



L
24º

UNIDAD ACADÉMICA DE CICLOS PROFESIONALES
Y DE POSGRADO

Caracterización Bioquímica y
Fisiológica de la Actividad de
GOGAT en " Saccharomyces
cerevisiae "

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

Licenciatura en Investigación Biomédica
Básica

P R E S E N T A :

ANAID ANTARAMIAN SALAS

México D. F.

1983

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.

CARACTERIZACION BIOQUIMICA Y FISIOLÓGICA DE LA ACTIVIDAD DE
GOGAT EN SACCHAROMYCES CEREVISIAE.

-Introducción:

- Enzimas participantes en la asimilación del amonio: características y ejemplos.
- Asimilación del amonio en diferentes organismos.

-Planteamiento del trabajo:

-Artículo:

Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with impaired
Glutamate Synthase activity.

-Resultados adicionales.

-Discusión

-Conclusiones.

-Bibliografía.

INTRODUCCION:

Todos los organismos vivos se componen básicamente de cadenas de átomos de carbono, lineales o cíclicas, y de cuatro grupos químicos diferentes, que son combinaciones simples de C, H, O y N. Estos grupos son: metilo (-CH₃), hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH) y amino (-NH₂). La combinación de estos grupos forma cuatro grandes familias de moléculas orgánicas: azúcares, ácidos grasos, aminoácidos y nucleótidos, compuestos que a su vez forman las grandes macromoléculas presentes en todas las células: carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (DNA y RNA).

El nitrógeno, aunque existe en grandes cantidades en la atmósfera en forma gaseosa (N₂), es químicamente inerte y no puede ser utilizado por la mayoría de los organismos, que lo deben obtener en forma combinada, ya sea como amonio (NH₄⁺), o a partir de compuestos más complejos como los aminoácidos. Las plantas obtienen la mayor parte de su nitrógeno en forma de nitratos que absorben de la tierra y lo reducen para formar amonio, aminoácidos y otros productos, los cuales son utilizados luego por los animales y regresan a la tierra en su forma reducida. Los microorganismos de la tierra son capaces de reoxidar el NH₃ a nitritos y nitratos que las plantas pueden utilizar nuevamente (Fig. 1). Estos procesos constituyen el ciclo del nitrógeno.

Por otro lado, se encuentran las bacterias fijadoras de nitrógeno que pueden reducir el N₂ de la atmósfera y transformarlo en el nitrógeno combinado de la tierra. Dentro de esta clase de bacterias están las del género *Rhizobium*, que además de ser capaces de fijar nitrógeno, pueden formar simbiosis con plantas, específicas para cada especie. En esta simbiosis la bacteria recibe el carbono fijado por la fotosíntesis de la planta y a cambio provee a la planta de nitrógeno fijado (Fig 1). El espacio en la tierra donde se encuentran las distintas especies de *Rhizobium*, se denomina rizósfera, y es parte integral del ciclo del nitrógeno.

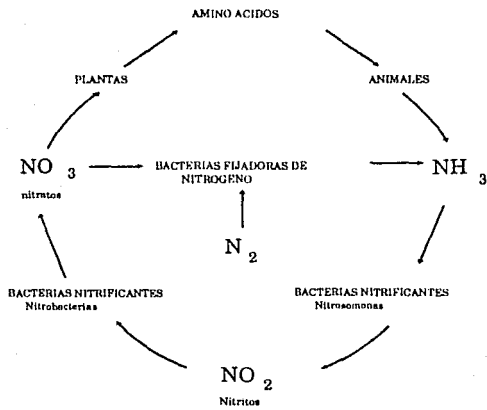


Figura 1: Ciclo del Nitrógeno

Todos los organismos se ven afectados por el medio ambiente que los rodea, y en éste pueden variar los tipos de fuentes de carbono o de nitrógeno a los que tienen acceso. Dependiendo de estas fuentes se activan diversas rutas metabólicas; por ejemplo, si la fuente de carbono presente es la glucosa, todas las enzimas que participan en la glucólisis se encuentran activadas en el citoplasma. En la glucólisis, una molécula de glucosa se transforma en dos

moléculas de piruvato, y a partir de ello, dos moléculas de ADP y dos de fosfato inorgánico, se convierten en dos de ATP. En los organismos aeróbicos, la glucólisis es el prelude del ciclo de Krebs y de la cadena de transporte de electrones, de tal manera que en estos procesos se aprovecha al máximo la energía que contiene la glucosa. En las células eucariotes, en condiciones aeróbicas, el piruvato es transportado al interior de las mitocondrias, donde se convierte en Acetil Co A y es oxidado hasta CO_2 y H_2O . Cuando el oxígeno es insuficiente, el piruvato se reduce hasta lactato por la lactato deshidrogenasa. Los niveles de piruvato y ATP varían según la fuente de carbono, y afectan directamente las concentraciones relativas de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico que se lleva a cabo dentro de las mitocondrias. Por otro lado, si la fuente de carbono es etanol, éste se utiliza por la ruta metabólica de la alcohol deshidrogenasa. A partir de una molécula de etanol se obtiene una molécula de acetaldehído y luego éste se transforma en acetato y en acetilCoA, que alimenta al ciclo de Krebs (fig. 2). Sin embargo, el rendimiento neto de ATP y electrones resulta menor que cuando la fuente de carbono es glucosa. En general, dependiendo de la fuente de carbono a la que tenga acceso un organismo se modifican muchísimo los metabolitos de la célula.

