oxidation brought about by ascorbate and FeCl<sub>3</sub>, an NADPH-treated extract was immunoprecipitated and analyzed by two-dimensional electrophoresis. More  $\alpha'$  and  $\beta'$  were observed with the NADPH-inactivated extract (Fig. 5, inset) than with the untreated active GS (Fig. 3A). This suggested that the  $\alpha$  and  $\beta$  polypeptides of GS could be modified to the  $\alpha'$  and  $\beta'$  polypeptides by an endogenous NADPH-dependent activity.

Inactivation of GS is related to physiological conditions. The experiments above suggested that GS was oxidized by an endogenous enzymatic activity which required NADPH. It

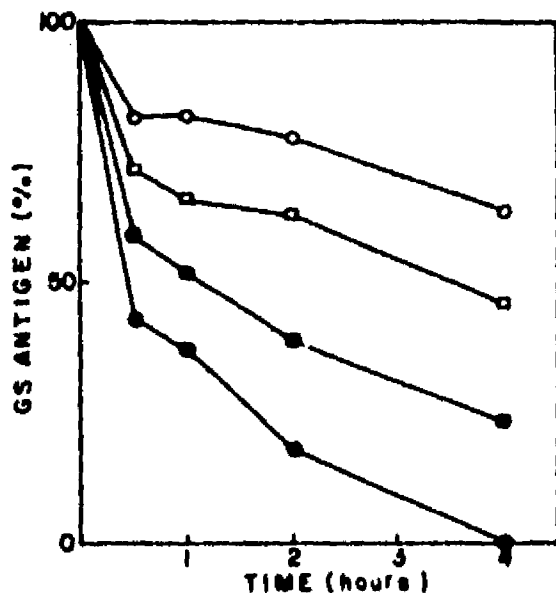


FIG. 4. GS sensitivity to endogenous proteolytic activity. A cell extract was treated with ascorbate-FeCl<sub>3</sub> and then incubated at 37°C for the times indicated. Symbols: O, not treated; ●, treated with ascorbate-FeCl<sub>3</sub>; ◐, treated with ascorbate-FeCl<sub>3</sub> in the presence of MnCl<sub>2</sub> (4 mM); ◑, treated with ascorbate-FeCl<sub>3</sub>, with MnCl<sub>2</sub> added before incubation at 37°C. Values are means for two experiments, with a maximal variation of 3%.

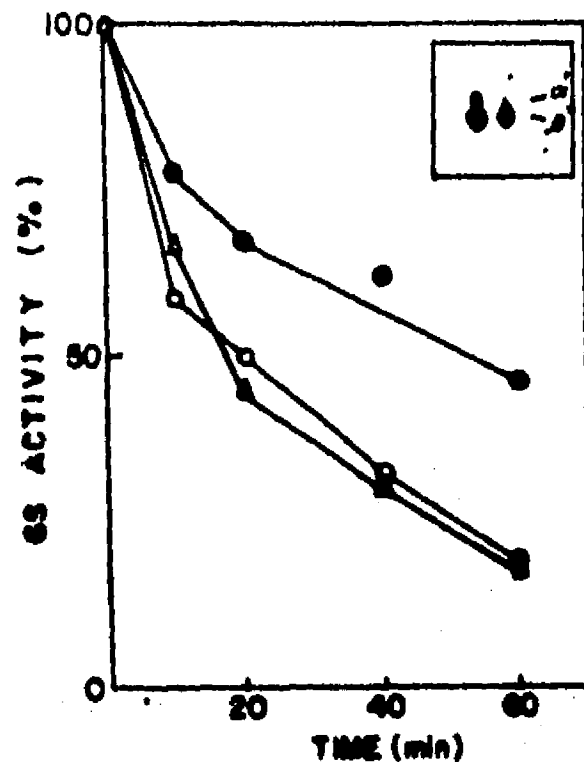


FIG. 5. GS inactivation by NADPH in cell extracts. Inactivation was done by adding either NADPH or NADH (5 mM) to the cell extract and incubating at 30 or 4°C for the times indicated. The extract contained sodium azide (10 mM) and FeCl<sub>3</sub> (0.4 mM). Sodium azide plus FeCl<sub>3</sub> alone gave 39% remaining activity after 60 min of incubation at 30°C. Addition of NADPH in the absence of sodium azide gave 66% remaining activity after 60 min at 30°C. Symbols: O, NADPH at 30°C; ●, NADPH at 4°C; Δ, NADH at 30°C. (Inset) Immunoprecipitated GS from a 60-min NADPH-treated cell extract electrophoresed in a polyacrylamide gel in two dimensions and then silver stained.  $\alpha'$  and  $\beta'$  are indicated.

has been reported that GS is degraded when carbon sources are limiting (13). To detect whether degradation of GS due to carbon source limitation is dependent on molecular oxygen, liquid-grown mycelium of *N. crassa* was transferred into minimal medium without a carbon source and then divided into two cultures. One was agitated as usual but with a high air-to-liquid volume ratio, and the other was kept still and incubated in a closed flask filled to the top to avoid an air

TABLE 4. Inactivation of GS in cell extracts in the presence of NADPH\*

Addition	Activity remaining (%)
None	100
NADPH	86.2 ± 0.8
NADPH + NaN <sub>3</sub>	88.0 ± 1.3
NADPH + NaN <sub>3</sub> + FeCl <sub>3</sub>	25.1 ± 3.8
NADPH + NaN <sub>3</sub> + FeCl <sub>3</sub> (4°C)	54.1 ± 0.6
NADPH + NaN <sub>3</sub> + FeCl <sub>3</sub> + MnCl <sub>2</sub>	103.3 ± 1.2
NADPH + NaN <sub>3</sub> + FeCl <sub>3</sub> + EDTA	89.7 ± 2.0

\* Incubation was done at 22°C unless stated differently. Initial specific activity, 0.43 U/mg of protein. Values are means for three determinations. Final concentrations: NADPH, 5 mM; NaN<sub>3</sub>, 10 mM; FeCl<sub>3</sub>, 0.4 mM; MnCl<sub>2</sub>, 4 mM; EDTA, 1 mM.

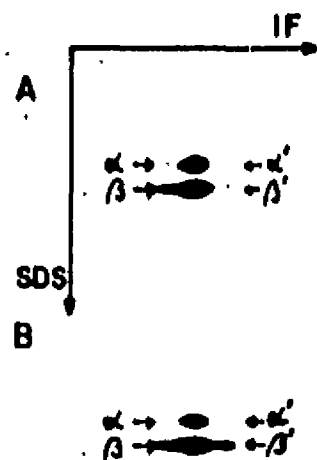


FIG. 6. Polypeptides of in vivo-modified GS. Mycelia of a 12-h culture were transferred into fresh medium without sucrose and then incubated for 3 h either in a closed flask without an air chamber or by agitating in a flask with a high air-to-liquid volume ratio. Cell extracts were immunoprecipitated with anti-GS antibodies, and the immunoprecipitates were electrophoresed in polyacrylamide gels in two dimensions and then silver stained. Panels show GS immunoprecipitated from non-aerated mycelium (A) and hyperaerated mycelium (B). The directions of sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoelectrofocusing (IF) are indicated.

chamber. At different times the two mycelia were harvested and dehydrated with acetone, and cell extracts were prepared. GS activity in the extracts of the non-aerated mycelia remained at nearly the pretreatment level (90% activity remaining at 3 h), whereas the enzyme activity diminished with time in the extracts of the aerated mycelia (33% activity remaining at 3 h). The immunoprecipitate of the non-aerated mycelia (3 h) had some  $\alpha'$  and  $\beta'$  polypeptides, but the amounts of these two polypeptides were clearly higher in the extract immunoprecipitate of the aerated mycelia (Fig. 6). The immunoprecipitate of the extract before treatment is shown in Fig. 3A. These results suggest that GS polypeptides  $\alpha$  and  $\beta$  are modified in vivo under strong aerating conditions.

#### DISCUSSION

In this paper we have studied the oxidative inactivation of GS in *N. crassa*. Using the oxidizing system described by Stadtman, Levine, and their co-workers (6, 8-10, 15), we have been able to show that the  $\alpha$  and  $\beta$  polypeptides of the active GS of *N. crassa* were modified, giving rise to two more acidic polypeptides, called  $\alpha'$  and  $\beta'$ . The modification reaction was dependent on the addition of a compound, ascorbate or NADPH in cell extracts, that can be readily oxidized in the presence of molecular oxygen, giving rise to  $H_2O_2$ . Endogenous catalase activity inhibited the modification of GS, and  $H_2O_2$  in the presence of Fe(II) brought about the same enzyme modification. This suggests that  $H_2O_2$  participates in the inactivation reaction. Hydrogen peroxide in the presence of Fe(II) ions gives rise to an activated oxygen species which is thought to be responsible for the enzyme oxidation (10).

Higher proportions of  $\alpha'$  and  $\beta'$  were detected under

different conditions: ascorbate-FeCl<sub>3</sub>-inactivated pure GS; NADPH-, ascorbate-FeCl<sub>3</sub>, or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-FeSO<sub>4</sub>-inactivated GS in cellular extracts; and in vivo conditions in which GS is degraded. In all these conditions the amount of  $\alpha$  and  $\beta$  polypeptides diminished and proportionally more  $\alpha'$  and  $\beta'$  were detected. The displacement to a more acidic isoelectric point suggested the gain of negative charges. More acidic polypeptides than  $\alpha'$  and  $\beta'$  were observed when the modification was done under dissociating conditions. Under these conditions probably other sites for modification are exposed. The distances in the gel between a polypeptide and its more acidic form were similar and consistent with a sequential gain of probably a single negative charge.

The oxidative inactivation of GS was not quantitatively related to the appearance of the  $\alpha'$  and  $\beta'$  polypeptides. This could mean that only a few modification sites are exposed in the oligomeric structures of *N. crassa* GS. Alternatively, it could indicate negative cooperativity in the oligomer, e.g., one or a few oxidized monomers in the oligomer bring about a conformational change that renders the enzyme less active but inaccessible to further oxidation. Both possibilities are in accord with the higher proportion of modified polypeptides that were obtained by inactivation under dissociating conditions. Another possible explanation is that the modification reaction is reversible and that equilibrium is reached after only 1 h. Quantitative correlation between the degree of activity inhibition and the amount of modified polypeptides present in the immunoprecipitates was also prevented by the fact that these polypeptides were more susceptible to proteolytic attack and proteolysis could occur during the immunoprecipitation procedure. The appearance of lower-molecular-weight polypeptides, particularly when H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Fe(II) were added to a cell extract, could be due to the presence of degradation products in these immunoprecipitates (Fig. 3).

With respect to the physiological occurrence and significance of the oxidative modification of GS, we detected the in vivo-modified  $\alpha$  and  $\beta$  polypeptides in prooxidative conditions in which the GS antigen and activity disappeared. That the in vivo modification reaction could be enzymatically mediated is suggested by the temperature sensitivity of GS oxidation in a cell extract in the presence of NADPH and O<sub>2</sub>, in contrast to the ascorbate-FeCl<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-FeSO<sub>4</sub> inactivation reactions. It is also significant that the GS was to some extent protected from inactivation by the substrates of its physiological synthetase activity, particularly by ATP. Inactivation of an ATP-consuming enzyme during carbon starvation makes sense. That under this condition the enzyme was not inactivated when the cells were incubated in the absence of air indicates the oxidative nature of the inactivating reaction.

Finally, it is also significant that a proteolytic activity which preferentially degraded the modified GS in the cell extracts was detected. This protease activity was insensitive to PMSF, stimulated by EDTA, and inhibited by MnCl<sub>2</sub>. A protease from *E. coli* has been purified which specifically recognizes the oxidized GS at neutral pH, is not inhibited by serine protease inhibitors, and does not require ATP for its activity (J. E. Roseman and R. L. Levine, Fed. Proc. 44:1092, 1985). Also, other partially purified protease activities from mouse liver preferentially degrade the oxidatively modified form of the *E. coli* GS (18).

Oxidative inactivation (6, 21) and activation (21) of other enzymes have been reported. Whether the modified enzymes are related to specific physiological states and whether they are always more susceptible to endogenous

proteolytic activity will certainly help us to determine the physiological significance of the oxidative modification of enzymes. We are currently investigating some other enzymes which are either activated or inactivated during the course of aerial mycelium formation in *N. crassa*. Our general view is that oxidative modification of enzymes could be a very general mechanism for regulation of cellular metabolism through simultaneous activation and inactivation of different pathways together with a high turnover of the modified enzymes.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Miguel Angel Campomanes for giving us the purified GS and goat anti-GS antibodies, Josefina Guzmán for purified GS containing almost exclusively  $\beta$  polypeptide, Hermila Herrera for her excellent technical assistance, and Lorenzo Segovia for his help in editing the paper.

This research was supported in part by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, grant PCCBBNA 022644 (to W.H.) and by the Fondo de Estudios e Investigaciones Ricardo J. Zavada. J.A. was supported by a Universidad Nacional Autónoma de México-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología fellowship.

#### LITERATURE CITED

- Cárdenas, M. E., and W. Hamberg. 1984. Glutamine requirement for aerial mycelium growth in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 136:1733-1732.
- Cárdenas, M. E., and W. Hamberg. 1984. Glutamine metabolism during aerial mycelium growth of *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 136:1733-1741.
- Dávila, G., S. Brown, Y. Mora, R. Palacios, and J. Mora. 1983. Genetic and biochemical characterization of glutamine synthetase from *Neurospora crassa* glutamine auxotrophs and their revertants. *J. Bacteriol.* 164:993-1000.
- Dávila, G., M. Lara, J. Guzmán, and J. Mora. 1980. Relation between structure and function of *Neurospora crassa* glutamine synthetase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93:134-140.
- Ferguson, A. R., and A. P. Sims. 1971. Inactivation *in vivo* of glutamine synthetase and NAD-specific glutamate dehydrogenase: its role in the regulation of glutamine synthesis in yeast. *J. Gen. Microbiol.* 69:423-427.
- Fucci, L., C. N. Oliver, M. J. Conn, and E. R. Stadtman. 1983. Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: possible implication in protein turnover and ageing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1521-1525.
- Laurell, C. B. 1966. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.* 15:45-52.
- Levine, R. L. 1983. Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue. *J. Biol. Chem.* 258:11823-11827.
- Levine, R. L. 1983. Oxidative modification of glutamine synthetase. II. Characterization of the ascorbate model system. *J. Biol. Chem.* 258:11828-11833.
- Levine, R. L., C. N. Oliver, R. M. Fulks, and E. R. Stadtman. 1981. Turnover of bacterial glutamine synthetase: oxidative inactivation precedes proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2120-2124.
- Limón-Lason, J., M. Lara, B. Revuelta, and J. Mora. 1977. Regulation of glutamine synthetase in fed-batch cultures of *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78:1234-1240.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 219:265-275.
- Mora, Y., O. Chávez, and J. Mora. 1980. Regulation of *Neurospora crassa* glutamine synthetase by the carbon and nitrogen source. *J. Gen. Microbiol.* 118:455-463.
- Muntes, K. D., B. S. Rana, and E. Goldstein. 1984. Genetically determined conical longevity is positively correlated with superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, cytochrome C peroxidase, and ascorbate free radical reductase activities in *Neurospora crassa*. *Mech. Ageing Dev.* 28:83-100.
- Nakamura, K., and E. R. Stadtman. 1984. Oxidative inactivation of glutamine synthetase subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:2011-2015.
- O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021.
- Palacios, R., M. Campomanes, and C. Quinto. 1977. *Neurospora crassa* glutamine synthetase. Translation of specific messenger ribonucleic acid in a cell free system derived from rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.* 252:3028-3034.
- Rivett, A. J. 1985. Preferential degradation of the oxidatively modified form of glutamine synthetase by intracellular mammalian proteases. *J. Biol. Chem.* 260:300-305.
- Sánchez, F., E. Calva, M. Campomanes, L. Blasco, J. Guzmán, J. L. Schorio, and R. Palacios. 1980. Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 255:2231-2234.
- Sánchez, F., M. Campomanes, C. Quinto, W. Hamberg, J. Mora, and R. Palacios. 1978. Nitrogen source regulates glutamine synthetase mRNA levels in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 136:880-885.
- Udvardy, J., G. Borbély, A. Juhász, and G. L. Furber. 1984. Fe<sup>2+</sup>-chelates mediate the oxidative modulation of cyanobacterial and chloroplast enzymes. *FEBS Lett.* 172:11-16.
- Veigel, H. J. 1964. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *Am. Nat.* 98:435-446.
- Wray, W., T. Boulikas, V. P. Wray, and B. Muesel. 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 118:197-203.

III.- Rapid and easy method for Neurospora crassa GDH-NADPH purification.

Enviado para su publicación al Fungal Genetics Newsletter.

Jesús Aguirre and Wilhelm Hansberg.

RESUMEN:

La actividad de GDH-NADPH se pierde en un extracto de N. crassa tratado con ascorbato + Fe + EDTA + O<sub>2</sub>. Este resultado nos alentó a caracterizar el proceso de inactivación usando una GDH-NADPH pura. Para purificar la enzima utilizamos una modificación del método de Blumenthal y Smith (1974).

En este trabajo se reporta un análisis comparativo de los métodos descritos hasta la fecha para purificar GDH-NADPH de N. crassa. Se describe el método que usamos y se hacen notar las ventajas que tiene sobre los ya publicados. Todos los métodos de purificación descritos, incluyendo al nuestro, tiene en común un calentamiento a 50°C y precipitaciones con sulfato de amonio. Después los métodos usan varios procedimientos que son laboriosos o inconvenientes por que con ellos se pierde una buena parte de la actividad. Nuestro método utiliza una columna de Sepharosa-azul-reactivo que sustituye a dos pasos de purificación en los métodos publicados. Hay un método que solo utiliza una columna de Sepharosa-rojo-reactivo después de la precipitación con sulfato de amonio. Sin embargo, sólo puede usarse para purificaciones en pequeña escala ya que esta columna debe eluirse con NADPH, lo cual resulta caro. En comparación, nuestra columna se eluye con un gradiente lineal de NaCl.