El 2-oxoglutarato se forma originalmente a partir de la condensación de acetil coenzima A y oxalacetato, que se transforman en citrato, y luego en isocitrato y cetoglutarato. Este, al aminorarse con amonio, por acción de la glutamato deshidrogenasa, utilizando NADH o NADPH como cofactor, da lugar al ácido glutámico. Las pozas de 2-oxoglutarato varían según la fuente de carbono a la que tenga acceso el organismo, y éste es uno de los factores que afecta directamente la asimilación de amonio : cuando hay un exceso de glucosa, la asimilación de amonio aumenta junto con el 2-oxoglutarato. Si la fuente de carbono no es abundante, o es etanol, la asimilación de amonio disminuye, porque en este caso, en gran parte debido a su más lenta utilización, las pozas de piruvato y ATP son menores, y por lo tanto, también la poza de 2-oxoglutarato. Es a nivel de esta molécula donde convergen el metabolismo del nitrógeno y el metabolismo de carbono.

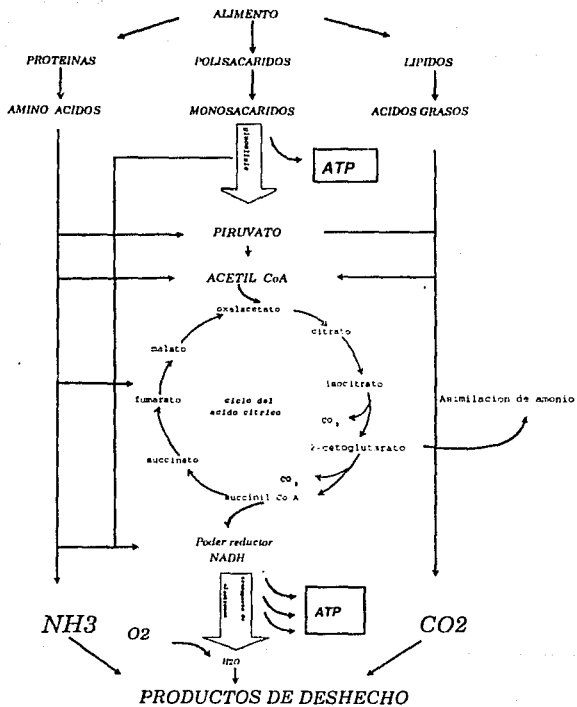
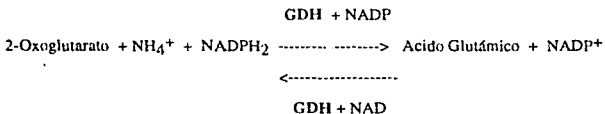


Figura 2: Metabolismo General.

LAS ENZIMAS QUE PARTICIPAN EN LA ASIMILACION DE AMONIO, CARACTERISTICAS Y EJEMPLOS:

Nosotros estamos interesados en las diferentes rutas de asimilación de amonio en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, así como en las condiciones en se presentan y en su regulación. A continuación se presentan las diferentes vías de asimilación de amonio que han sido descritas, las enzimas que participan y sus características, así como ejemplos de las mismas.

En varios organismos unicelulares procariotes y eucariotes sencillos como: *Escherichia coli*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida*, el amonio es asimilado principalmente a través de la deshidrogenasa glutámica. Esta enzima cataliza la aminación reductiva del 2-oxoglutarato por NH_3 de manera reversible, ya sea utilizando NADPH o NADH.



La K_m de esta enzima es de 1 mM, tanto para el 2-oxoglutarato como para el amonio, lo que sugiere que no funciona cuando la concentración de amonio es baja.

En algunos microorganismos, la GDH dependiente de NAD^+ parece tener una función catabólica, (***)Por qué? Hay distintas constantes de equilibrio o valores de las KM 's?) mientras que las enzimas que utilizan NADPH sintetizan glutamato principalmente. Por su parte, las bacterias entéricas solo tienen GDH dependiente de NADPH. Las mutantes que no tienen GDH no poseen un fenotipo característico, no necesitan glutamato para crecer y crecen como la cepa silvestre en concentraciones altas y bajas de amonio, así como en otras fuentes de nitrógeno.

En *S. typhimurium* aunque la GDH no es reprimida en presencia de glutamato, su alta K_m

por el 2-oxoglutarato sugiere que solo actúa en la biosíntesis del glutamato.(ref)

El ácido glutámico, en presencia de amonio y ATP es convertido a glutamina, en la reacción catalizada por la glutamino sintetasa (GS). La glutamina dona su nitrógeno en la síntesis de aminoácidos, purinas, pirimidinas, glucosamina-6-P y ácido p-aminobenzoico (Fig 3), por lo que la glutamino sintetasa se considera una enzima clave en el control metabólico (Shapiro y Stadtman, 1970).