Tomando en cuenta la pureza de la enzima obtenida, el alto rendimiento y la relativa simplicidad de nuestro método, este resulta una buena opción para purificar a la GDH-NADPH de N. crassa.

Aguirre, J., and Hansberg, W.  
Rapid and easy method for  
*Neurospora crassa* GDH(NADPH)  
purification.

In order to study an oxidative  
modification of *Neurospora crassa*  
GDH(NADPH) during aerial hyphae  
growth, we were compelled to purify  
this enzyme. The different

purification procedures which have been used are, directly or indirectly, based on the method described by Barrat and Strickland (1963 Arch. Biochem. Biophys. 102: 66-76). All of them include the following three purification steps with minor modifications:

- 1) A crude cell extract is heated (50-53°C) for 10-60 min and the precipitated protein discarded by centrifugation.
- 2) The supernatant is brought to a 55% saturation of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , usually in two cuts (30% and 55%), centrifuged<sup>g</sup> and the precipitated resuspended and dialyzed.
- 3) The diffusate is loaded to a DEAE-Sephadex A-50 column and, after washing, the enzyme is eluted with a salt gradient.

At this point the specific activity of the GDH(NADPH) is 23-31 U/mg of protein and the yield between 46% and 78% (Table 1). Usually two additional purification steps are needed in order to have a single band on a polyacrylamide-gel electrophoresis. The first consists in using a Sephadex G-100 or G-200 column which usually doubles the specific enzyme activity and causes only about 10% loss. The second consists of one of the following procedures:

- a) affinity chromatography with N-carboxy-methyl-L-glutamate bound to Sephadex, which has to be synthesized, and causes partial inactivation of the enzyme (Blumenthal and Smith 1973 J. Biol. Chem. 248: 6002-6008);
- b) a second DEAE-Sephadex A-50 column plus  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitation at 45% saturation (Ashby et al. 1974 Biochem.

J. 143: 317-329) which gives 1.6 times increase in specific activity but 48% yield loss; c) electrofocusing with some inactivation of the enzyme, a big loss in total activity, and the inconvenience that only few milligrams of protein can be processed (Hernández et al., 1983 J. Bacteriol. 154: 524-528).

Triazine dyes immobilized to Sepharose have been used with good results to purify various dehydrogenases. In the case of *Neurospora crassa* GDH(NADPH), after the usual first three steps of the purification procedure, the cell extract, was applied to a column of Procion Red HE-3B immobilized to Sepharose CL-4B. The enzyme was eluted from the column with NADPH. In this way a high specific activity and good yield were obtained (Watson et al. Biochem J. 173: 591-596) (Table 1). This method is probably the best to purify a small amount of enzyme (<200 U). For higher amounts the NADPH elution from the affinity column turns out to be too expensive. Instead of binding Procion Red to Sepharose, we tried the commercially available Reactive Blue 2-Sepharose (Sigma) and the DEAE-Sepharose purification step was kept. A comparison of the different purification procedures is shown in Table 1.

A detailed description of the present purification method is as follows: *Neurospora crassa* mycelium was grown from  $1 \times 10^6$  conidia per ml of Vogel's minimal medium supplemented with 1.5% sucrose in Erlenmeyer flasks, agitated 13-14h in a gyratory shaker at 230 rpm and 30°C. The mycelium, harvested by filtration and dehydrated with an excess volume of acetone, was ground on a mortar with dry ice until a fine powder was obtained. The ground mycelium in 220 ml of 0.1 M phosphate buffer

pH8 was homogenized at 4°C, two times 2 min each, with a Polytron homogenizer at full power. After centrifugation at 15 000 X g, 15 min, the cell extract supernatant was heated at 50°C for 1h, kept on ice for 30 min and centrifuged in the same way. Solid  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  was added to the supernatant to 30% saturation. Precipitated protein was removed by centrifugation and the supernatant was made 55% saturated with respect to  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . The precipitate was collected by centrifugation, resuspended in 16 ml of 0.01 M Tris-HCl, pH8, 50 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1 mM L-glutamate (Buffer A) and dialyzed overnight against 2 times 11 of the same buffer. Then the extract was loaded on to a (2.5 X 33 cm) column of DEAE-Sephadex A-50, equilibrated with Buffer A. The enzyme was eluted from the column at 22 ml/h with a linear gradient obtained with 400 ml of Buffer A and 400 ml of Buffer A adjusted to 300mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . The fractions with high GDH(NADPH) activity were pooled and precipitated by adding  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  to 55% saturation. The precipitate was dissolved in 2 ml of 50 mM Tris-HCl, pH8, 1 mM L-glutamate (Buffer B) and dialyzed against 2 times 11 of the same buffer. The diffusate was applied at 4.1 ml/h to a column (0.9 X 25cm) of Reactive Blue-Sepharose (Sigma), equilibrated with Buffer B. After extensive washing with this buffer, the enzyme was eluted at 8.3 ml/h with a linear NaCl gradient obtained with 50 ml of Buffer B and 50 ml of the same buffer containing 1M NaCl. The fractions with highest enzyme activity were pooled and the enzyme precipitated with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  at 55% saturation. The precipitate was resuspended in 2 ml of Buffer B, solid  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  was added to 55% saturation, and stored in aliquots at -20°C. A summary of the purification is given in Table 2.

After polyacrylamide-gel electrophoresis (Laemmli 1970 Nature 227: 680-685), the purified enzyme showed one heavy protein band in



overloaded gels and one or probably more minor bands, estimated at less than 1% of the major band (Fig. 1) The most noticeable of the minor bands crossreacted with antibodies directed against the main band and its intensity increased after repeated freezing and thawing. Thus, this minor band is probably a degradation product of the enzyme. The purification procedure described here can be done in less than 4 days work in comparison to the 5 to 6 days work of the usual procedures. It gives a high specific activity similar to other methods, and a relatively higher yield.

Acknowledgment. We thank A. Alagón and J. Padilla for technical advice. This work was supported by CONACyT, grant ICXCNA-050809.

**Table 1. Specific activities (U/mg of protein) and yield(%) obtained with different purification procedures**

	Blumenthal & Smith		Ashby <u>et al.</u>		Hernández <u>et al.</u>		Matson <u>et al.</u>		This report	
	U/mg	%	U/mg	%	U/mg*	%	U/mg	%	U/mg	%
Heating (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> DEAE-Sephrose	31.1	78	23.2	66	26.4	-	14.9	53	30.7	68
Sephadex G200 final step	52.2	43	68.6	23	61.0	25				
Triazine-Sepha- rose							66.9	43	64.2	38

\*Since the mycelium was grown and harvested in the same way, these specific activities were calculated assuming our initial specific activity.

Table 2. Glutamate Dehydrogenase (NADPH) Purification

	Total Units	Protein, total mg	Units <sup>a</sup> / mg prot.	Yield %	Purification.
Crude extract supernatant	2,484	3,340	0.73	100	1
Supernatant after heating	1,719	713	2.41	69.2	3.2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitation after dialysis	2,173	488	4.54	87.5	6.0
DEAE-Sephadex effluent	1,680	54	30.69	67.6	41.8
Reactive Blue-Sephadose + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitates	942	14.6	64.18	37.9	87.5

\* Unit:  $\mu$ moles of NADPH oxidized/min at 25°C.

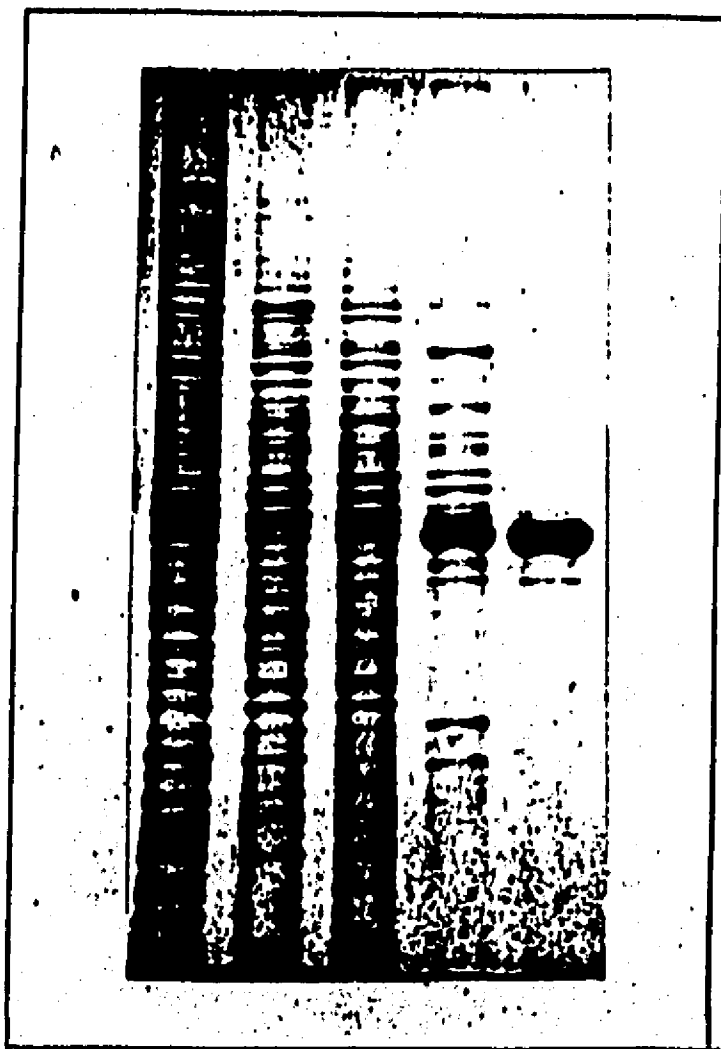


Fig.1. Purification of GDH(NADPH)  
1, Crude extract; 2, after heating;  
3,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitate; 4,  
DEAE-Sepharose eluate; 5, Reactive  
Blue-Sepharose eluate.

IV.- Oxidación de GDH-NADPH de Neurospora crassa por radicales de oxígeno.  
Jesús Aguirre y Wilhelm Hansberg.

INTRODUCCION:

Cuando un cultivo líquido de Neurospora crassa se ve limitado de la fuente de de carbono, la enzima Glutamina Sintetasa (GS) se pierde (Mora Y. et al., 1980). En nuestro laboratorio hemos encontrado que esta pérdida en la actividad enzimática sólo se observa si el cultivo se airea, mientras que dicha actividad se conserva si se impide la aireación del cultivo. En la condición aireada, los polipéptidos  $\alpha$  y  $\beta$  de la GS (Sánchez et al., 1980) se modifican dando lugar a dos polipéptidos más ácidos ( $\alpha'$  y  $\beta'$ ). Esta modificación, también se observa cuando la enzima pura se oxida con radicales de oxígeno producidos con una mezcla de ascorbato + FeCl<sub>3</sub> o con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + FeSO<sub>4</sub> o cuando un extracto celular se incuba con NADH o NADPH. La GS modificada se degrada completamente en extractos celulares mientras que la enzima no oxidada se preserva (Aguirre y Hansberg., 1986).

En Escherichia coli se ha demostrado que la inactivación de la GS causada por estos y otros sistemas oxidantes (Levine, R. et al., 1981; Rivett et al., 1985) se debe a la modificación de un residuo de histidina en cada subunidad (Levine R., 1984). También se conoce que varias proteínas de distintas fuentes, se inactivan por éstos y otros sistemas productores de radicales de oxígeno, (Taborsky, G., 1973; Hodgson y Fridovich, 1975; Samuni, A. et al., 1981; Fucci et al., 1983; Davies, K., 1987).

Dados éstos antecedentes, y el hecho de que en N. crassa la enzima Glutamato Deshidrogenasa dependiente de NADPH (GDH-NADPH) se comporta de una manera semejante a la GS en cuanto a la pérdida de actividad en un cultivo líquido sin fuente de carbono (este reporte) y durante el crecimiento aéreo, cuando el micelio de N. crassa se expone directamente al aire (Cárdenas y Hansberg., 1984), decidimos analizar la posible modificación oxidativa de la GDH-NADPH por radicales de oxígeno.

## RESULTADOS:

La actividad de GS y GDH-NADPH en cultivos sin fuente de carbono en condiciones de aireación y no aireación.

Se ha reportado que las actividades de GS y GDH-NADPH de N. crassa dependenden de la disponibilidad de una fuente de carbono (Mora, Y. et al., 1980; Kapoor y Grover, 1970). En la figura 1 se puede apreciar que la actividad de ambas enzimas disminuye considerablemente en un cultivo en ausencia de fuente de carbono y bien aireado, pero que se conserva si se impide la aireación del cultivo. La pérdida de actividad observada en el cultivo aireado no puede deberse a la dilución de las enzimas, ya que en estas condiciones el hongo no crece. Este resultado sugiere que la degradación de ambas enzimas es un proceso que requiere O<sub>2</sub>.

### Inactivación de la GDH-NADPH en extractos celulares:

La GS de N. crassa se inactiva en extractos celulares por la adición de ascorbato + Fe<sup>III</sup> ó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Fe<sup>II</sup> (Aguirre y Hansberg., 1986). Cuando se añadieron estas mezclas oxidantes a un extracto, prácticamente no se modificó la actividad de la enzima GDH-NADPH, sin embargo cuando se incubó en presencia de ascorbato + Fe<sup>III</sup> + EDTA, aproximadamente el 50 % de la actividad de dicha enzima se perdió al cabo de 3 h. Esta inactivación fué dependiente de los tres compuestos usados, y del O<sub>2</sub>, ya que en una atmósfera de O<sub>2</sub> la inactivación se estimula, mientras que en una atmósfera de N<sub>2</sub> dicha inactivación es apreciablemente menor. La temperatura a la que se llevó a cabo la reacción también afectó la inactivación puesto que esta prácticamente no ocurre a 4°C y es mucho más rápida a 50°C que a 30°C. El Fe<sup>II</sup> es tan efectivo como el Fe<sup>III</sup> y el EDTA no pudo ser sustituido por otros agentes quelantes como la 1,10-fenantrolina o los ácidos dicarboxílicos (tabla 1). El ascorbato, fierro, y el EDTA tienen que estar presentes durante todo el periodo de incubación ya que si después de una incubación breve se dializa el extracto por filtración a través de Sephadex G-50, ya no se observa una mayor inactivación.

La GDH-NADPH de N. crassa adopta diferentes conformaciones dependiendo del pH del medio. En ausencia de sustratos, se encuentra en una forma activa a pH mayores que 7.8 y a pH menores que 7, se encuentra inactiva. El pK para esta transición es cercano a pH 7.2 (Ashby et al., 1974). En la figura 2, se puede observar que la enzima resultó más sensible a la inactivación por ascorbato + FeII + EDTA a pH de 7 o menores, y es menos sensible a la inactivación a pH 7.5 y 8.

El estado conformacional de la GDH-NADPH también es dependiente de la presencia de sus sustratos en el medio de incubación. Así la forma activa se encuentra en presencia de  $\alpha$ -cetoglutarato, NADP, o  $\alpha$ -cetoglutarato + NADPH o NADP (West, D.J. et al., 1967; Gore y Greenwood, 1975) o en la presencia de glutamato (West, D.J. et al., 1967; Gore e Iwatsubo, 1975). El efecto de los sustratos y productos de la enzima en la reacción de oxidación por ascorbato + Fe + EDTA se muestra en la figura 3. Se puede observar que a pH 7, el NADPH, solo o con amonio, o con amonio y  $\alpha$ -cetoglutarato redujo la inactivación por ascorbato + Fe + EDTA. Cuando el NADPH se usó junto con el  $\alpha$ -cetoglutarato no tuvo efecto. El amonio,  $\alpha$ -cetoglutarato o glutamato no tuvieron ningún efecto, mientras que el NADP solo mostró la mayor protección detectada.

#### Inactivación de la GDH-NADPH purificada.

Con el objeto de estudiar con más detalle la inactivación de la GDH-NADPH por radicales de oxígeno, se purificó la enzima hasta obtener una sola banda en geles de poliacrilamida con SDS, sobrecargados y teñidos con azul de Coomassie (Aguirre y Hansberg., enviado a publicación).

Esta preparación de enzima pura, así como una preparación comercial de GDH de hígado de bovino, se sometieron a la acción de la mezcla ascorbato + Fe + EDTA. En la tabla 2 se puede observar que en estas condiciones la enzima pura de N. crassa se inactiva de una manera semejante a la detectada en extractos celulares. Mas del 60 % de la actividad se perdió después de 2 h de incubación y ninguno de los componentes de la mezcla solos o en combinaciones de dos mostraron inactivación comparable a la observada con la mezcla completa. En el caso de la GDH bovina, ascorbato + Fe bastan para inactivarla 45 % en 2 h y la adición de EDTA a esta mezcla reduce la inactivación en un 15 %. De hecho, el EDTA por separado activa a esta enzima un 55 % a 30° C (tabla 2).

#### Caracterización molecular de la GDH-NADPH oxidada.

La GDH-NADPH pura se incubó con ascorbato + Fe + EDTA por distintos tiempos y se analizó en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Los resultados se muestran en la figura 4, donde puede observarse que la intensidad de la banda principal, correspondiente al monómero de GDH-NADPH, disminuye en relación directa al tiempo de incubación con la mezcla oxidante y después de 6 h prácticamente toda la enzima ha desaparecido (carriles 2, 4 y 6). En correspondencia con la pérdida del polipéptido principal, se observa la aparición de polipéptidos de menor peso molecular.