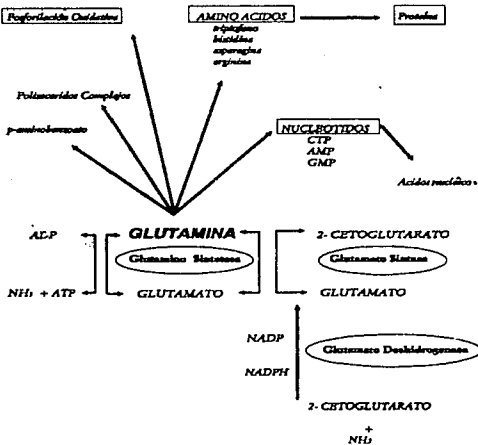
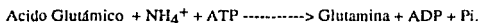


Figura 3: Metabolismo de la glutamina

La glutamino sintetasa (GS) es una enzima ampliamente distribuida en microorganismos, tejidos animales y plantas superiores. En el cerebro, hígado y ciertos microorganismos, las glutamino sintetetas están compuestas por ocho subunidades iguales en forma de cubo, mientras que la de *E. coli* es dodecamérica; el peso molecular de las subunidades varía entre 44,000 y 50,000 Da. La composición de aminoácidos y la estructura de sus subunidades también varía en los diferentes organismos (Meister, 1970).

GS



En estudios realizados en *E. coli* y otras bacterias gram-negativas, se ha encontrado que los niveles de GS y su actividad catalítica están sujetos a un control riguroso y muy complejo; además de la inhibición por retroalimentación de diversos productos del metabolismo de la glutamina y la modulación por iones metálicos divalentes, las bacterias gram-negativas han desarrollado una regulación en la actividad de GS en cascada formada por dos ciclos enzimáticos que se encuentran estrechamente relacionados: adenilación-desadenilación y uridilación-desuridilación (Shapiro y Stadtman, 1970).

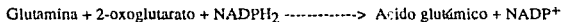
Como podemos ver, existen dos enzimas centrales, capaces de asimilar amonio: la GDH-NADP y la GS.

En 1970, Tempest y cols. reportaron la existencia de una ruta alternativa para la síntesis de glutamina al tratar de explicar por qué un cultivo de *Klebsiella aerogenes* limitado en nitrógeno es capaz de crecer en un medio con glucosa, amonio y sales minerales, cuando en estas condiciones las células carecen de actividad de GDH, y la actividad de la GS está aumentada. Por otro lado, la incubación de extractos libres de células en presencia de glutamina, 2-oxoglutarato y NADPH, induce a una considerable síntesis de glutamato. Tempest y cols. concluyeron que en cultivos de *K. aerogenes* en estas condiciones, la síntesis de glutamato procedía mediante la glutamino sintetasa y una nueva enzima que se denominó "Glutamina (amido): 2-oxoglutarato amino transferasa oxido reductasa (NADP)" o glutamato sintasa

(GOGAT).

Las mutantes de *E. coli*, *K. aerogenes* y *S. typhimurium* que no tienen actividad de GDH no requieren glutamato para crecer, lo que indica que existe una ruta alternativa para la síntesis de glutamato. Las mutantes *glr B* (lesión en el gene de la glutamato sintasa) derivadas de las mutantes *gdh* sí son auxótrofas de glutamato, mientras que cepas que sólo carecen de la GDH son capaces de crecer en un medio mínimo de glucosa con grandes concentraciones de amonio. Estas evidencias también indican que las bacterias entéricas tienen dos vías para sintetizar glutamato a partir de amonio, la vía GDH-GS y la vía GS-GOGAT.

GOGAT



Hasta el momento en que Tempest y cols. (1972) describieron esta nueva ruta, no se sabía como algunas bacterias que carecían de GDH podían asimilar amonio y sintetizar glutamato como eran: *Erwinia carotorova*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* (Tyler 1978). Meer y Tempest encontraron y caracterizaron actividad de GOGAT en todas estas bacterias.

Tempest y sus colaboradores encontraron un máximo de actividad de la GOGAT, bien definido a pH 7.5-8, una K_m aparente entre 0.1-2 mM para el 2-oxoglutarato y entre 0.2-1.8 mM para la glutamina. El Na^+ y el K^+ no inhiben la actividad, mientras que el Mg^{++} sí la inhibe. Esta enzima tiene una alta especificidad por sus substratos, ya que compuestos como el piruvato, oxalacetato, 2-oxobutirato y 2-oxoisovalerato no substituyen al 2-oxoglutarato; Tampoco la glutamina puede ser substituida por asparagina, citrulina, arginina o urea.

A partir del trabajo de Tempest y cols. (1970), la GOGAT se estudió en diversos organismos procariotes y eucariotes, al igual que en plantas superiores, donde el papel de la GDH no estaba claro. Uno de los aspectos más interesantes en el estudio de la GOGAT ha sido definir el papel fisiológico y la regulación coordinada entre esta enzima y la GDH-NADP.

En bacterias como *Klebsiella pneumoniae* (Nagatani et al. 1971), *Enterobacter aerogenes* y *Pseudomonas fluorescens* (Meers et al., 1970) la vía GDH-GS predomina en altas concentraciones de NH_4^+ , mientras que en bajas concentraciones de NH_4^+ funciona la vía GS-GOGAT; sin embargo, en *Azospirillum brasilense* las mutantes con baja actividad de GOGAT son capaces de crecer en NH_4^+ pero no en N_2 , NO_3^- , o formas orgánicas de nitrógeno, incluyendo el glutamato.

Poco se conoce sobre la regulación de la GOGAT; en limitación de amonio, Meers y Tempest (1970) encontraron en *K. aerogenes* altos niveles de GOGAT, a diferencia de cuando había un exceso del mismo. Magasanik (1973), sin embargo, encontró que en una cepa diferente de *K. aerogenes* los niveles de GOGAT son menores en concentraciones limitadas de amonio o glutamina que cuando las células se crecen en exceso de estos compuestos.

Los cultivos de *K. pneumoniae* en medio mínimo, en exceso o limitación de amonio, tienen los mismos niveles de GOGAT, y cuando se crece *K. aerogenes* o *E. coli* en medio mínimo con glutamato como única fuente de nitrógeno, los niveles de GOGAT son bajos (Tempest y cols. 1970).

En un estudio extenso realizado por Branchley y cols. (1975), en *S. typhimurium* se encontraron altos niveles de GOGAT en células silvestres crecidas en medio mínimo con exceso de amonio, independientemente de la presencia de glutamato o glutamina. Sin embargo, cuando el medio se suplementa con aspartato o una combinación de aminoácidos que inhiben la actividad de GS, los niveles de GOGAT bajan. Cuando las concentraciones de glutamato o glutamina son limitadas, y cuando las células se crecen en glutamato como única fuente de nitrógeno, la actividad de GOGAT también es muy baja. Estas observaciones se pueden explicar con un modelo en el que un exceso en las pozas de glutamato, el producto final de la GOGAT, o muy bajos niveles de glutamina o amonio, reprimen la síntesis de la enzima. Este modelo concuerda con los datos en *S. typhimurium* y *E. coli* de que el glutamato se transporta lentamente a la célula; en este caso las pozas de glutamato son altas cuando el medio es completo o cuando el medio mínimo se suplementa con aspartato, pues el aspartato se transporta y se metaboliza

rápidamente en glutamato.

La síntesis de la GOGAT está regulada, pero no se sabe cómo, ni si la regulación esta relacionada a los elementos de control de la GS.

El sistema GS-GOGAT constituye una ruta alternativa a la vía GDH-GS en la asimilación de amonio. Se ha visto que la vía GDH-GS funciona en carbono limitado y alto amonio, mientras que la vía GS-GOGAT funciona en amonio limitado (Tempest et al 1970).

LA ASIMILACION DE AMONIO EN DIFERENTES ORGANISMOS:

En la literatura podemos encontrar muchos ejemplos de las diversas vías metabólicas que pueden utilizar diferentes organismos según la cantidad disponible de nitrógeno.

Eschericia coli y *Klebsiella aerogenes* :

La GDH-NADP dependiente de *E. coli* , está constituida por seis cadenas polipeptídicas idénticas con un peso molecular de 50,000 (Sakamoto y cols.,1975). La GS de esta bacteria puede existir en dos formas catalíticamente interconvertibles, cada una de sus doce subunidades puede ser adenilada. La adenilación disminuye su actividad y la hace sensible a la regulación alostérica por productos finales (Shapiro y cols.1968, Hening y Ginsburg,1971).

La GOGAT ha sido purificada en *E. coli* (Miller y Stadtman 1972) y en *K. aerogenes* (Meister, 1974). En ambos casos es una flavoproteína hierro-azufrada, formada por dos subunidades de diferente tamaño, la subunidad pequeña tiene un peso molecular similar en ambas especies (53,000) y la subunidad grande tiene un peso molecular de 175,000 en *K. aerogenes* y de 135,000 en *E. coli*.

La composición intracelular de la GOGAT no es clara, Stadtman (1972) reporta un peso molecular de 800,000 en *E. coli* lo que indica una asociación de 4 dímeros, mientras que Meister(1974) reporta actividad en un solo dímero en *K. aerogenes*.

En *K. aerogenes* se encontró que el sitio de unión de la glutamina está en la subunidad más grande, mientras que el amonio se asocia a la subunidad pequeña.

Los genes estructurales de la subunidad grande y pequeña han sido denominados *gliB* y *gliD*

respectivamente (Garcíarrubio y cols., 1983). Estos genes fueron clonados por Lozoya y cols.(1983). Las mutaciones en el gene *glbB* afectan la biosíntesis de GOGAT y confieren fenotipo *Ntr⁻*: es decir, estas mutantes son incapaces de utilizar arginina o prolina como fuente de nitrógeno (Pahel y cols.,1978). Brenchley y cols., (1973) reportan que estas mutantes también son incapaces de desreprimir a la GS en limitación de amonio.Por otro lado, se ha encontrado que algunas mutantes alteradas en el gene *glbB* no pueden activar el transporte de metilamonio (Servín-González y Bastarrachea, 1984).