La GDH bovina mostró en SDS-PAGE el mismo patrón que la GDH-NADPH de N. crassa cuando se incubó con la misma mezcla oxidante (carriles 9, 10 y 11).

Durante la reacción de oxidación de GDH-NADPH, se observó que parte de la enzima se precipitaba. Cuando este precipitado se aisló por centrifugación y se analizó por SDS-PAGE, se pudo observar que la enzima precipitada aumentó con el tiempo de oxidación, y que una buena parte de esta conservó el peso molecular del monómero nativo (figura 4, carriles 3, 5 y 7).

Con el objeto de analizar las posibles modificaciones por oxidación del monómero de GDH-NADPH, la enzima pura se incubó con ascorbato + Fe + EDTA por 2 h a 30°C, se dializó por filtración en Sephadex G-50 y se analizó en un gel de dos dimensiones (2D-PAGE). Como puede observarse en la figura 5A, la GDH-NADPH de N. crassa presenta heterogeneidad de carga ya que se ven al menos cuatro polipéptidos con distintos puntos isoeléctricos y el mismo peso molecular. Tomando como referencia al polipéptido mayoritario, se puede observar que en la enzima oxidada (figura 5B) este disminuye mientras que el polipéptido ligeramente más básico que el mayoritario y los dos ligeramente más ácidos se incrementan. También se observaron polipéptidos de menor peso molecular que el monómero en este mismo gel, pero sólo después de tñirlo con plata (no se muestra).



### Oxidación por etapas de la GDH-NADPH purificada.

La oxidación sitio específica de las proteínas se ha explicado en términos de la unión del Fe a algún residuo de la proteína, histidinas para el caso de la Superóxido dismutasa de eritrocitos de bovino (Hodgson y Fridovich, 1975) y de la GS de *E. coli* (Farber y Levine, 1986), y la producción de oxígeno activado in situ por reacciones del tipo Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1984). Para tratar de comprender el mecanismo de inactivación de la GDH-NADPH de *N. crassa* en términos de su requerimiento de EDTA y de su dependencia por la temperatura, el pH y la presencia de algunos sustratos, se decidió llevar a cabo una oxidación por etapas. Esto se hizo incubando a la enzima primero con parte de la mezcla oxidante, para después dializarla e incubarla con la parte restante de la mezcla oxidante. En la tabla 3 se puede apreciar que la mezcla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + FeII + EDTA inactivó a la GDH-NADPH casi tanto como ascorbato + FeIII + EDTA, mientras que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per se solo inactivó ligeramente. Cuando se incubó la enzima con EDTA + Fe y después de dializarla se le añadió el ascorbato, la inactivación fue tan potente como cuando esta presente la mezcla completa, lo cual indica que EDTA-Fe se une a la enzima. Si EDTA-Fe se incubó con la enzima a 4° C o a pH 8, la inactivación es 40 % menor que a 30° C, pH 7, mientras que la presencia de los sustratos cetoglutarato + amonio o el NADPH prácticamente impiden la oxidación. La mayoría de estos resultados son congruentes con los que se obtuvieron en extractos celulares.

Como puede verse en la tabla 3, la incubación con ascorbato a pH 7 seguida de diálisis y adición de EDTA-Fe activa ligeramente, mientras que el mismo experimento a pH 8 muestra ligera inactivación. Esto sugiere que también ascorbato puede unirse a la enzima a pH 8.

Un resultado importante en la tabla 3, es que el Ferricitrato produjo activación de la enzima, lo cual sería congruente con el hecho de que citrato se une a la enzima como factor alostérico (West, D.J. et al., 1967), pero la adición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> después de dializar la enzima produce una notable inactivación.

## DISCUSION:

La inactivación de la GDH-NADPH de N. crassa por ascorbato + FeIII + EDTA reportada en este trabajo, tiene en común con la inactivación de GS por ascorbato + FeIII o por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + FeII el estar mediadas por formas activadas de oxígeno sin embargo, la inactivación de la GDH-NADPH requiere de la presencia de EDTA mientras que este compuesto inhibe casi por completo la inactivación de GS en E. coli y en N. crassa. Este requerimiento pudiera explicarse por el hecho de que el EDTA incrementa la solubilidad del Fe a concentraciones de FeIII mayores de 5  $\mu$ M y con ello incrementa la producción del radical hidroxilo cuando se encuentra presente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o el radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Flitter et al., 1983). Esta explicación no es muy satisfactoria porque, si ese fuera el caso, el EDTA solo estimularía un proceso que debería ser observable aún en su ausencia. Además, la mayor producción de radicales de oxígeno por ascorbato + Fe + EDTA no sería un proceso dependiente de temperatura en los rangos que hemos trabajado (4-50°C). La inactivación de la GS tiene un t<sub>1/2</sub> de 15 min a 4°C y este no se reduce a 30°C (Aguirre y Hansberg., 1986). En nuestra interpretación el EDTA se requiere para la inactivación de la GDH-NADPH porque posee dos características importantes:

a) actúa como factor alostérico de la GDH-NADPH, capaz de activarla a pH a los cuales la enzima se encuentra inactiva (West D. J. et al., 1967).

b) une FeII y FeIII con una afinidad muy alta.

Por lo cual, el EDTA cumpliría indirectamente funciones análogas al péptido Met-His-Cys-His-Met de la GS de E. coli que probablemente une al Fe, el cual al ser oxidado in situ reacciona con el imidazol de la primera histidina, introduciendo un grupo carbonilo e inactivando a la enzima (Farber y Levine, 1986).

Sin duda los experimentos de oxidación por etapas son una buena evidencia de que el EDTA-Fe se une a la enzima y de que la dependencia de la inactivación por factores que afectan la conformación de la enzima esta relacionada con dicha unión del EDTA-Fe. Los experimentos de oxidación por etapas mostraron que a pH 8, a 4 °C, en presencia de NADPH o de  $\alpha$ -cetoglutarato + amonio; se une menos EDTA-Fe a la enzima que a pH 7, 30° C o en ausencia de sustratos. No es posible correlacionar la conformación activa de la enzima

con una menor o mayor unión del EDTA-Fe ya que, por ejemplo, el NADPH mantiene a la enzima en estado inactivo (Gore e Iwatsubo, 1975), mientras que  $\alpha$ -cetoglutarato + amonio la mantienen en el estado activo (Gore y Greenwood, 1975) y, no obstante, en ambos casos se une menos EDTA-Fe a la enzima (tabla 3).

Por otra parte, un buen quelante de fierro como la 1,10-fenantrolina no causa el mismo efecto que el EDTA posiblemente porque no se une a la enzima. En comparación, ferricitrato se une y estimula a la enzima (tabla 3) y en presencia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la inactiva significativamente (citrato es un factor alostérico de la GDH-NADPH capaz de activarla, West, D. J. et al., 1967).

Las enzimas Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa de bovino y la Ortinina Descarboxilasa de E. coli son inactivadas por ascorbato + Fe<sup>III</sup> sólo cuando el EDTA está presente. Sin embargo, se desconoce la causa de este requerimiento (Rivett et al., 1985). Si éstas enzimas unen EDTA-Fe, habría que concluir que cualquier enzima que una directa o indirectamente a un metal capaz de catalizar la producción de especies activadas de oxígeno (Fe, Cu, etc), es potencialmente susceptible a oxidación sitio específica. A este respecto, la unión de Fe al péptido oxidable de la GS de E. coli, podría ser corroborado usando el enfoque de oxidación por etapas que hemos usado aquí.

Resulta notable que en ausencia del EDTA la mezcla Ascorbato + Fe prácticamente no afecte la actividad de la GDH-NADPH. Esto habla de una enorme resistencia de la enzima a las especies activas de oxígeno que se forman por dicha mezcla. También es notable, porque al añadir el EDTA a la mezcla, la proteína se inactiva principalmente por fragmentación (Figura 4). Esto sugiere que, o bien la unión del EDTA-Fe a la enzima y su oxidación in situ produce una primera modificación que la vuelve ahora susceptible al ataque por radicales de oxígeno, o que la unión per se del EDTA-Fe sensibiliza a la enzima. Una forma para descartar esta última posibilidad sería unir a la enzima el EDTA unido a cualquier catión divalente incapaz de catalizar la producción de radicales de oxígeno (EDTA-Mn o EDTA-Mg etc.) y después incubar con las mezclas oxidantes, de tal forma que esta enzima "ocupada" fuera resistente a la inactivación.

Los resultados de la inactivación de la GDH bovina son semejantes a los obtenidos con la enzima de Neurospora, excepto en que para inactivar a la enzima bovina no se requiere de EDTA, a pesar de que este compuesto sí se le une, a juzgar por su capacidad para activarla. Aparentemente la enzima bovina es capaz de unir Fe directamente además de que también pudiera unir EDTA-Fe.

La fragmentación, precipitación y heterogeneidad de carga que se observó en la GDH-NADPH de N. crassa tratada con las mezclas oxidantes, son fenómenos que se han encontrado recientemente para varias proteínas de diversas fuentes expuestas a las especies de oxígeno activado hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), y en menor grado, al superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) (Wolff, S.P. et al., 1986; Davies, K., 1987). En este tipo de experimentos se ha encontrado que los aminoácidos Trp, Tyr, His y Cys son los más sensibles al ataque del radical hidroxilo (Davies, K. et al., 1987 II) y que este puede inducir la formación de dímeros, trímeros etc., pero en presencia de  $\text{O}_2$  prácticamente solo induce fragmentación (Wolff, S.P. et al., 1986; Davies, K. et al., 1987 III). La precipitación que también se observa en éstos casos es debida al incremento en hidrofobicidad de la superficie y a la formación de agregados unidos por interacciones hidrofóbicas. La mayoría de proteínas tratadas con oxígeno activado son degradadas rápidamente en extractos celulares de diversas fuentes (Davies, K. et al., 1987 IV). La heterogeneidad de carga detectada por Davies (1987, I) se observó en geles de electroenfoque, donde no es posible discriminar los fragmentos con distinto punto isoeléctrico (pI), de los monómeros no fragmentados pero con distinto pI.

En el caso de la GDH-NADPH esta bien claro que además de la fragmentación y precipitación, alguna(s) modificación(es) sólo alteran el pI de la enzima, lo cual confiere cierta especificidad a la oxidación que hemos estudiado aquí y situa este fenómeno aparte de los de oxidación generalizada (Wolff, S.P. et al., 1986; Davies, K. et al., 1987 II).

Los datos de inactivación de la GDH-NADPH en extractos celulares y con la enzima pura son muy semejantes, sin embargo, no se sabe por que la mezcla  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe} + \text{EDTA}$  produjo una inactivación casi total en la enzima pura y prácticamente no la afectó en extractos a pesar de que se tomó la precaución de inactivar la catalasa presente en los extractos usando azida de sodio.

La GDH-NADPH purificada sin tratar con la mezcla oxidante, así como la enzima inmunoprecipitada directamente también mostraron heterogeneidad de carga en electroenfoques desnaturalizantes y no desnaturalizantes (siguiente trabajo en esta tesis). Hasta ahora no podemos decir con certeza que clase de modificación es esta que se encuentra en condiciones naturales porque no hemos encontrado condiciones fisiológicas donde las proporciones de los polipéptidos modificados se incrementen. Sin embargo, el hecho de que la oxidación in vitro produzca un incremento de algunos de los polipéptidos que se encuentran en los inmunoprecipitados y en la enzima pura, junto con el hecho de que el ferricitrato + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dos compuestos que se pueden encontrar in vivo, puedan catalizar esta reacción, y sobre todo el requerimiento por O<sub>2</sub> que para degradar a la GDH-NADPH se observa en un cultivo sin fuente de carbono, hacen de la oxidación de esta enzima por radicales de oxígeno un fenómeno de potencial importancia fisiológica.

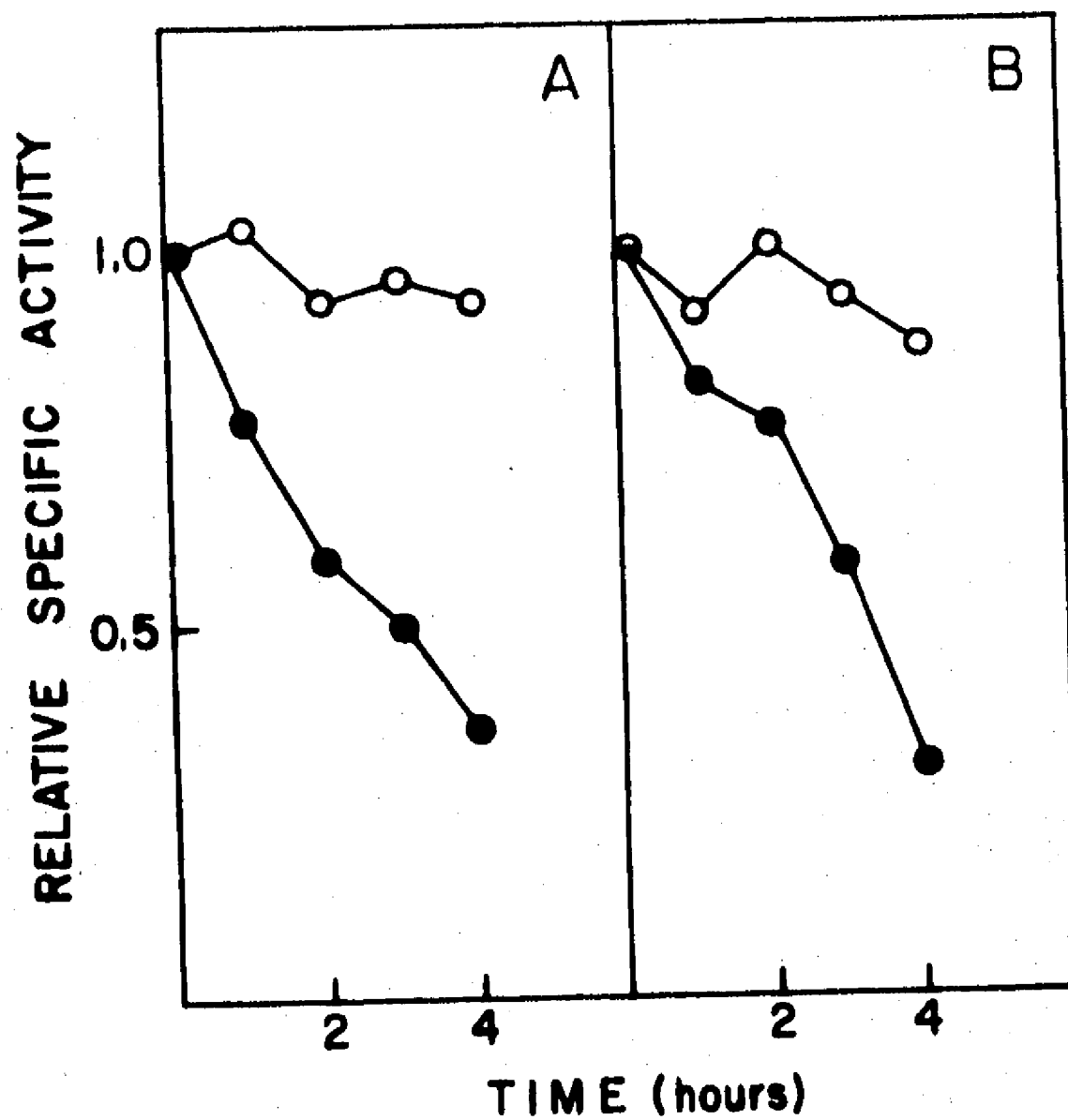


Figura 1. Actividades de GS y GDH-NADPH en cultivos sin fuente de carbono aireados y no aireados.

Un micelio de 12 h de crecimiento se cambió a un medio sin fuente de carbono y se incubó a 30°C con una relación aire/líquido alta (● — ●) o sin aireación, en un recipiente cerrado (○ — ○). A los tiempos indicados se tomaron muestras de éstos cultivos, se deshidrataron con acetona y se les determinó actividad de GS(A) y GDH-NADPH(B).

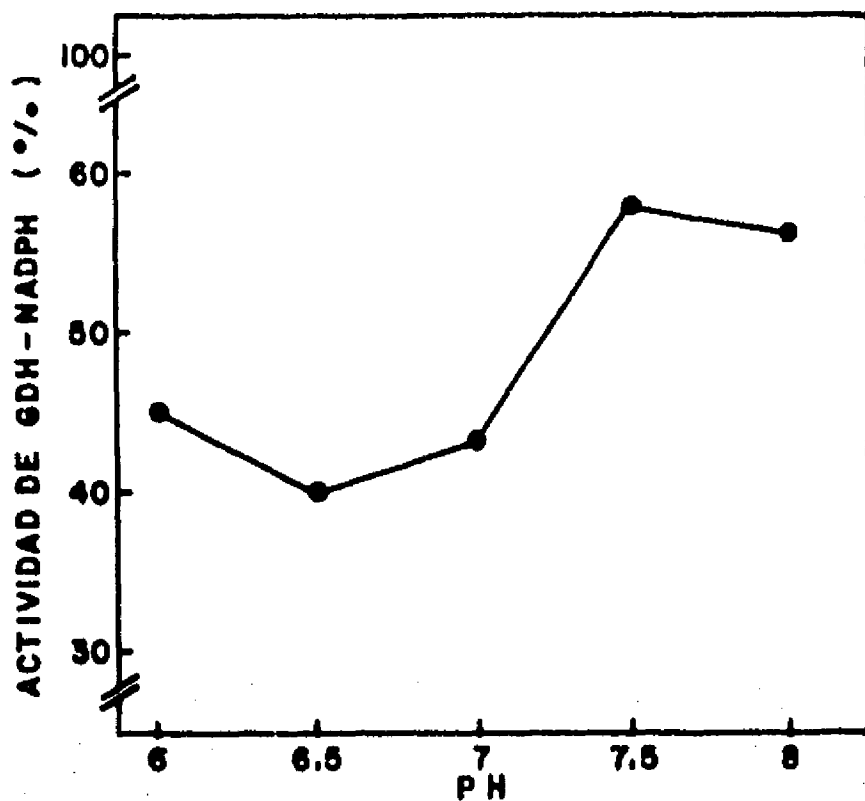


Figura 2. Inactivación de la GDH-NADPH por ascorbato + FeII + EDTA a distintos pH.