En 1988, Castaño y cols. establecieron la existencia del operón *glbBDF*; este operón comprende los genes que codifican para cada una de las dos subunidades y un tercer gene, cuyo producto parece estar involucrado en la regulación del operón *Ntr*. Los resultados de estos autores indican que el fenotipo pleiotrópico presentado por mutaciones en *glbB*, se debe a un efecto polar sobre *glbF*.

En *E. coli*, Miller y Stadman (1972) no encuentran cambios en la actividad de GOGAT, en limitación de amonio pero pueden ver como los niveles de GS desadenilada aumentan, mientras que en exceso de amonio, la GS se reprime y adenila; sin embargo en otras bacterias como *K. aerogenes*, entre otras (Tempest y cols.,1970) la actividad de GOGAT aumenta en limitación de amonio. En el estudio fisiológico realizado en *E. coli* por Senior (1975), la vía de asimilación de amonio es la GDH-NADP, aún en cultivos limitados de amonio. Como se puede apreciar no está claro cual sería el papel fisiológico de la vía GS-GOGAT.

Bacillus subtilis:

En esta bacteria, la GS juega un papel muy importante en la asimilación de amonio, ya que en ella no se ha detectado actividad de GDH biosintética (Freese y cols.,1964); la GS no se regula por adenilación-desadenilación, sino por la fuente de nitrógeno, y está sujeta a inhibición por glutamina y por productos finales del catabolismo de este aminoácido (Deuel y Prusiner,1974). En este organismo la vía de asimilación de amonio es la GS-GOGAT y mutantes

alteradas en GOGAT son auxótrofas de glutámico (Dean y Aronson,1980). La actividad de GOGAT se reprime en presencia de glutamato y se desreprime en amonio o nitrato (Fui Lin Pan y Coote,1979). La GOGAT de *B.subtilis* está compuesta por dos subunidades, codificadas por los genes *gltA* y *gltB* (Desphande y Kane,1980); estos dos genes han sido clonados (Bohannon y cols.,1985). Se ha podido estudiar que la regulación de la GOGAT determinada por las fuentes de nitrógeno es a nivel de transcripción del ADN.

Neurospora crassa:

Este es uno de los microorganismos eucariotes donde mejor se ha estudiado la asimilación de amonio. La deshidrogenasa glutámica de *Neurospora crassa* está compuesta por seis monómeros iguales, de 452 aminoácidos cada uno (Wootton y cols.,1974). La actividad de esta enzima es mayor cuando se cultiva el hongo en amonio o nitrato como fuentes de nitrógeno, y disminuye cuando las fuentes de nitrógeno son ácido glutámico o glutamina; esto se regula a nivel de la síntesis de proteínas (Hernández y cols., 1983). Este hongo posee una glutamino sintetasa compuesta por dos monómeros diferentes (α y β), que poseen una movilidad electrofórtica diferente (Sánchez y cols.,1980). Los monómeros α y β constituyen diferentes enzimas con formas tetramérica y octamérica, respectivamente (Dávila y cols., 1980).

La glutamato sintasa de *N. crassa* ha sido purificada, y se compone de un solo monómero de 200,000 D (Hummelt y Mora,1980). El gene estructural fue identificado en 1986 por Romero y Dávila. Mora y cols. reportaron en 1987 que esta enzima se regula negativamente por algunos cetoácidos.

La actividad de GDH-NADP en *N. crassa* es similar en limitación o en exceso de amonio, y la actividad de GOGAT no aumenta en limitación de amonio (Lomnitz y cols.,1987). Aunque se ha reportado que la GS tiene una mayor afinidad por amonio que la GDH-NADP (Wootton,1983), Lomnitz y cols. concluyen que esta última tiene una mayor capacidad de asimilar amonio. Los resultados obtenidos por Lomnitz y cols. (1987) y Calderón y Mora (1985), les han permitido proponer que la función principal de GOGAT en *N. crassa* es la de

reciclar parte del nitrógeno orgánico de glutamina a glutamato, tanto en limitación como en exceso de amonio. Sin embargo, estos autores señalan que esta función cobra importancia en la limitación de amonio, ya que en esta condición, la GS, debido a su alta afinidad por amonio, podría agotar la poza de ácido glutámico. El papel de la GOGAT sería reciclar la glutamina hacia ácido glutámico, manteniendo un cociente glutamina/glutamato adecuado. La propuesta de estos autores resulta importante, pues es la primera vez que se le adjudica un papel diferente a la GOGAT que el de síntesis de ácido glutámico en limitación de amonio.

Plantas:

En 1974, Lea y Mislin presentaron por primera vez evidencia de la existencia de GOGAT en cloroplastos de *Pisum Sativum*. Hasta entonces se sabía que en plantas superiores la actividad de GDH era baja, y su afinidad por amonio muy alta, mientras que la afinidad de GS por amonio era menor, lo que sugería que esta enzima era la encargada de asimilar amonio, pero tenía que existir además una enzima que transfiriera el grupo amido de la glutamina al grupo amino de glutamato. Una diferencia importante que encontraron estos autores en la GOGAT de cloroplastos fue que utilizaba ferredosina (Fd) como reductor en vez de NADH como en otras GOGATs.

A partir del trabajo de Lea y Mislin (1974) se empezó la caracterización de las GOGATs en plantas superiores. En estos organismos se han descrito dos actividades diferentes de GOGAT; cada una requiere un donador de electrones específico; una utiliza ferredoxina (Fd) como reductor y la otra utiliza NAD(P)H (Suzuki y Gadal, 1984). Además de su especificidad por el reductor, estas dos enzimas difieren en peso molecular, cinética y antigenicidad indicando que son dos proteínas estructuralmente diferentes (Suzuki y Gadal, 1984).

En la mayoría de las plantas, la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT) son las enzimas claves en la asimilación de amonio, derivado ya sea de fuentes del nitrógeno del medio o del metabolismo interno de nitrógeno, como el catabolismo de aminoácidos o de la fotorrespiración.

Algunos estudios realizados en leguminosas indican que estas plantas poseen varias isoformas de la GS. En frijol existen dos isoformas que se encuentran tanto en hoja como en raíz. Por otro lado, en la hoja existen a su vez varios polipéptidos de GS específicos de este tejido; además, se ha reportado una tercera isoforma en los nódulos (Lara y cols.,1985).

La GOGAT-Fd es abundante en los tejidos verdes (Match y Takahashi, 1982; Wallsgrove y cols.,1982; Botella y cols.,1988). En mutantes de *Arabidopsis thaliana* alteradas en la fotorrespiración se ha demostrado que la GOGAT de la hoja es esencial para la reasimilación de amonio proveniente de este proceso en hojas verdes (Somerville y Ogren,1980; Kendall y cols., 1986). Por otro lado, el grupo de Osmond y colaboradores (1982), usando N¹⁵, siguiendo la marca incorporada a ácido glutámico y glutamina demostraron que la vía GS-GOGAT-Fd está involucrada en la reasimilación de amonio durante la fotorrespiración. Este mismo grupo propuso que este proceso se da en los cloroplastos donde se localiza la GOGAT-Fd.

Esta enzima también se encuentra en tejidos de raíz de fotosintéticos, como la raíz (Suzuki y cols.,1982) y nódulos (Suzuki y cols.,1984a) aunque todavía no se comprende su importancia fisiológica.

La GOGAT-Fd de hojas verdes es una proteína monomérica de 160-140 KDa, y contiene un grupo Fe-S y flavinas (FAD y FMN) (Hirasawa y Tamura,1984; Marquéz y cols., 1988).

La GOGAT-NADH se ha reportado en raíz de maíz (Suzuki y cols,1984b), brotes (Match y cols., 1980; Suzuki y Gadal, 1982) y nódulos (Groat y Vance, 1980; Chen y Cullimore, 1988). Parece ser una flavoproteína Fe-S compuesta por un solo polipéptido de 200-240 KDa. La GOGAT-NADH se induce en nódulos de leguminosas paralelamente a la nitrogenasa y a la leghemoglobina, por lo que se piensa su papel sea la asimilación de nitrógeno al comenzar la fijación de nitrógeno por los bacteroides.

En nódulos de raíz de alfalfa, Anderson y Miller (1989) purificaron a la GOGAT-NADH para producir anticuerpos policlonales; estos autores reportan un protocolo de purificación donde la actividad específica se incrementa 208 veces; la enzima que purifican es un monómero de muy alto peso molecular: 200 ± 7 Kd, con un punto isoeléctrico de 6.6, una Km de $466 \mu\text{M}$ para la

glutamina, de $33\mu\text{M}$ para el 2-oxoglutarato y de $4.2\mu\text{M}$ para el NADH. El anticuerpo que obtuvieron tiene reacción cruzada con extractos de chícharo, clavo, trébol, soya y frijol, con una banda de peso molecular similar.

En hojas de tomate se ha logrado separar por cromatografía de intercambio iónico dos formas de glutamato sintasa, una dependiente de NAD(P)H y otra dependiente de Fd, la GOGAT que es NAD(P)H tiene valores de K_m de 0.5mM , 0.3mM y $1.7\mu\text{M}$ para la glutamina, el 2-oxoglutarato y el NADH, respectivamente, mientras que la enzima dependiente de Fd tiene valores de K_m de 0.5mM , 0.2mM y $0.2\mu\text{M}$ para la glutamina, el 2-oxoglutarato y el Fd, respectivamente. La mayor diferencia se encuentra en las afinidades por sus respectivos donadores de electrones que es 8 veces menor para el Fd que para el NAD(P)H. (Avila y cols., 1984).

Cullimore y cols. (1988) han reportado la existencia de dos actividades de GOGAT-NADH dependientes de *rhizobia* en los nódulos de frijol. Una parece ser específica de la raíz y la otra de nódulo, se induce al comenzar la fijación de nitrógeno. Es posible separar estas dos enzimas por cromatografía de intercambio iónico y las constantes de afinidad por sus substratos son diferentes.