Los distintos extractos celulares se prepararon en fosfatos 0.1 M a los pH indicados, se calentaron a 50°C durante 45 min y se centrifugaron. Los sobrenadantes se incubaron con la mezcla oxidante a 30°C durante 3 h. Pasado éste tiempo, los extractos se colocaron a 4°C y se les determinó la actividad de GDH-NADPH. La actividad presente en los extractos a los distintos pH sin ninguna adición, se consideró como el 100% para cada caso.

Concentraciones: ascorbato, 10 mM; FeSO<sub>4</sub>, 0.6 mM; EDTA, 1 mM.

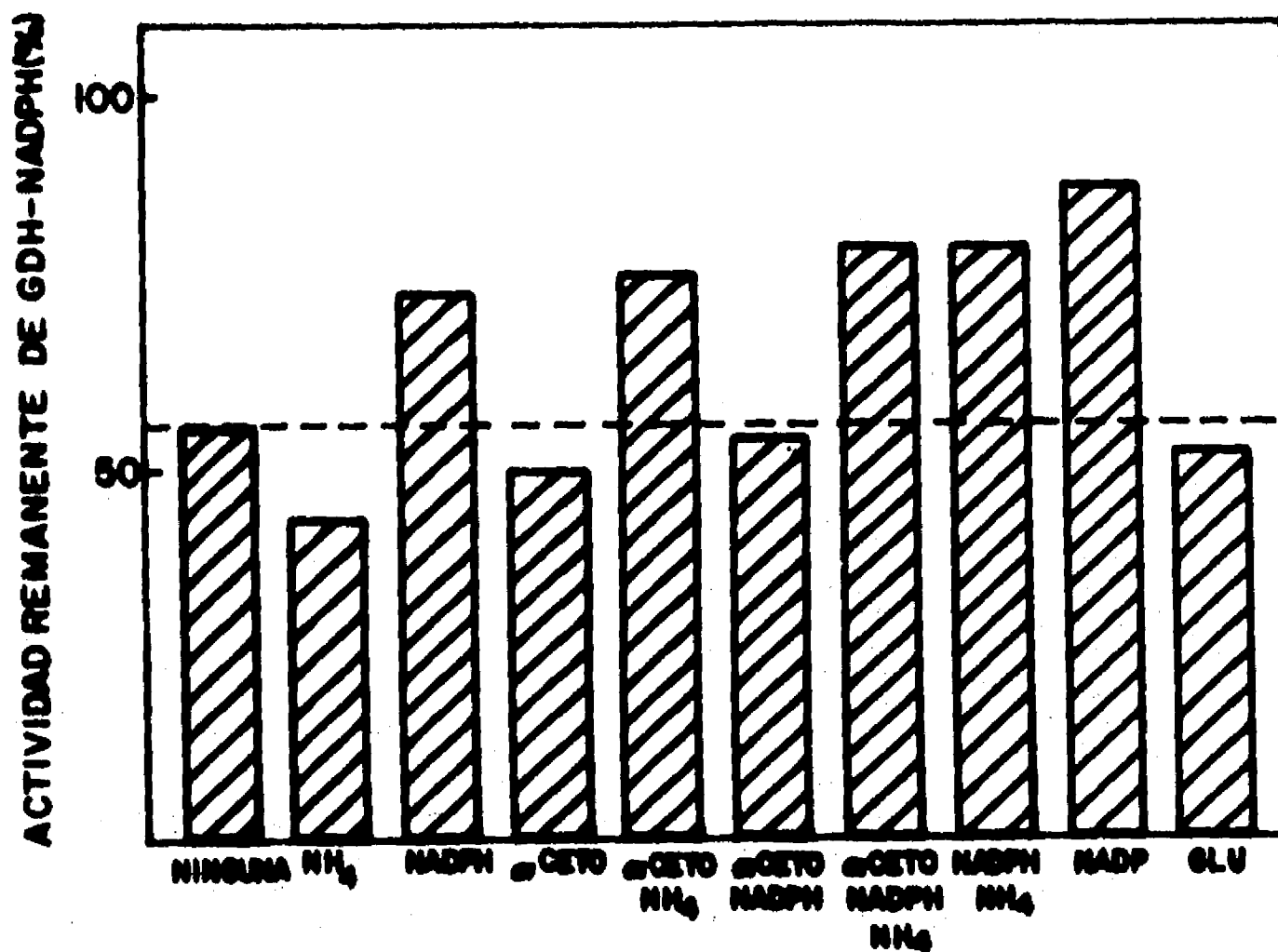


Figura 3. Efecto de los sustratos y productos sobre la inactivación de la GDH-NADPH por ascorbato + FeII + EDTA.

Un extracto celular en fosfatos 0.1 M, pH 7, se calentó a 50°C por 45 min y se centrifugó. El sobrenadante se incubó a 30°C durante 3 h en presencia de la mezcla oxidante y de los compuestos indicados. Una vez cumplido el tiempo, los distintos tratamientos se incubaron a 4°C y se les determinó actividad de GDH-NADPH.

Concentraciones: Mezcla oxidante, (como en la figura 2); NH<sub>4</sub>Cl, 3 mM; α-ceto-glutarato (α-ceto), 6 mM; NADPH y NADP, 1 mM; glutamato (Glu), 6 mM.



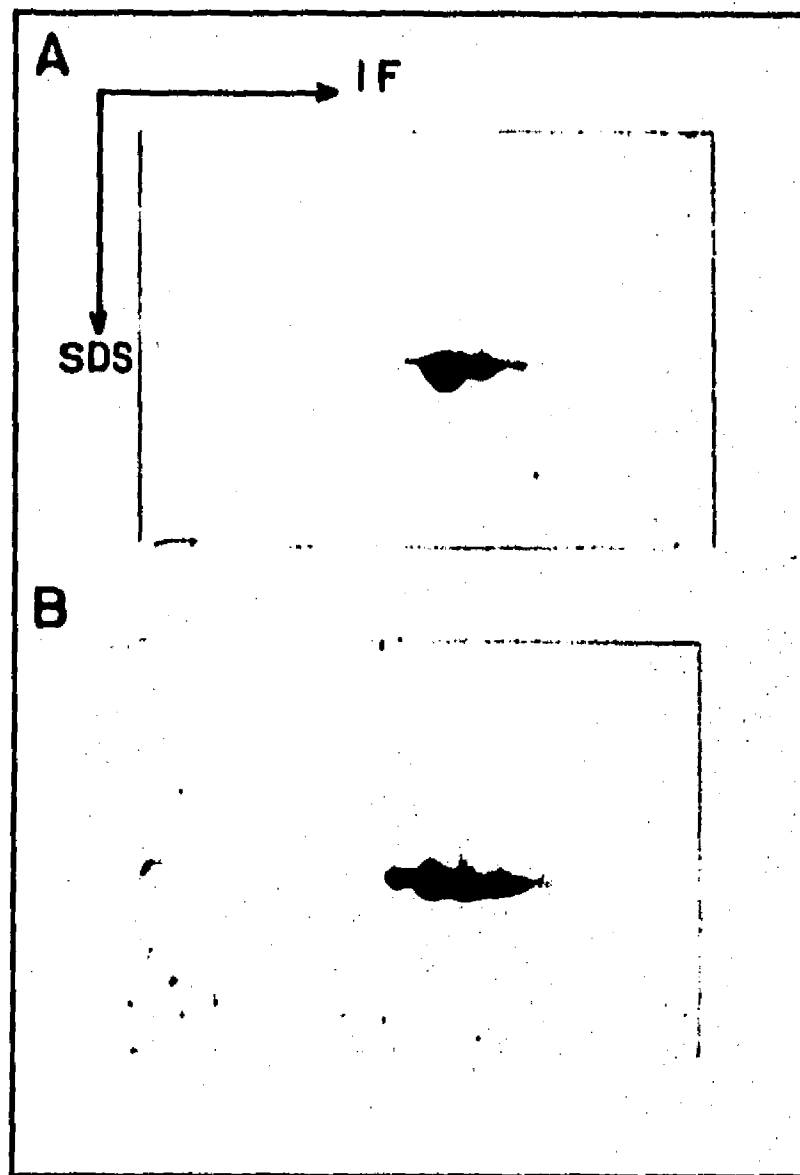


Figura 5. Heterogeneidad de carga relacionada con la oxidación de la GDH-NADPH.

Dos muestras con 50  $\mu$ g de GDH-NADPH se incubaron a 30°C, pH 7 por 2 h sin adiciones (A) o en presencia de ascorbato + Fe III + EDTA (B), se dializaron por filtración en Sephadex, se liofilizaron y se analizaron en geles de dos dimensiones teñidos con Coomassie. Mezcla oxidante: como en la figura 2.

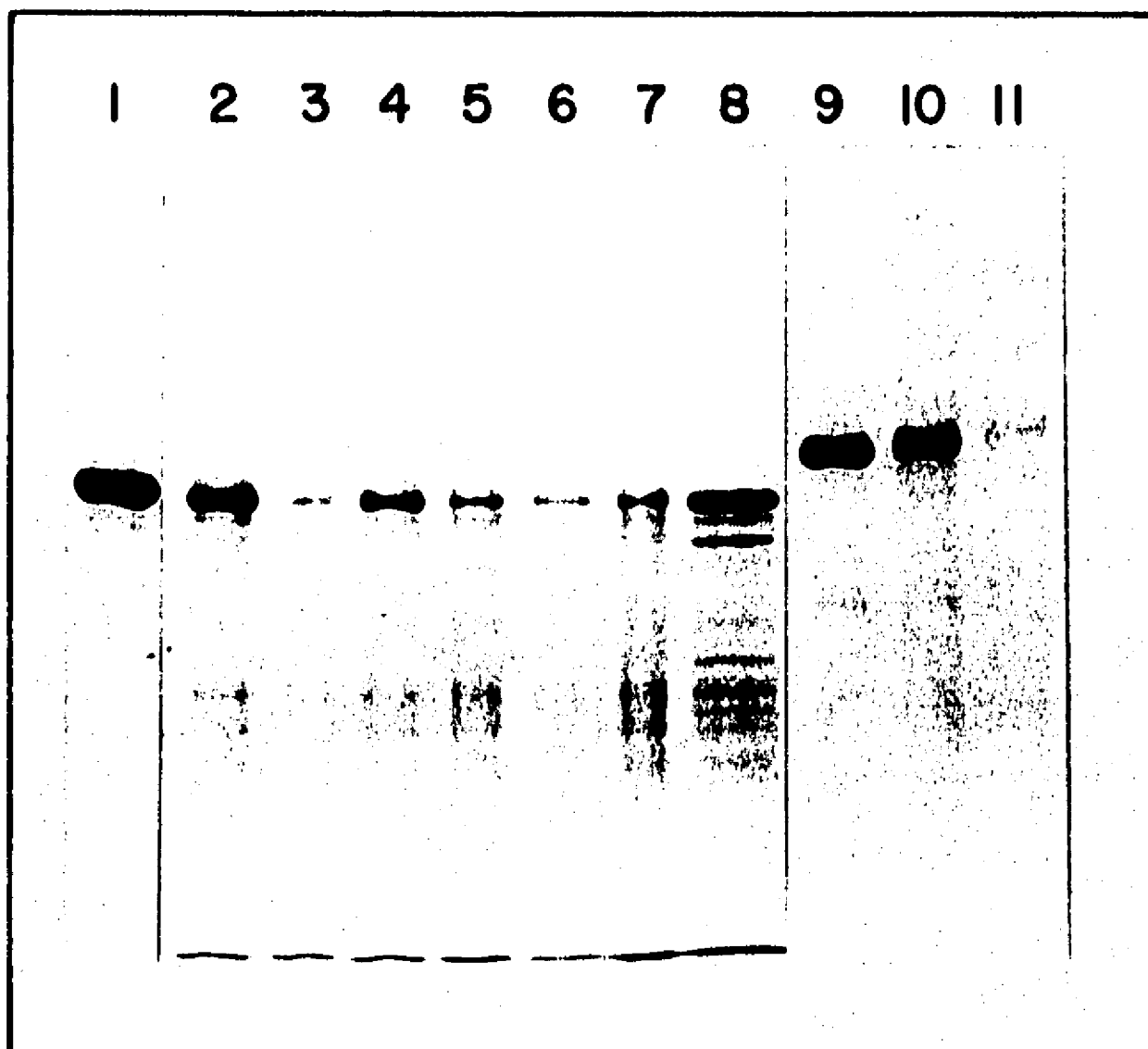


Figura 4. Fragmentación y precipitación de la GDH-NADPH durante su incubación con una mezcla oxidante y fragmentación de la GDH Bovina.

Varias muestras con 25  $\mu$ g de GDH-NADPH o de GDH Bovina se incubaron con ascorbato + Fe III + EDTA a 30°C, pH 7 durante distintos tiempos y después se centrifugaron. Los sobrenadantes se dializaron, se liofilizaron y al igual que los precipitados se resuspendieron para ser analizados por SDS-PAGE. El gel fué teñido con Coomasie.

Carriles 1-8, GDH-NADPH de N. crassa: 1, 6 h a 30°C sin adiciones; 2, 4 y 6, sobrenadantes incubados con la mezcla oxidante durante 2, 4 y 6 h; 3, 5 y 7, precipitados de los tratamientos anteriores (en el mismo orden); carril 8, enzima oxidada 2 h sin centrifugar y sin dializar. Carriles 9-11, GDH Bovina: 9, 6 h a 30°C sin adiciones; 10, oxidada 2 h y dializada; 11, oxidada 6 h y dializada.

TABLA 1. INACTIVACION OXIDATIVA DE LA GDH-NADPH EN EXTRACTOS CELULARES.

ADICION	ACTIVIDAD (%)
NINGUNA	100
ASC + Fe III	97
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Fe II	94
ASC + Fe III + EDTA	54
ASC + Fe II + EDTA	50
ASC + Fe III + EDTA (50°C, 1 h)	28
ASC + Fe III + EDTA (4°C)	83
ASC + Fe III + EDTA (O <sub>2</sub> )	36
ASC + Fe III + EDTA (N <sub>2</sub> )	82
ASC + Fe II + FENANTROLINA	88
ASC + Fe II + CITRATO	105
ASC + Fe III + OXALACETATO	107
ASC + Fe II + SUCCINATO	116
ASC + Fe II + α-CETOGLUTARATO	110

Un extracto celular en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 6, se calentó a 50°C durante 45 min y después se centrifugó. El sobrenadante se dividió en alicuotas de 40 µl, las cuales se incubaron en presencia de aire y de los distintos compuestos a 30°C durante 3 h, excepto donde se indica otra cosa.

Una vez cumplido el tiempo, se determinó la actividad de GDH-NADPH. Concentraciones finales: ascorbato (Asc), 20 mM; FeSO<sub>4</sub> y FeCl<sub>3</sub>, 0.6 mM; EDTA y 1,10-Fenantrolina, 1 mM; ácidos carboxílicos, 10 mM.

**TABLA 2. INACTIVACION OXIDATIVA DE LA GDH-NADPH DE N. crassa PURIFICADA Y DE LA GDH BOVINA.**

ADICION	ACTIVIDAD (%)	
	GDH-NADPH <u>N. crassa</u>	GDH Bovina
NINGUNA	100	100
Fe III	100	81
ASC	94	96
EDTA	105	155
ASC + Fe III	85	55
EDTA + Fe III	106	96
EDTA + ASC	112	155
EDTA + Fe III + ASC	38	70

Ambas enzimas se disolvieron en una solución de fosfatos 0.1 M, pH 7 y se incubaron 2 h a 30°C en presencia de los distintos compuestos.

Concentraciones finales: ascorbato (ASC), 10 mM; EDTA, 1 mM; FeCl<sub>3</sub>, 0.6 mM; GDH Bovina, 1.7 mg/ml, GDH-NADPH N. crassa, 0.3 mg/ml.

TABLA 3. OXIDACION POR ETAPAS DE LA GDH-NADPH PURIFICADA.

ADICION	ACTIVIDAD GDH-NADPH (%)
NINGUNA	100
EDTA + Fe II + ASC	2
EDTA + Fe II + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	17
Fe II → H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	83
FERRICITRATO	133
FERRICITRATO → H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	33
Fe III + EDTA → ASC	2
Fe III + EDTA → ASC (4°C)	43
Fe III + EDTA → ASC (pH 8)	44
Fe III + EDTA → ASC	90
+ α CETO + NH <sub>4</sub>	
Fe III + EDTA → ASC	102
+ NADPH	
ASC → Fe III + EDTA	114
ASC → Fe III + EDTA (pH 8)	76

La enzima GDH-NADPH, disuelta en fosfatos 50 mM, pH 7, se incubó en presencia de DTT 25 mM durante 45 min. Posteriormente se eliminó el DTT por filtración en Sephadex G-50 equilibrado con fosfatos 50 mM; pH 7 ó pH 8. El filtrado se incubó con los distintos compuestos como sigue: Primero a 30°C por 2 h en presencia de los compuestos indicados antes de la flecha. Cumplido el tiempo, se dializó por filtración en Sephadex, y se reincubó a 30°C por 1 h más en presencia de los compuestos indicados después de la flecha. Al final de los tratamientos se colocaron a 4°C y se les determinó la actividad de GDH-NADPH.

En el tratamiento donde se indican 4°C, esta temperatura corresponde a la primera incubación. La segunda incubación se llevó a cabo a 30°C. Concentraciones finales: ascorbato (ASC), 10 mM; EDTA, 1 mM; Fe II y Fe III, 0.6 mM; NADPH, 1 mM; α-cetoglutarato (αCETO), 3 mM; NH<sub>4</sub>Cl, 1.5 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.5 mM; Ferricitrato, 1 mM.

V.- Posible regulación de la GDH-NADPH de Neurospora crassa por intercambio tiol-disulfuro.  
Jesús Aguirre, Ma. del Rocío Rodríguez y Wilhelm Hansberg.

INTRODUCCION:

Durante el crecimiento, la asimilación de nitrógeno en N. crassa ocurre principalmente a través de la vía de la glutamato deshidrogenasa biosintética (GDH-NADPH)-Glutamina Sintetasa (GS) (Mora J. et al., 1988). Cuando la fuente de carbono se vuelve limitante, ambas enzimas son degradadas (Mora, Y. et al., 1980; Kapoor y Grover., 1970). Hemos encontrado que en ausencia de la fuente de carbono se pierde la actividad de ambas enzimas en un cultivo aireado, pero dicha actividad se conserva si se impide la aireación del cultivo (Aguirre y Hansberg., manuscrito anterior en esta tesis).

Durante el crecimiento aéreo de N. crassa la actividad de estas dos enzimas se pierde en el micelio expuesto directamente al aire (Cárdenas y Hansberg., 1984) en presencia o ausencia de nutrientes (tabla 1, resultados sección VI). Por otra parte, la GS de N. crassa se modifica en condiciones de limitación de carbono de una manera similar a la producida in vitro por un sistema oxidante productor de radicales de oxígeno (Aguirre y Hansberg., 1986). Estos antecedentes sugerían que la GDH-NADPH podría ser regulada también por oxidación. Sin embargo, los experimentos iniciales sobre oxidación de esta enzima in vitro por las mezclas ascorbato + FeIII o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + FeII no mostraron ningún efecto.

Dado que se ha reportado que varias enzimas son inactivadas por intercambio tiol-disulfuro con características que las hacen posibles in vivo en condiciones donde se exagera la producción de radicales de oxígeno (Brigelius, R., 1985), decidimos explorar la posible oxidación de GDH-NADPH por disulfuros.

En este reporte presentamos datos que indican que dicha enzima es inactivada reversiblemente por la formación de disulfuros mixtos con varios compuestos. Se reporta también que el agente reductor ditioneitol (DTT) activa a la enzima pura y en extractos. Por último, se discute el posible significado fisiológico de esta formación de disulfuros mixtos en condiciones de degradación de la GDH-NADPH.

V.- Posible regulación de la GDH-NADPH de Neurospora crassa por intercambio tiol-disulfuro.  
Jesús Aguirre, Ma. del Rocío Rodríguez y Wilhelm Hansberg.

INTRODUCCION:

Durante el crecimiento, la asimilación de nitrógeno en N. crassa ocurre principalmente a través de la vía de la glutamato deshidrogenasa biosintética (GDH-NADPH)-Glutamina Sintetasa (GS) (Mora J. et al., 1988). Cuando la fuente de carbono se vuelve limitante, ambas enzimas son degradadas (Mora, Y. et al., 1980; Kapoor y Grover., 1970). Hemos encontrado que en ausencia de la fuente de carbono se pierde la actividad de ambas enzimas en un cultivo aireado, pero dicha actividad se conserva si se impide la aireación del cultivo (Aguirre y Hansberg., manuscrito anterior en esta tesis).

Durante el crecimiento aéreo de N. crassa la actividad de estas dos enzimas se pierde en el micelio expuesto directamente al aire (Cárdenas y Hansberg., 1984) en presencia o ausencia de nutrientes (tabla 1, resultados sección VI). Por otra parte, la GS de N. crassa se modifica en condiciones de limitación de carbono de una manera similar a la producida in vitro por un sistema oxidante productor de radicales de oxígeno (Aguirre y Hansberg., 1986). Estos antecedentes sugerían que la GDH-NADPH podría ser regulada también por oxidación. Sin embargo, los experimentos iniciales sobre oxidación de esta enzima in vitro por las mezclas ascorbato + FeIII o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + FeII no mostraron ningún efecto.

Dado que se ha reportado que varias enzimas son inactivadas por intercambio tiol-disulfuro con características que las hacen posibles in vivo en condiciones donde se exagera la producción de radicales de oxígeno (Brigelius, R., 1985), decidimos explorar la posible oxidación de GDH-NADPH por disulfuros.

En este reporte presentamos datos que indican que dicha enzima es inactivada reversiblemente por la formación de disulfuros mixtos con varios compuestos. Se reporta también que el agente reductor ditioneitol (DTT) activa a la enzima pura y en extractos. Por último, se discute el posible significado fisiológico de esta formación de disulfuros mixtos en condiciones de degradación de la GDH-NADPH.

## RESULTADOS:

### Inactivación por disulfuros de la GDH-NADPH en extractos celulares.

Cuando un extracto de *N. crassa* se incubó con algunos de los disulfuros que han sido propuestos como reguladores de ciertas enzimas (Ziegler, D.M., 1985), se pudo observar que la cistina y la cistamina fueron capaces de inactivar notablemente a la enzima GDH-NADPH. Esta inhibición no se observó en presencia del tiol ditioneitol (DTT). El disulfuro glutation oxidado (GSSG) no inactivó a la GDH-NADPH en extractos celulares (tabla 1).

Dado que la cistina tuvo en extractos el efecto inactivador de la GDH-NADPH más pronunciado, se decidió estudiar mas detalladamente su efecto. En la figura 1 se observa la cinética de inactivación de la enzima por cistina 2 mM y la recuperación de la actividad a distintos tiempos por la adición de DTT 3 mM. El proceso de inactivación es temperatura sensible, no ocurre a 4°C y es más rápido a 50° que a 30°C. Cuando la inactivación se llevó a cabo en presencia de los sustratos de la enzima, solos o en distintas combinaciones, se observó que únicamente el NADPH solo, o en presencia de amonio, fué capaz de proteger a la enzima contra la inactivación por cistina. La presencia de  $\alpha$ -cetoglutarato disminuyó parte del efecto protector del NADPH (tabla 2).

### Inactivación por disulfuros de la GDH-NADPH purificada.

Cuando una preparación de GDH-NADPH altamente purificada se incubó en presencia de cistina, cistamina y GSSG, se observó que los tres compuestos inactivan a la enzima, siendo cistamina la que presentó el mayor efecto. En los tres casos fue posible recuperar la mayor parte de la actividad con DTT (tabla 3).



## Formación de disulfuros mixtos entre la cistamina y la GDH-NADPH.

La inactivación de la GDH-NADPH por disulfuros y su reactivación por agentes reductores, sugiere que la inactivación de la enzima se debe a la unión de los disulfuros con la enzima, y la reactivación a la liberación de estos. Cuando la enzima pura, incubada con o sin cistamina, se corrió en un electroenfoque, se observó en el gel teñido con Coomassie que la enzima no tratada presenta una banda mayoritaria, una banda muy tenue con punto isoeléctrico más básico y dos bandas más ácidas (figura 2A, carril 1). En el carril correspondiente a la enzima tratada con cistamina, se observó que el polipéptido mayoritario desaparece prácticamente (figura 2A, carril 2). La adición del DTT a la enzima tratada con cistamina reestablece el patrón observado para la enzima no tratada (figura 2A, carril 3). En el mismo gel teñido con plata se pudo apreciar que en la enzima no tratada, el polipéptido principal teñido primero con coomassie, no se tiñó con plata y además se observaron cuando menos cuatro polipéptidos más con puntos isoeléctricos mucho más básicos. La adición de cistamina produce la aparición de una gran cantidad de polipéptidos con puntos isoeléctricos más básicos que la banda principal, lo cual es consistente con la naturaleza básica de la cistamina. Los cuatro polipéptidos más básicos que se observan en la enzima nativa, parecen incrementarse también por el tratamiento con cistina. Al igual que en el gel teñido con Coomassie, se puede apreciar que el DTT produce la desaparición del gran número de polipéptidos básicos generados por la cistamina, y el reestablecimiento del patrón observado para la enzima nativa (figura 2B).

## DISCUSION:

En este reporte hemos mostrado que la enzima GDH-NADPH pura de N. crassa es inactivada por los disulfuros cistina, cistamina y GSSG. De éstos, la cistamina es la que mostró el efecto más pronunciado (inactivación total en menos de 2 h a 30°C con cistamina 1 mM). Hemos correlacionado:

- la inactivación de la enzima con la disminución del polipéptido principal en un electroenfoque nativo y la aparición de múltiples polipéptidos básicos y
- la desaparición de dichos polipéptidos, con la recuperación del polipéptido mayoritario y la reactivación de la enzima por la adición del DTT.

Estos resultados son consistentes con un intercambio tiol-disulfuro. Este puede ocurrir básicamente de las dos formas siguientes (Freedman, R., 1979):



(donde P = proteína; X-S-S-X = disulfuro; S = azufre; X= radical)

Esto significa que la GDH-NADPH de N. crassa en presencia de disulfuros, puede formar disulfuros mixtos (P-S-S-X) y/o puentes disulfuro intra o inter moleculares. Se ha reportado que esta enzima tiene seis grupos tioles por subunidad y que éstos grupos no son esenciales para la actividad catalítica, ya que, al ser carboximetilados, la actividad de la enzima no se ve afectada (Blumenthal y Smith, 1973). Esto indica que la inactivación de la GDH-NADPH por disulfuros no se debe per se a la oxidación de sus grupos tioles. Probablemente la formación de disulfuros mixtos interfiera con los cambios conformacionales que se ha reportado que ocurren a distintos pH (Ashby et al., 1974), o por la unión de sus sustratos y factores alostéricos (Gore, M., 1981; West et al, 1967).

Los resultados que se obtuvieron en extractos celulares y con la enzima pura, muestran discrepancias en cuanto a la efectividad de cada disulfuro para inactivar a la GDH-NADPH. Por ejemplo, GSSG no mostró efecto en extractos y sí con la enzima pura; la cistina fué el disulfuro que más inactivó en extractos, mientras que cistamina fué el más efectivo con la enzima pura. Esto pudiera deberse a que el intercambio tiol-disulfuro puede ocurrir espontáneamente, que sería el caso de disulfuros + enzima pura, o bien, puede ser catalizado por diversas enzimas (Freedman, R., 1979). De acuerdo con esto, la

presencia en extractos de alguna(s) de esta(s) enzima(s) con determinada especificidad podría ser la causante de las diferentes eficiencias de inactivación observadas. Con la enzima pura, la efectividad de los distintos disulfuros no es la misma, ya que se requiere una concentración 10 veces mayor de GSSG que de cistamina para tener una inactivación semejante. Esto ha sido observado también para otras enzimas (Offerman, M. K. et al., 1984; Brandwein, H. J. et al., 1981) y posiblemente esté relacionado con el menor potencial de reducción del glutatión con respecto a los otros dos disulfuros.

El hecho de que el NADPH proteja a la enzima de la inactivación por cistina en extractos podría deberse a la reducción directa de la cistina por el NADPH. Sin embargo, en este caso uno no esperaría que la presencia del  $\alpha$ -cetoglutarato afectara este proceso. Lo que se observa es que el  $\alpha$ -cetoglutarato reduce en cerca de un 50% el efecto protector del NADPH. Lo anterior sugiere que el efecto de los sustratos sobre la conformación de la enzima es el responsable de la protección o labilización ante la reacción con la cistina.

La unión directa de la cistamina a la GDH-NADPH se demostró porque induce en esta una gran heterogeneidad de carga. Nuestra interpretación de este resultado es que en la enzima no tratada (carril 1, figura 2B) el polipéptido mayoritario corresponde al hexámero nativo mientras que los cuatro polipéptidos más básicos que sólo se observan en el gel tenido con plata, podrían corresponder a los monómeros. La razón para observar cuatro diferentes monómeros, puede residir en la heterogeneidad que este presenta en cuanto a su punto isoeléctrico (Aguirre y Hansberg, manuscrito anterior). La gran cantidad de polipéptidos básicos que se observan, corresponderían a hexámeros o monómeros con cantidades variables de cistamina. Es posible que también ocurra disociación del hexámero ya que los presuntos monómeros se ven incrementados cuando la enzima se trató con cistamina (carril 2, figura 2).

Desgraciadamente no es posible descartar que, lo que nosotros interpretamos como monómeros, sean algunas impurezas en nuestra preparación de enzima pura ya que la tinción con plata es capaz de detectar polipéptidos en el orden de nanogramos (Wray et al., 1981). Para descartar esta posibilidad, se intentará hacer el mismo tipo de experimento en condiciones donde la enzima esté disociada.

La regulación enzimática por intercambio tiol-disulfuro (Ziegler, 1985, rev.) es un proceso bien estudiado en plantas y cianobacterias. Se conoce que la iluminación de los cloroplastos produce un flujo de electrones desde la clorofila hacia la Tiorredoxina, mediado por la Ferredoxina, y que es la Tiorredoxina la que modula

la actividad de varias enzimas claves (Buchanan, B., 1980 y Udvary et al., 1984). Sin embargo, este tipo de regulación en organismos no fotosintéticos sigue siendo materia de gran controversia. La regulación por intercambio tiol-disulfuro de las vías glicolítica y gluconeogénica en vertebrados es de los casos más estudiados y resulta muy sugestivo el hecho de que las enzimas que catalizan reacciones opuestas en estas vías, son activadas e inactivadas por disulfuros o tioles de una manera recíproca (Gilbert, H., 1982). Por otra parte existe una buena correlación entre estos estudios in vitro y el metabolismo de carbono en tejidos intactos tratados con oxidantes fuertes (Brigelius, R., 1985).

Otros datos que hacen atractiva la posible regulación metabólica por disulfuros y tioles son los siguientes:

a) Se han descrito una gran cantidad de enzimas regulables in vitro por este mecanismo (Ziegler, D., 1985).

b) Existen enzimas capaces de catalizar el intercambio tiol-disulfuro in vivo (Freedman, R., 1979).

c) La concentración intracelular de compuestos como el glutatión, es suficientemente elevada como para producir los efectos de activación-inactivación observados in vitro para muchas enzimas (Meister, A., 1983; Ziegler, D., 1985; Brigelius, R., 1985).

Hasta ahora la principal objeción a la hipótesis de regulación metabólica por el intercambio tiol-disulfuro es el hecho de que, en los pocos estudios hechos in vivo, se han empleado compuestos y condiciones poco fisiológicas para incrementar la concentración intracelular de disulfuros (uso de compuestos xenobióticos productores de oxígeno activado o tensiones de oxígeno muy altas).

Si la oxidación de la GDH-NADPH por disulfuros ocurre o no in vivo es una cuestión que tendrá que investigarse en el futuro ya que nuestra hipótesis de trabajo es que N. crassa atraviesa durante el proceso de la conidiación por condiciones prooxidantes (Hansberg y Aguirre., en preparación) en las cuales la abundancia de compuestos disulfuros se vería incrementada. Además, el hecho de que el tratamiento con DTT incremente la actividad de la enzima pura (55%) y en extractos (10-40%) de una manera muy reproducible, hace aún más factible este tipo de regulación. Un posible enfoque experimental para tratar de responder a la pregunta, consistiría en correr en un electroenfoque nativo distintos extractos celulares con y sin DTT, para después electrotransferir este gel a nitrocelulosa e inmunodetectar la GDH-NADPH en el papel. Si se encuentran isoformas interconvertibles por el DTT, esto indicaría que in vivo se le une algo a la enzima a nivel de sus grupos tiol.

Es posible que la oxidación de la GDH-NADPH por disulfuros y la oxidación por oxígeno activado estén relacionados de alguna manera (v. gr. que la enzima con disulfuros mixtos sea mas sensible a oxidación por oxígeno activado), lo cual podría ser explorado en el futuro.