En estudios realizados por Chiu y cols. (1979) con células de soya en cultivo, variando la concentración de diferentes fuentes de nitrógeno, las actividades de las enzimas GS y GOGAT-NADH aumentan según el crecimiento: en condiciones donde el crecimiento es pobre se obtiene menor cantidad de enzima y cuando el crecimiento es bueno se obtiene mayor cantidad de enzima. Además, esta enzima está regulada por la fuente de nitrógeno, mientras que la actividad de la GDH no se ve afectada. (Chiu y cols., 1979).

La expresión de las dos GOGAT se ve influenciada por factores ambientales como la luz y las fuentes de nitrógeno (Watanabe y cols., 1985; Hecht y cols., 1988). En brotes jóvenes y tallos etiolados de maíz, la actividad de GOGAT-Fd es baja y va incrementando conforme la planta va creciendo y poniéndose verde, mientras que la actividad de GOGAT-NADH no cambia o por el contrario, decrece en las hojas verdes maduras.

La GOGAT-NADH de nódulos de leguminosas tiene una alta especificidad por sus sustratos, especialmente por el 2-oxoglutarato; otros ácidos como el succínico y el oxalacetato inhiben competitivamente su actividad (Boland y Court, 1981) y también es susceptible a la inhibición competitiva por NAD (Boland y Benny, 1977). El significado biológico de estas inhibiciones no ha sido estudiado.

La coexistencia de la GOGAT-Fd y la GOGAT-NADH es un fenómeno común en las plantas superiores, probablemente debido a las diferentes funciones fisiológicas de cada una, y a que la expresión de estas dos enzimas parece estar bajo un control regulatorio diferente.

El estudio de la expresión de la GOGAT-Fd se ha facilitado gracias a la clonación y caracterización del cDNA que codifica para esta enzima en maíz (Sakakibara y cols., 1990). El cDNA codifica para 1616 aminoácidos; comparte el 42 % de aminoácidos idénticos con la subunidad grande de *E. coli*, y también comparte homología con el flavocitocromo b2 de levadura. Estos autores pudieron confirmar los resultados anteriores de que en hojas verdes había mayor actividad de la enzima, pues con el análisis de mRNA encuentran 8 veces más en hojas verdes que en hojas etioladas.

Saccharomyces cerevisiae:

Este hongo posee una GDH-NADP dependiente; su gene estructural se ha denominado *GDHI*; las mutantes de este gene tienen un tiempo de duplicación una hora mayor que la cepa silvestre (Drillien y Lacroute, 1972), y crecen utilizando la vía GS-GOGAT (Folch, 1986).

La actividad de GDH aumenta cuando se cultiva la levadura en amonio como fuente de nitrógeno y disminuye en presencia de ácido glutámico (Roon y Even, 1973).

Cuando se priva de glucosa a la levadura, la actividad de GDH disminuye (Mazon y cols., 1978), debido a la degradación de la enzima. Por otro lado, la GDH-NADP no se induce en mutantes que presentan una alteración en la aconitasa, y por lo tanto no sintetizan 2-oxoglutarato (González y cols., 1985); esto sugiere que el 2-oxoglutarato o algún intermediario

del ciclo de Krebs, son moduladores positivos de la actividad de la enzima (González y cols.,1985). La actividad de la GDH también disminuye cuando la concentración intracelular de amonio aumenta, posiblemente debido a una represión de la síntesis de la enzima (Bogoñez y cols., 1985). Esta disminución podría interpretarse como un mecanismo para impedir que la poza de 2-oxoglutarato se agote.

La GS de *S. cerevisiae*, está compuesta de 10-12 monómeros de un peso molecular de 43,000 (Mitchell y Magasanik, 1983). El gene estructural de esta enzima fué clonado por González y cols. en 1984. La GS está regulada por las fuentes de nitrógeno (Dubois y Grenan,1974) y la inducción de esta enzima corresponde a una síntesis de novo (Mitchell y Magasanik, 1983). Por otro lado, la actividad está regulada por un sistema de inactivación irreversible, posiblemente proteolítico (Mitchell y Magasanik, 1984):

Existen tres sistemas regulatorios de la GS en *S. cerevisiae*; el primero depende del producto de *Gln 3* , y corresponde a los niveles de glutamina; el segundo mediado por el *GCN4* es el control general de los aminoácidos, que acopla la desrepresión de varias enzimas biosintéticas a la privación de aminoácidos, y el tercero responde a la limitación de purinas (Mitchell y Magasanik, 1984).

En *S. cerevisiae* se ha reportado la existencia de la actividad de GOGAT (Roon y cols.,1974). Esta enzima ha sido purificada a homogeneidad y se ha encontrado que está formada por dos subunidades, con pesos moleculares de 169,000 y 61.000 (Roon y cols.,1974; Masters y Meister,1982).

En *S. cerevisiae*, la GOGAT ha sido poco estudiada, y su actividad no parece variar al modificar las condiciones de cultivo (Roon y cols.,1982).