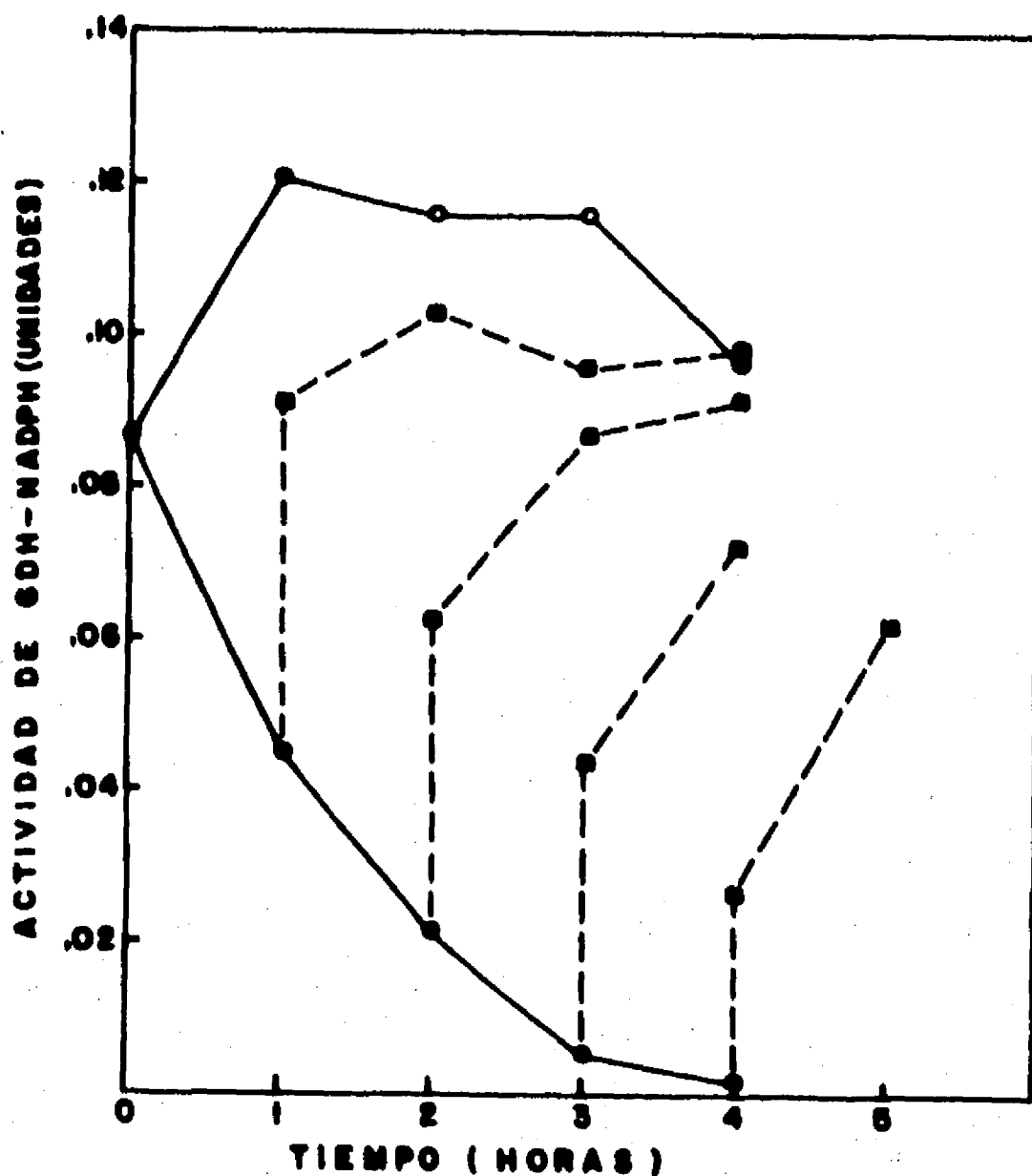


Figura 1. Inactivación de la GDH-NADPH en extractos tratados con cistina y su reactivación con DTT.

Un extracto celular se dividió en dos partes. A una se le añadió cistina (● — ●) y a la otra cistina + DTT (■ --- ■). Ambas se incubaron a 25°C, pH 8 por 1 h. Posteriormente se cambió el pH a 6.5 y se incubaron a 37°C por los tiempos indicados.

Las líneas discontinuas (■ --- ■) indican la actividad de GDH-NADPH después de añadir el DTT al extracto tratado con cistina, inmediatamente y después de reincubar a 37°C. Concentraciones finales: cistina, 2 mM; ditiotreitól (DTT), 3 mM.

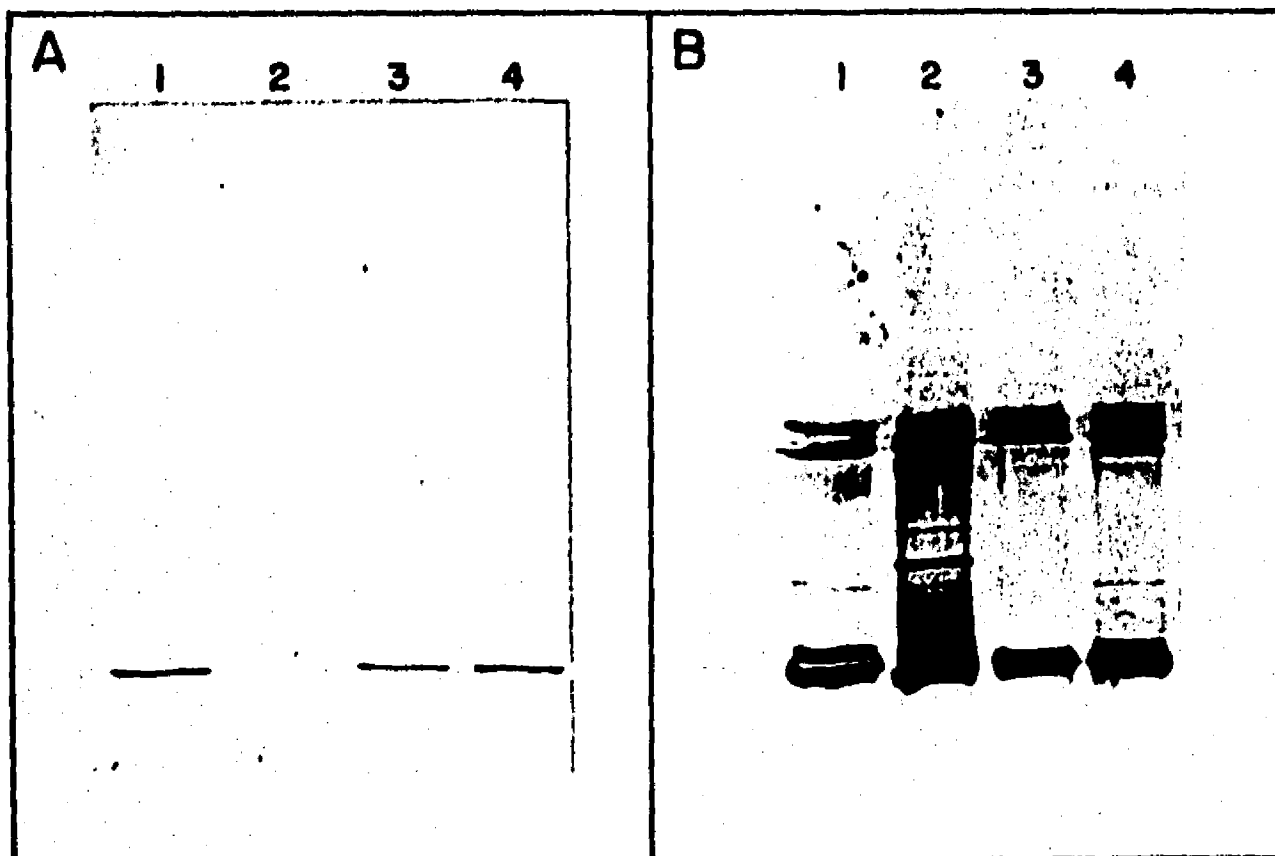


Figura 2. Heterogeneidad de carga inducida por cistamina en la GDH-NADPH.

La GDH-NADPH purificada se incubó con DTT 25 mM a 30°C durante 45 min en HEPES 0.1 M, pH 8. El DTT se eliminó por diálisis en Sephadex y la enzima se trató con cistamina 10 mM por 3 h a 30°C y se dividió en dos partes. Una parte se trató con DTT 25 mM y otra con HEPES y se reincubaron a 30°C por 45 min, después de lo cual las muestras se separaron en un gel de poliacrilamida para electroenfoque en placa, no desnaturizante. A, gel teñido con Coomassie; B, gel teñido con plata. Carril 1, enzima sin adiciones; carril 2, enzima tratada con cistamina; carril 3, tratada con cistamina y después con DTT; carril 4, enzima tratada con DTT.

TABLA 1. EFECTO DE ALGUNOS DISULFUROS SOBRE LA ACTIVIDAD DE GDH-NADPH EN EXTRACTOS CELULARES.

ADICION	ACTIVIDAD (%)
NINGUNA	100
CISTINA	5
CISTINA + DTT	116
CISTAMINA	50
CISTAMINA + DTT	84
GSSG	100

Alicuotas de 40  $\mu$ l de un extracto celular se incubaron en presencia de los distintos compuestos por 1 h a 25°C, pH 8 + 4 h a 37°C, pH 6.5. Al final de cada incubación se determinó la actividad de la GDH-NADPH. Concentraciones finales: cistina, 5 mM; cistamina, 4 mM; glutation oxidado (GSSG), 10 mM; ditioneitol (DTT), 50 mM en todos los casos excepto cuando se adicionó cistamina, donde fué 16 mM.



**TABLA 2. EFECTO DE LOS SUSTRATOS SOBRE LA INACTIVACION DE LA GDH-NADPH POR CISTINA EN EXTRACTOS CELULARES.**

ADICION	ACTIVIDAD (%)
NINGUNA	100
CISTINA	2
CISTINA + NH <sub>4</sub>	3
CISTINA + α-CETO	2
CISTINA + NADPH	79
CISTINA + NADPH + α-CETO	43
CISTINA + NADPH + α-CETO + NH <sub>4</sub>	71
CISTINA + α-CETO + NH <sub>4</sub>	2

Los extractos se incubaron a 25°C por 1 h a pH 8 en presencia de cistina y los sustratos indicados. Después de la incubación a 25°C, el pH se cambió a 6.5, se incubaron a 37°C durante 4 h y se determinó la actividad de GDH-NADPH. Concentraciones: cistina, 5 mM; NH<sub>4</sub>Cl, α-cetoglutarato (α-CETO) y NADPH, 1 mM.

TABLA 3. INACTIVACION POR DISULFUROS DE LA GDH-NADPH PURIFICADA Y REACTIVACION POR DTT.

ADICION	ACTIVIDAD (%)
NINGUNA	100
DTT	106
CISTAMINA —————> HEPES	0
CISTAMINA —————> DTT	81
GSSG —————> HEPES	26
GSSG —————> DTT	105
CISTINA —————> HEPES	45
CISTINA —————> DTT	100

Una preparación de GDH-NADPH pura, se incubó con DTT 25 mM a 30°C durante 30 min (lo cual causa una activación de la enzima de aprox. 55% antes de filtrar). Al cabo de este tiempo, la enzima se filtró por Sephadex y se incubó en presencia de los distintos compuestos a 30°C durante 3 h en presencia de amortiguador HEPES 100 mM, pH 8. Pasado este tiempo, cada tratamiento se dividió en dos partes, a una se le añadió DTT y a la otra HEPES y se reincubaron a 30°C por 30 min más. Al final de este tiempo todos los tratamientos se colocaron a 4°C y se les determinó la actividad de GDH-NADPH. Concentraciones finales: cistina y cistamina, 1 mM; glutatión oxidado (GSSG), 10 mM; DTT, 5 mM excepto cuando se usó en presencia de GSSG donde fué 25 mM.

**VI. Oxidación de la GS, la GDH-NADPH y otras proteínas durante el crecimiento aéreo de Neurospora crassa.  
Jesús Aguirre y Wilhelm Hansberg.**

**I.- INTRODUCCION:**

Con base en los resultados obtenidos sobre la oxidación de la GS de Neurospora crassa (Aguirre y Hansberg, 1986) y sobre la oxidación de GDH-NADPH por radicales de oxígeno (Aguirre y Hansberg, esta tesis), decidimos investigar la posible oxidación de estas y otras proteínas durante el crecimiento aéreo de N. crassa. Para ello, decidimos aprovechar el hecho de que las formas oxidada y no oxidada de la GS y la GDH-NADPH pueden ser separadas por sus distintos puntos isoelectrónicos, y para la detección de otras proteínas oxidadas, nos basamos en el hecho de que aparentemente una buena parte de la oxidación por especies activas de oxígeno introduce grupos carbonilo en las proteínas modificadas y éstos grupos pueden ser cuantificados por su reacción con 2,4-dinitrofenilhidazina (Levine, R., 1984 I; Ahn, B. et al., 1987).

## RESULTADOS:

La actividad de GS y GDH-NADPH durante el crecimiento aéreo en presencia y ausencia de nutrientes.

Las actividades de GS y GDH-NADPH se pierden durante el crecimiento aéreo en el micelio superior y se conservan en el micelio inferior (Cárdenas y Hansberg, 1984). Para tratar de comprender este fenómeno y, dado que tanto la fuente de carbono como la de nitrógeno tienen efectos sobre la síntesis y degradación de estas enzimas (Mora, Y. et al., 1980; Kapoor y Grover, 1970; Hernández G. et al., 1983; Vichido, I. et al., 1978), decidimos medir las actividades de estas dos enzimas durante el crecimiento aéreo en presencia de distintos nutrimentos. En la tabla 1 se puede ver que ninguno de los nutrimentos probados afectaron el patrón que se observa en ausencia total de nutrientes. Es decir, que las actividades de GS y GDH-NADPH tienden a conservarse en el micelio inferior y a perderse en el micelio superior, independientemente de los nutrimentos del medio.

### Oxidación de la GS durante el crecimiento aéreo de *N. crassa*.

En vista de que la GS se pierde en el micelio expuesto directamente al aire, independientemente de la fuente de carbono y/o nitrógeno en el medio, y de que se ha encontrado que la GS es oxidada in vivo en cultivos aireados sin fuente de carbono (Aguirre y Hansberg, 1986), decidimos inmunoprecipitar a la GS del micelio superior e inferior de distintos tiempos de crecimiento aéreo y analizar los inmunoprecipitados en geles de dos dimensiones. Se encontró que a los 30 min de exposición al aire, es posible detectar en el micelio superior una cantidad de GS oxidada (figura 1B) significativamente mayor que en el micelio inferior (figura 1A).

### Oxidación de la GDH-NADPH durante el crecimiento aéreo de *N. crassa*.

Un experimento semejante al anterior se llevó a cabo inmunoprecipitando a la GDH-NADPH de micelio superior e inferior de 30 min. Los inmunoprecipitados se analizaron en geles de electroenfoque en placa. En la figura 2 se puede apreciar que no se detecta ninguna diferencia entre estas dos condiciones.

## Detección de los grupos carbonilos en la proteína total del micelio superior durante el crecimiento aéreo de N. crassa.

Con el objeto de saber si la oxidación de un extracto in vitro introduce grupos carbonilo en una muestra de proteína total, un extracto de 12 h de crecimiento en líquido, tratado con estreptomycin para descartar los ácidos nucleicos (Ahn, B. et al., 1987), se dividió en partes iguales y cada una de estas se sometió a la acción de diversas mezclas oxidantes para luego cuantificar la cantidad de grupos carbonilo en la proteína total por la reacción de 2,4-dinitrofenilhidrazina (Levine, R., 1984). Los resultados se muestran en la Tabla 2, donde se puede notar que todas las mezclas usadas son capaces de generar carbonilos en esta muestra de proteína medidos por su absorbencia a 375 nm. Las mezclas más efectivas resultaron Azida + EDTA + FeIII + ascorbato y esta misma mezcla sin azida, que lograron un incremento de aproximadamente 30% en el contenido de carbonilos de la proteína total.

Con este experimento como antecedente, se decidió cuantificar el contenido de carbonilos en la proteína total aislada del micelio superior a distintos tiempos de crecimiento aéreo. Los resultados se presentan en la Figura 3, donde se puede observar que, a los 20 min de exposición al aire, existe un incremento brusco en la cantidad de grupos carbonilos en la proteína total para después decrecer hacia valores semejantes a los iniciales, volver a aumentar ligeramente y luego mantenerse relativamente constante hasta las 15 h de exposición al aire.

## DISCUSION:

En este breve reporte presentamos datos que indican:

a) Que es posible detectar GS oxidada en el micelio superior de N. crassa, 30 min después de exponer al aire el micelio crecido en líquido. En el micelio inferior se detecta también GS oxidada pero en una cantidad mucho menor.

b) Que no se detecta GDH-NADPH modificada en las condiciones mencionadas antes.

c) Que la cantidad de grupos carbonilo en proteína total muestra un incremento significativo a los 20 min de crecimiento aéreo.

Todo esto indica que la oxidación de la GS y otras proteínas es un fenómeno que ocurre muy tempranamente durante el crecimiento aéreo de N. crassa. En principio, sorprende que estos fenómenos ocurran minutos después de exponer al aire el micelio crecido en líquido. Sin embargo, debe recordarse que la agregación del micelio expuesto al aire o formación del micelio superior, ocurre en menos de 30 min y que a las 3 h se pueden observar a simple vista los ápices de hifas aéreas.

La detección de la GS oxidada en mayor grado en el micelio superior que en el micelio inferior explica, al menos en parte, porqué la actividad de esta enzima se pierde en el micelio superior y se conserva en el micelio inferior durante el crecimiento aéreo (Cárdenas y Hansberg., 1984), tanto en presencia como en ausencia de nutrientes (Tabla 1).

Con respecto a la GDH-NADPH, podemos decir únicamente que a los 30 min de crecimiento aéreo no es posible detectar diferencias entre los micelios superior e inferior con respecto a la cantidad y heterogeneidad de carga de esta enzima. Debe decirse, sin embargo, que cuando el gel mostrado en la Figura 2 se tinte con plata (no se muestra), se apreció en ambas condiciones el polipéptido que corresponde al primer polipéptido ácido presente en la GDH-NADPH pura (Aguirre y Hansberg, esta tesis). La razón por la que no se detectan diferencias en la GDH-NADPH inmunoprecipitada de los micelios superior e inferior se desconoce, pero podría deberse a que la enzima modificada se degrada rápidamente, o se precipita. Es posible también que el fenómeno de oxidación in vivo de la GDH-NADPH no se deba a radicales de oxígeno, sino a fenómenos que involucran la formación de disulfuros mixtos como los descritos en esta tesis, los cuales no se verían en este tipo de geles. Aún existen condiciones fisiológicas que tendrían que ser exploradas, como la privación de carbono en cultivos hiperaerados, donde puede ser posible detectar a la GDH-NADPH oxidada.

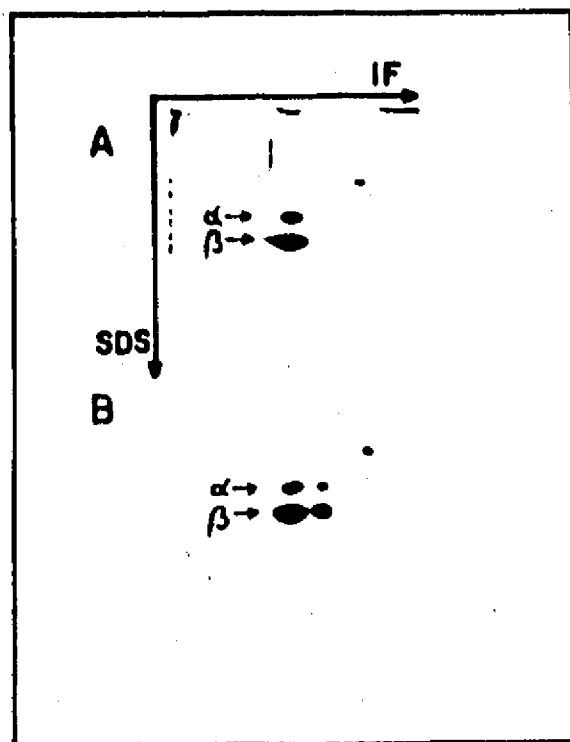


Figura 1. Polipéptidos de la GS modificados in vivo durante el crecimiento aéreo de N. crassa.

Un micelio crecido durante 12 h se filtró y se expuso al aire en condiciones de crecimiento aéreo. A los 30 min se separaron el micelio expuesto directamente al aire (superior) y el micelio que se encuentra debajo de éste (inferior), se prepararon extractos y se inmunoprecipitó la GS. Los inmunoprecipitados se corrieron en geles de poliacrilamida en dos dimensiones y se tificaron con plata. A, GS de micelio inferior; B, GS de micelio superior.



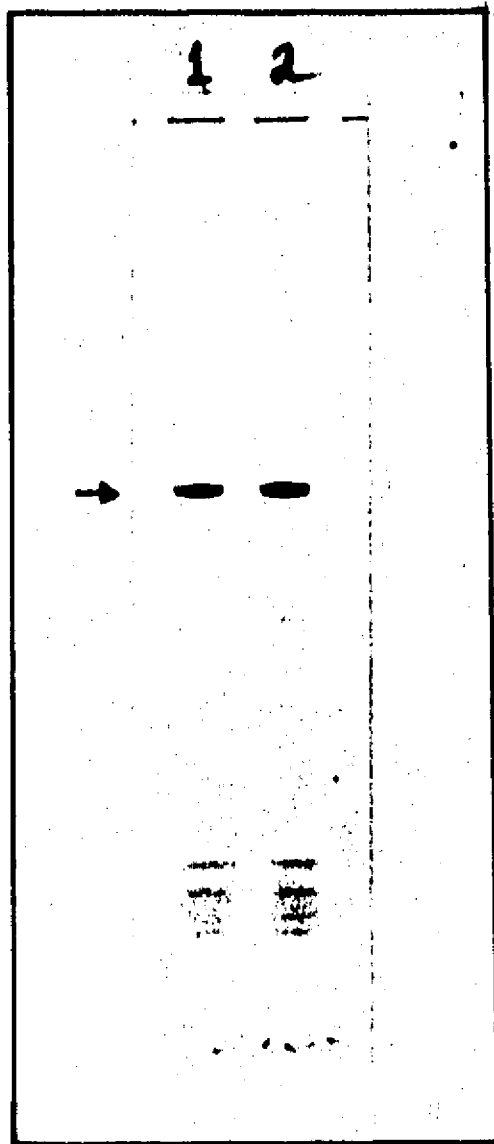


Figura 2. Electroenfoque desnaturalizante de la GDH-NADPH inmunoprecipitada.

Un micelio de 12 h de crecimiento se trató como se indica en la figura 1 y se inmunoprecipitó la GDH-NADPH del micelio superior y del micelio inferior de 30 min. Los inmunoprecipitados se corrieron en un electroenfoque desnaturalizante en gel de poliacrilamida y se tificaron con azul de Coomasie. Carril 1, GDH-NADPH de micelio superior; carril 2, GDH-NADPH de micelio inferior.

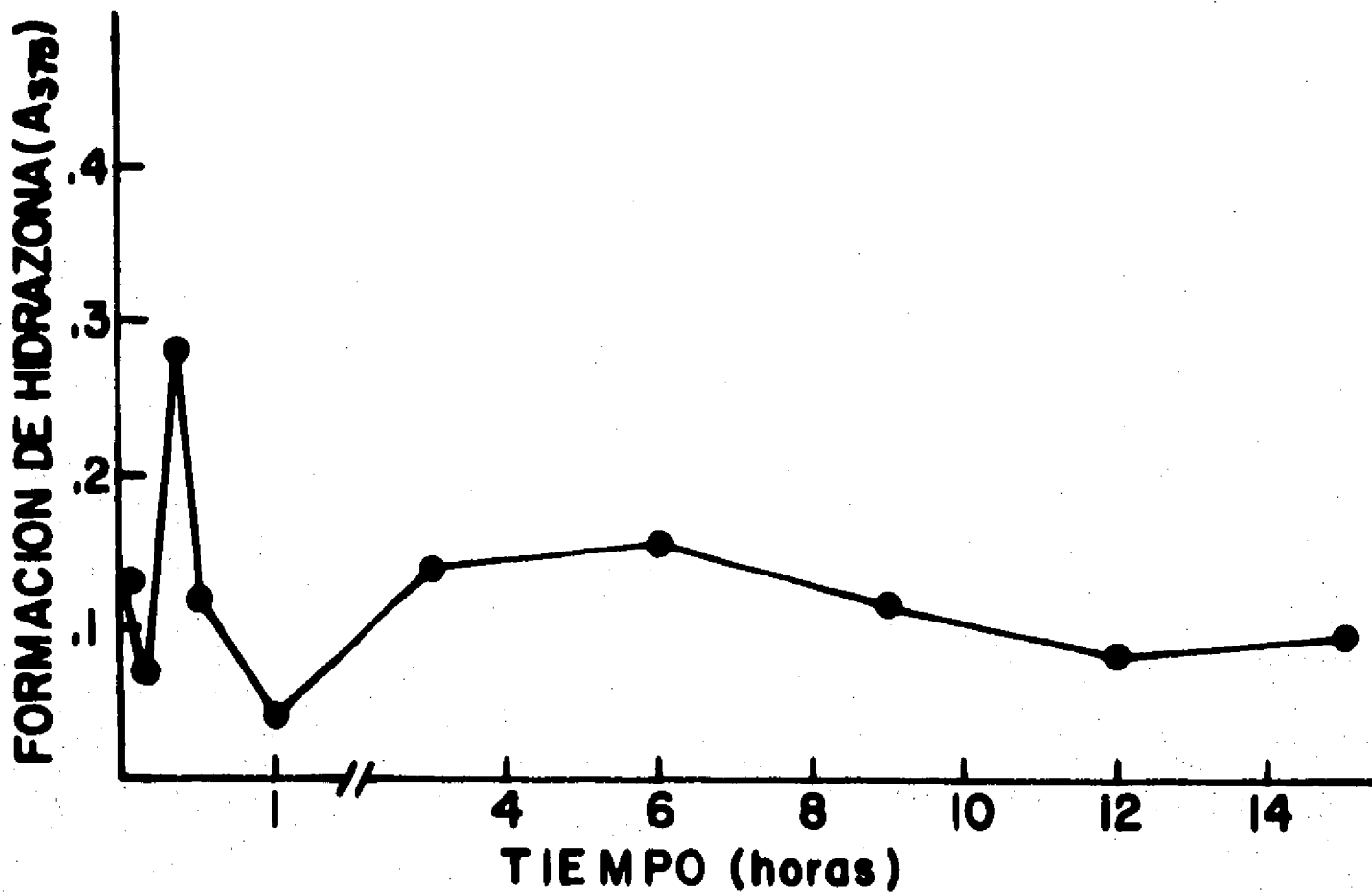


Figura 3. Contenido de grupos carbonilo en la proteína total del micelio superior a distintos tiempos de crecimiento aéreo.

El micelio, crecido en líquido durante 12h, se filtró y se expuso al aire. A los tiempos indicados, se separó el micelio superior, se deshidrató con acetona y se prepararon extractos celulares. La proteína total aislada de los extractos se incubó con 2, 4-dinitrofenilhidrazina, se disolvió en guanidina 6 M y se le cuantificó la absorbencia por mg de proteína a 375 nm.

TABLA 1. ACTIVIDADES RELATIVAS DE GS Y GDH-NADPH DURANTE EL CRECIMIENTO AEREO DE *N. CRASSA*.

	MICELIO INFERIOR				MICELIO SUPERIOR				
	HORAS	PO <sub>4</sub>	+NH <sub>4</sub>	+GLN	+S+NH <sub>4</sub> +	PO <sub>4</sub> +	+NH <sub>4</sub>	+GLN	+S+NH <sub>4</sub> +
GS	0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	3	1.1	0.9	0.5	1.0	0.8	0.5	0.2	0.3
	9	1.2	0.9	0.9	0.9	0.2	0.3	0.2	0.4
	15	2.1	0.8	1.0	0.8	0.0	0.3	0.2	0.4
GDH- (NADPH)	0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	3	1.0	1.5	2.1	1.1	0.7	0.8	-	0.6
	9	1.0	2.0	2.7	0.9	0.2	0.6	0.4	0.3
	15	1.0	2.0	2.0	1.0	0.0	0.2	0.6	0.2

Tabla 1. Actividades específicas relativas de GS y GDH-NADPH durante el crecimiento aéreo en distintos medios.

El micelio, crecido en líquido durante 12h, se filtró y se expuso al aire. A los tiempos indicados se separaron los micelios inferior y superior, se deshidrataron con acetona y se les determinaron las actividades de GS (transferasa) y GDH-NADPH. Las actividades de estas enzimas antes de la exposición del micelio al aire se tomaron como 1.0

**TABLA 2.** CONTENIDO DE GRUPOS CARBONILO EN PROTEINA TOTAL OXIDADA in vitro CON DISTINTAS MEZCLAS OXIDANTES.

ADICION	A <sub>375</sub>	%
NINGUNA	0.967	100
AZIDA + ASC + FeIII + EDTA	1.26	130
AZIDA + ASC + FeIII	1.095	113
ASC + FeIII + EDTA	1.252	129

Un extracto de micelio de 12 h de crecimiento en amortiguador HEPES 50 mM, pH 7.2 se trató con estreptomicina como se indica en Materiales y Métodos y después se dividió en cuatro alicuotas de 0.8 ml, las cuales se trataron con alguna de las mezclas oxidantes indicadas, durante 2 h a 30°C.

Posteriormente se procesaron, (ver Materiales y Métodos), se incubaron con 2,4-dinitrofenilhidrazina y se les determinó la absorbancia a 375 nm.

## DISCUSION GENERAL.

### A) Sobre el sistema experimental utilizado.

- La conidiación de N. crassa se inicia tan pronto se expone al aire el micelio crecido en líquido, con la agregación de éste micelio.

- La formación del micelio superior es un proceso activo que requiere del O<sub>2</sub> y que no se debe a la simple acción mecánica ó deshidratación del micelio que se pone en contacto con el aire. El micelio superior no se forma en una atmósfera de N<sub>2</sub>. Si después de 15 h en N<sub>2</sub> se reintroduce aire, éste micelio es capaz todavía de agregarse y esporular (Toledo y Hansberg, resultados no publicados). Por otra parte, la agregación del micelio es un proceso que hemos encontrado asociado siempre a la esporulación y a la presencia de O<sub>2</sub>. En cultivos líquidos es posible inducir la esporulación por hiperaireación cuando los nutrimentos del medio se han agotado. En este caso todo el micelio del cultivo se agrega formando un solo grumo (Aguirre, Dominguez y Hansberg, sin publicar). También en abundancia de nutrientes se puede inducir la esporulación si la agitación del cultivo se hace en presencia de un ligero flujo de O<sub>2</sub> (Toledo y Hansberg, sin publicar). En los cultivos estacionarios el micelio se agrega en la interfase aire-líquido y poco después se produce el crecimiento aéreo.

Algunos resultados preliminares de nuestro laboratorio (W. Hansberg, sin publicar) indican que el mecanismo que induce la agregación parece estar mediado por un polisacárido que el hongo excreta al medio cuando esta limitado de nutrientes en presencia de aire.

- Es el micelio superior el que lleva a cabo la formación del micelio aéreo y durante este proceso se observa autólisis y vacuolización del micelio superior, probablemente como una forma para nutrir el crecimiento del micelio aéreo ya que hemos detectado translocación de metabolitos marcados radioactivamente del micelio superior hacia el aéreo (Aguirre, J., 1984).

B) De la oxidación de la GS.

La GS de N. crassa se inactiva por una modificación oxidativa. La GS inactiva es más sensible a degradación proteolítica in vitro y pudo detectarse in vivo en condiciones donde esta enzima se degrada. Así como a los 30 min después de la exposición al aire de un micelio crecido en líquido, condiciones en las cuales se induce el proceso de conidiación de N. crassa. Este hecho explica la inactivación de la enzima en el micelio superior durante este proceso en presencia y ausencia de nutrientes.

C) De la oxidación de GDH-NADPH y otras proteínas.

C.1) La GDH-NADPH de N. crassa requiere de oxígeno para ser degradada en cultivos sin fuente de carbono. Esta enzima se inactiva irreversiblemente in vitro por un sistema productor de radicales de oxígeno, semejante al usado para oxidar a la GS de N. crassa y de E. coli. La inactivación se debe principalmente a fragmentación de la enzima aunque también se observa precipitación y la introducción de heterogeneidad de carga. Dicha inactivación también puede ser catalizada por ferricitrato + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Parte de la heterogeneidad de carga producida in vitro por oxidación, se observó en dos preparaciones distintas de GDH-NADPH pura y en la enzima inmunoprecipitada de diferentes condiciones fisiológicas, lo cual habla de que este tipo de inactivación pudiera ocurrir en condiciones fisiológicas. El hecho de que un inmunoprecipitado de la cepa am-132 (una delección del gene de la GDH-NADPH) no presente ninguno de los polipéptidos heterogeneos que hemos descrito en este trabajo, es un argumento en contra de que dichos polipéptidos correspondan a otras proteínas que copurifican con la GDH-NADPH.

C.2) La GDH-NADPH de N. crassa se inactiva in vitro reversiblemente por intercambio tiol-disulfuro con disulfuros biológicos. El hecho de que la enzima pura y en extractos celulares se active por DTT, sugiere que este tipo de inactivación podría ocurrir in vivo y sería otra forma de explicar la necesidad de O<sub>2</sub> para degradar esta enzima.

C.3) De los tipos de oxidación descritos antes para la GDH-NADPH solo se buscó in vivo la producida por radicales de oxígeno en una sola condición fisiológica y no fué posible detectarla. Esto no descarta que este fenómeno ocurra in vivo. La enzima modificada puede ser degradada con tal rapidez, que no permita su acumulación y su detección en inmunoprecipitados. Casos de este tipo han sido reportados. Por ejemplo, la enzima Glutamina-Fosforibosil-Pirofosfato-Amidotransferasa (primera en la vía de síntesis de purinas) de Bacillus subtilis, contiene un núcleo ferrosulfurado, que aún cuando no participa en la catálisis se encuentra muy conservado en la escala filogenética, y que al ser oxidado directamente por oxígeno molecular inactiva a la enzima (Turnbough y Switzer, 1975 a y b). Esta enzima se comporta de una manera semejante a como lo hacen la GS y la GDH-NADPH de N. crassa en el micelio superior, ya que su inactivación in vivo requiere del O<sub>2</sub> y de limitación de nutrimentos. Una vez iniciada la inactivación, la Amidotransferasa no responde a la regulación por sustratos o fuentes de nitrógeno y carbono como lo hace normalmente durante el crecimiento y es degradada rápidamente (Bernlohr y Switzer, 1983). Para detectar la enzima oxidada, fué necesario inhibir con antibióticos la expresión de proteasas que degradaban dicha enzima (Ruppen y Switzer, 1983).

C.4) El contenido de grupos carbonilo en la proteína total aumenta in vi tro cuando un extracto se somete a la acción del sistema de oxidación empleado para inactivar a la GS y a la GDH-NADPH. El contenido de carbonilos en la proteína total se incrementa notablemente en los primeros minutos de la exposición directa al aire del micelio precrecido en líquido para volver después a niveles semejantes a los que se detectan durante el crecimiento en ~~líquido~~. Si se confirma éste resultado, estaremos en posibilidades de afirmar:

a) Que la oxidación de proteínas es un proceso que ocurre normalmente en condiciones fisiológicas

b) Que existe una correlación entre la exposición del micelio al aire, su agregación y el incremento en la oxidación de proteínas totales y en particular de la GS.

Estos y otros resultados del laboratorio, nos han llevado a proponer la siguiente interpretación sobre la esporulación de N. crassa:

La exposición al aire del micelio que ha venido creciendo en líquido en abundancia de nutrientes produce dos efectos notables:

1.- La tensión parcial del oxígeno a la que se encuentra sujeto el micelio aumenta considerablemente, lo cual per se puede llevar a un aumento en la concentración intracelular del O<sub>2</sub>.

2.- La limitación de nutrimentos total o parcial conducirá a una limitación en la producción de poder reductor y en consecuencia la cadena de transporte electrónico mitocondrial dejará de reducir el O<sub>2</sub> hasta H<sub>2</sub>O, lo cual trae como consecuencia final un aumento en la concentración intracelular del O<sub>2</sub>.

En los microorganismos aerobios la capacidad para producir poder reductor en abundancia de nutrientes esta en relación a la disponibilidad del oxígeno. Por ello pensamos que el parámetro realmente importante para definir el estado de oxidación de la célula, es la relación que hemos denominado O<sub>2</sub>/XH (dónde O<sub>2</sub> = oxígeno intracelular y XH = poder reductor intracelular). Esta relación tenderá a aumentar si el oxígeno intracelular aumenta por cualquier causa (v.gr. la exposición del micelio al aire) o si la poza de poder reductor intracelular disminuye (v.gr. si el micelio se priva de nutrimentos). En nuestro laboratorio I. Toledo y W. Hansberg han detectado una disminución brusca en la relación de coenzimas reducidas/oxidadas en los primeros minutos de exposición del micelio al aire, lo cual precede en el tiempo y es congruente con la oxidación de proteínas reportada en este trabajo.

¿ Por qué creemos que es importante la concentración intracelular del oxígeno ?.

Es claro que la vida no podría haber surgido en la tierra en una atmósfera oxidante y que la mayor parte del metabolismo celular surgió y se seleccionó en una atmósfera carente de oxígeno en cantidades significativas. De hecho, el advenimiento de una atmósfera rica en oxígeno marcó profundamente la evolución posterior de los seres vivos en la tierra primitiva (Chapman y Schopf, 1983). La toxicidad del oxígeno se debe a que al ser reducido parcialmente, genera radicales libres ó formas activadas de oxígeno. Algunas de estas formas son altamente reactivas y



capaces de reaccionar prácticamente con todas las biomoléculas, produciendo modificación y fragmentación de ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y polisacáridos (Slater, F. T., 1984; Halliwell y Gutteridge, 1984). La existencia y ubicuidad entre los seres vivos de las enzimas Superóxido Dismutasa, Catalasa y Peroxidasas sirven como argumento en favor de la producción de oxígeno activado in vivo (McCord et al., 1971). Por otra parte se conocen múltiples reacciones metabólicas que producen superóxido ( $O_2^-$ ) ó peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como subproductos (Jones, D. P., 1985) y varias reacciones por las cuales éstos compuestos generan especies activadas más agresivas (Slater, F. T., 1984; Halliwell y Gutteridge, 1984). La producción in vivo de varios radicales de oxígeno ha sido demostrada en plantas y otros organismos (Cadenas E., 1985). Se conocen condiciones que producen un aumento en la concentración intracelular de oxígeno y sus formas activadas y este estado ha sido definido como estado prooxidante (Cerruti, P., 1984). Así pues, nosotros pensamos que cuando N. crassa se pone en contacto directo con el aire con o sin nutrientes, se produce un estado prooxidante.

¿ De que manera el estado prooxidante conduce a la esporulación ?.

El proceso de esporulación en en N. crassa ocurre perfectamente en ausencia total de nutrientes exógenos y en esas condiciones el proceso tiene que ser sostenido por reservas endógenas. Hemos observado que durante el proceso ocurre una degradación masiva de proteína (aproximadamente 40% de la proteína total; Cárdenas, M. E., 1983). Habiendo demostrado que las actividades de algunas enzimas pueden ser modificadas in vivo por procesos que involucran oxígeno ó sus radicales libres y que estas modificaciones pueden marcar a las enzimas para su posterior degradación proteolítica, pensamos que la degradación proteolítica tan generalizada que hemos observado durante la conidiación de N. crassa está causada por un estado prooxidante. Este estado detendría el crecimiento celular y cambiaría por completo el perfil metabólico de las células. Evidentemente este estado sería el responsable de la inactivación y/o degradación de la GS, de la GDH-NADPH y del aumento de los carbonilos en la proteína celular.

¿ Cómo la modificación de ciertas actividades enzimáticas y la degradación de proteínas conduce a la expresión genética diferencial que se observa en los procesos de diferenciación ?

De la misma manera que parece ocurrir durante el crecimiento. Por ejemplo, la pérdida de la actividad de la GS conduce a la depleción en la poza de glutamina, la cual, siendo correpresor del catabolismo nitrogenado, deja de reprimir y permite que se expresen un grupo de genes para la utilización de otras fuentes de nitrógeno. Entre las enzimas que se expresan en estas condiciones esta una proteasa y varias enzimas para el catabolismo de varios aminoácidos (Marzluf G. A., 1981). Posiblemente el efecto inhibitorio de la glutamina y el amonio sobre la esporulación de varios microorganismos (ver Hansberg, W., 1984) y en particular de la conidiación de N. crassa (Turian y Bianchi, 1972; Toledo, I. et al., 1986), se deba a la falta de inducción de dichas enzimas debido a una poza alta de glutamina.

#### EN RESUMEN:

Vemos la conidiación en N. crassa como una serie sucesiva de catástrofes (estados prooxidantes) que se producen cada vez que la relación O<sub>2</sub>/X<sub>H</sub> aumenta. Así, el proceso visto en detalle significaría:

El rompimiento del estado de crecimiento debido a un estado prooxidante conduce a la formación del micelio superior. El micelio superior, debido al catabolismo de proteínas y otras reservas permite el estado de crecimiento transitorio que significa el crecimiento aéreo. Un estado prooxidante en el micelio aéreo conduce a la formación de las esporas o conidias en las puntas de las hifas aéreas. Al respecto, S. Brody y sus colaboradores han detectado niveles elevados de GSSG en las conidias de N. crassa en comparación con los del micelio en crecimiento, y la conversión de éste GSSG a GSH durante la germinación (Fahey, R.C. et al., 1975). Así mismo, el contenido de enlaces disulfuro en proteína total de las conidias es cerca de cinco veces mayor que el que se encuentra en el micelio. El hecho de que en estos experimentos, la aereación exhaustiva del micelio "solo" produjo un incremento del doble en los disulfuros de proteína total llevó a los autores de este trabajo a descartar al aire como el causante de la oxidación de proteínas que ellos observan en conidias. Es indudable que la conidia es un estado oxidado y nosotros pensamos que se llega a él después de varios estados prooxidantes.

La hipótesis aquí planteada ha sido ampliada para explicar la diferenciación en varios microorganismos (Hansberg y Aguirre, en preparación) y resulta claro que su demostración no puede ser abordada con un sólo enfoque experimental y que requerirá de la acumulación de diversas evidencias. En éste trabajo solamente hemos abordado el aspecto de la oxidación de proteínas en N. crassa.

#### REFERENCIAS:

Aguirre, J. 1984. Transporte de metabolitos durante la aerealogénesis en Neurospora crassa. El transporte de glutamina. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias y CIFN, UNAM, México.

Aguirre, J. and W. Hansberg. 1986. Oxidation of Neurospora crassa Glutamine Synthetase. *J. Bacteriol.* 166:1040-1045.

Ahn, B., S.G. Rhee and E.R. Stadtman. 1987. *Anal. Biochem.* 161:245-257.

Ashby, B., J. C. Wooton and J. R. S. Fincham. 1974. Slow conformational changes of Neurospora Glutamate Dehydrogenase studied by protein fluorescence. *Biochem. J.* 143:317-329.

Autor, A.P. 1984. Oxygen toxicity in eukaryotes. in: *The Biology and Chemistry of Active Oxygen*, Banister and Banister (Eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 139-145.

Bernlohr, D.A. and R.L. Switzer. 1983. Regulation of Bacillus subtilis Glutamine-Phosphorybosil-Amido-Transferase inactivation in vivo. *J. Biol. Chem.* 153:937-949.

Blumenthal, K. and E. Smith. 1974. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific Glutamate Dehydrogenase of Neurospora crassa. *J. Biol. Chem.* 248:6002-6008.

Brandwein, H.J., J.A. Lewicki and F. Murad. 1981. Reversible inactivation of Guanylate Cyclase by mixed disulfide formation. *J. Biol. Chem.* 256:2958-2962.

Brigelius, R. 1985. Mixed disulfides: Biological functions and increase in oxidative stress. in: *Oxidative Stress*, H. Sies (Ed), pp. 243-272. Academic Press, Orlando.

Brody, S., S.D. Mikolajczyk and R.C. Fahey. 1983. Levels of sulfhydryls and disulfides in proteins from Neurospora crassa conidia. *J. Bacteriol.* 156:703-709.

Buchanan, B. B. 1980. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 31:341-374.

Cadenas, E. 1985. Oxidative stress and formation of excited species. in: *Oxidative Stress*, H. Sies (Ed), pp. 311-330. Academic Press, Orlando.

Cárdenas, M. E. 1983. Papel de la glutamino sintetasa durante la formación del micelio aéreo de Neurospora crassa. Tesis de Maestría, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrogeno y CCH, UNAM.

Cárdenas, M. E. and W. Hansberg. 1984. Glutamine Metabolism during aerial mycelium growth of Neurospora crassa. J. Gen. Microbiol. 130:1733-1741.

Cerruti, P. A. 1985. Prooxidant states and tumor promotion. Science 227: 375-381.

Chapman, D.J. and J.W. Schopf. 1983. Biological and Biochemical effects of an aerobic environment. in: Earth's earliest biosphere. J.W. Schopf (Ed), Princenton University Press, Princenton, USA.

Davies, K. J. A. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. J. Biol. Chem. 262: 9895-9901.

Davies, K. J. A., M. E. Delsignore and S. W. Lin. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. J. Biol. Chem. 262: 9902-9907.

Davies, K. J. A. and M. E. Delsignore. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. J. Biol. Chem. 262: 9908-9913.

Davies, K. J. A., S. W. Lin and R. E. Pacifici. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. J. Biol. Chem. 262: 9914-9920.

Fahey, R.C., S. Brody and S.D. Mikolajczyk. 1975. Changes in the glutathione thiol-disulfide status of Neurospora crassa conidia during germination and aging. J. Bacteriol. 121:144-151.

Farber, J. M. and R. L. Levine. 1986. Sequence of a peptide susceptible to mixed-function oxidation. Probable cation binding site in Glutamine Synthetase. J. Biol. Chem. 261: 4574-4578.

Fincham, J.R.S. 1957. Biochem J. 65:721-723.

Flitter, W., D. A. Rowley and B. Halliwell. 1983. Superoxide dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. What is the physiological iron chelator? FEBS. Lett. 158: 310-312.

Freedman, R. B. 1979. How many distinct enzymes are responsible for the several cellular processes involving Thiol: Protein disulfide interchange?. *Febs. Lett.* 97:201-210.

Fucci, L., C. N. Oliver, M. J. Coon, and E. R. Stadtman. 1983. Inactivation of key enzymes by mixed-function oxidation reactions: Possible implications in protein turnover and ageing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 1521-1525.

Gilbert, H. F. 1982. Biological Disulfides: The third messenger?. *J. Biol. Chem.* 257:12086-12091.

Giulian, G. 1986. Isoelectric focusing of mouse ascites fluid and myosin in the SE 600 vertical slab unit. *Hoefer Scientific Instruments catalog*. pp. 121-124.

Goldin, B.R. and C. Frieden. 1971. L-Glutamate Dehydrogenases. *Curr. Top. Cell Regul.* 4:77-117.

Gore, M.G. and M. Iwatsubo. A deactivating conformational change induced by NADPH in a *Neurospora* Glutamate Dehydrogenase. *Biochem. J.* 147:181-184.

Gore, N.G. and C. Greenwood. 1975. Regulatory properties of NADPH on a Glutamate Dehydrogenase. *Int. J. Biochem.* 6:829-833.

Gore, M. G., 1981. L-Glutamic acid Dehydrogenase. *Int. J. Biochem.* 13:879-886.

Halliwell, B. y Gutteridge, M. C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1-14.

Hansberg, W. 1984. Fisiología de la esporulación. en: *Caminos de la Biología experimental*. ed. J. Martuscelli, R. Palacios y G. Soberón, UNAM, México. pp. 365-383.

Hernandez, G., R. Sánchez-Pescador, R. Palacios and J. Mora. 1983. Nitrogen regulates Glutamata Dhydrogenase NADP Synthesis in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.*, 154:524- .

Hodgson, E.K. and I. Fridovich. 1975. The interaction of bovine erythrocyte Superoxide Dismutase with hydrogen peroxide: Inactivation of the enzyme. *Biochemistry* 14:5294-5299.

Jones, D. P. 1985. The role of oxygen concentration in oxidative stress: hypoxic and hyperoxic models. in: Oxidative stress H. Sies (Ed.), Academic Press Inc., Orlando, USA.

Kinsey, J.A. and Bao-Shin T. Hung. 1981. Mutation at the am locus of Neurospora crassa. Genetics 99: 405-414.

Kapoor, M and A. K. Grover. 1970. Catabolite controlled regulation of Glutamate Dehydrogenases of Neurospora crassa. Can. J. Microbiol. 16:33-40.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature 227:680-685.

Levine, R.L., C.N. Oliver, R.M. Fulks and E.R. Stadtman. 1981. Turnover of bacterial Glutamine Synthetase : Oxidative inactivation precedes proteolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78:2120-2124.

Levine, R. 1983. Oxidative modification of Glutamine Synthetase I. Inactivation is due to loss of one histidine residue. J. Biol. Chem. 258:11823-11827.

Levine, R. L., 1983. Oxidative modification of Glutamine Synthetase II. Characterization of the ascorbate model system. J. Biol. Chem. 258: 11828-11833.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 2193: 265-275.

Marzluf, G.A. 1981. Regulation of Nitrogen metabolism and gene expression in fungi. Microbiol. Rev. 45: 437-461.

McCord, J.M., B.B. Keele and I. Fridovich. 1971. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68:1024-1027.

Meister, A. 1983. Selective modification of Glutathion Metabolism. Science 220:472-477.

Mora, J., J. Calderón and G. Hernandez. 1988. Search, assimilation and turnover of nitrogen in some fungi. in: Nitrogen Source Control of Microbial Processes, CRC Press Inc.

Mora, Y., O. Chávez, and J. Mora. 1980. Regulation of Neurospora crassa Glutamine Synthetase by Carbon and Nitrogen Source. J. Gen. Microbiol. 118:455-463.

O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250: 4007-4021.

Offerman, M.K., M.J. McKay, M.W. Marsh and J.S. Bond. 1984. Glutathione disulfide inactivates, destabilizes and enhances proteolytic susceptibility of Fructose-1,6-Biphosphate aldolase. J. Biol. Chem. 259:8886-8891.

Palacios, R., M. Campomanes, and C. Quinto. 1977. Neurospora crassa Glutamine Synthetase. Translation of specific messenger ribonucleic acid in a cell free system derived from rabbit reticulocytes. J. Biol. Chem. 252:3028-3034.

Penefsky, H.S. 1977. J. Biol. Chem. 252: 2891-2899.

Ruppen, M.E. and R.L. Switzer. 1983. Degradation of Bacillus subtilis Glutamine-Phosphorybosyl-Amido-Transferase in vivo. J. Biol. Chem. 258:2843-2851.

Rivett, A. J., J. E. Roseman, C. N. Oliver, R. L. Levine and E. R. Stadtman. 1985. Covalent modification of proteins by mixed function oxidation: Recognition by intracellular proteases. In Intracellular Protein Catabolism. pp 317-328. Alan R. Liss, Inc.

Sánchez, F., E. Calva, M. Campomanes, L. Blanco, J. Guzmán, J. L. Saborio, and R. Palacios. 1980. Heterogeneity of Glutamine Synthetase polipeptides in Neurospora crassa. J. Biol. Chem. 255: 2231-2234.

Slater, F. T. 1984. Free-radical mechanisms in tissue injury. Biochem. J. 222: 1-15.

Starke, P., C.N. Oliver and E.R. Stadtman. 1987. Modification of hepatic proteins in rats exposed to high oxygen concentration. FASEB J. 1:36-39.

Taborsky, G. 1973. Oxidative modification of proteins in the presence of ferrous ion and air. effect of ionic constituents of the reaction medium on the nature of the oxidation products. Biochemistry 14:5294-5299.

Turian, G. and D.E. Bianchi. 1972. Conidiation in Neurospora. Botanical Reviews, 38:119-154.

Turnbough, Ch. L. and R.L. Switzer. 1975. Oxygen dependent inactivation of Glutamine-Phosphorybosyl-Amido-Transferase in stationary-phase cultures of Bacillus subtilis. J. Bact. 121:108-120.



Udvary, J., G. Borbély, A. Juhász and J. L. Parkas. 1984. FeIII chelates mediate the oxidative modulation of cyanobacterial and chloroplast enzymes. FEBS. Lett. 172:11-16.

Vichido, I., Y. Mora, C. Quinto, R. Palacios and J. Mora. 1978. Nitrogen regulation of Glutamine Synthetase in Neurospora crassa. J. Gen. Microbiol. 106:251-259.

Vogel, H. J. 1964. Distribution of lysine pathway among fungi: Evolutionary implications. Am. Nat. 98: 435-446.

West, D.J., R.W. Tuveson, R.W. Barrat and J.R.S. Fincham. 1967. Allosteric effects in NADPH-Glutamate Dehydrogenase from Neurospora crassa. J. Biol. Chem. 242:2134-2138.

Ziegler, D. M. 1985. Role of reversible oxidation-reduction of enzyme Thiols-Disulfides in metabolic regulation. Ann. Rev. Biochem. 54:305-329.