Los resultados de segregación encontrados por J.L. Folch (ver artículo anexo) al tratar de aislar una mutante de GOGAT con una cepa que era GDH⁻, indicaban la necesidad de dos mutaciones para obtener una auxotrofia de ácido glutámico. Lo que nos encaminó a tratar de diferenciar bioquímicamente dos actividades diferentes de GOGAT, como se puede ver en el artículo encontramos dos pH óptimos diferentes por lo que a continuación quisimos tratar de

definir el papel fisiológico de la GOGAT en *S. cerevisiae* midiendo las dos actividades tanto en limitación de amonio como en diferentes fuentes de carbono como etanol y acetato, diferentes condiciones de aereación: microaerofilia y superagitación y medir la sensibilidad a diferentes posibles inhibidores.

MATERIALES Y METODOS:

Los materiales y métodos son los mismos descritos en el trabajo publicado variando únicamente las fuentes de carbono, siempre a una concentración final de 2%.

Isolation and Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* Mutant with Impaired Glutamate Synthase Activity

JORGE-LUIS FOLCH,¹ ANAID ANTARAMIAN,¹ LAURA RODRIGUEZ,¹ ALJANDRA BRAVO,¹
AURORA BRUNNER,² AND ALICIA GONZALEZ^{1*}

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos,¹ and Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70-600, Mexico City,² Mexico

Received 25 October 1988/Accepted 4 September 1989

A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* that lacks glutamate synthase (GOGAT) activity has been isolated. This mutant was obtained after chemical mutagenesis of a NADP⁺-glutamate dehydrogenase-less mutant strain. The *gdh* gene mutant is a glutamate auxotroph. The genetic analysis of the *gdh* mutant shows that the GOGAT-less phenotype is due to the presence of two loosely linked mutations. Evidence is presented which suggests the possibility that *S. cerevisiae* has two GOGAT activities, designate GOGAT A and GOGAT B. These activities can be distinguished by their pH optima and by their regulation by glutamate. Furthermore, one of the mutations responsible for the GOGAT-less phenotype affected GOGAT A activity, while the other mutation affected GOGAT B activity.

Glutamate biosynthesis can be achieved through the reductive amination of 2-oxoglutarate catalyzed by NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase (NADP⁺-GDH) (2). In 1970, Tempest et al. (24) demonstrated the existence of an alternative pathway for glutamate biosynthesis in *Klebsiella aerogenes*. This pathway comprised glutamate synthase (GOGAT) and glutamine synthetase. The function of this pathway has been demonstrated in several microorganisms (3, 12, 23) and in higher plants (18). Physiological studies indicate that the main role of the glutamine synthetase-GOGAT pathway is in ammonium assimilation and glutamate biosynthesis under ammonium-limited conditions (23). In *Neurospora crassa*, GOGAT also appears to play an important role in glutamine degradation (4). *N. crassa* (21), *Salmonella typhimurium* (16), and *Escherichia coli* (5, 19) mutants lacking GOGAT activity have been obtained, and their characterization has contributed to the understanding of the role of GOGAT in glutamate biosynthesis.

Although GOGAT activity has been previously detected in *Saccharomyces cerevisiae* (22), the role of GOGAT in glutamate biosynthesis, and its regulation are poorly understood. Mutants altered in NADP⁺-GDH have been isolated from *S. cerevisiae* (7). The isolation of GOGAT-less mutants has been reported elsewhere (26); however, their genetic and physiological characterization has not been published, so the physiological function of GOGAT still remains obscure. Our results indicate that GOGAT plays a role in glutamate biosynthesis under conditions of ammonium excess and that under ammonium-limited conditions, both NADP⁺-GDH and GOGAT can participate in the synthesis of glutamate. We also present evidence suggesting that *S. cerevisiae* has two GOGAT activities.

MATERIALS AND METHODS

Strains. Table 1 describes the characteristics of the different strains used in this study.

Growth conditions. Strains were routinely grown on minimal medium (MM) containing salts, trace elements, and vitamins following the formula of yeast nitrogen base (Difco

Laboratories, Detroit, Mich.). Glucose (2% [wt/vol]) was used as the carbon source, and 40 mM (NH₄)₂SO₄ was used as the nitrogen source. Amino acids needed to satisfy auxotrophic requirements were added at 0.01% (wt/vol). Cells were incubated at 30°C with agitation (175 rpm). Growth was monitored by measuring optical density at 650 nm. Fed-batch ammonium-limited cultures were achieved as previously described (14).

Mutagenesis and mutant selection. Mutants with impaired NADP⁺-GDH activity were derived from strain STX21-4A by a method previously described (7). In order to obtain mutants with impaired GOGAT activity, a *gdh* mutant was treated with ethyl methanesulfonate, according to the method of Fink (8). After mutagenesis, the cells were allowed a period of growth on MM that contained glutamate. Mutant cells were enriched for on MM by using the antibiotic N-glycosyl-polyfungin (20). Cells were spread on MM plates with 0.1% glutamate and incubated at 30°C. Colonies that appeared after 3 to 5 days were replica plated to MM plates with and without glutamate. Cells that failed to grow in the absence of glutamate were purified and further characterized.

Tetrad dissection. Tetrads were dissected by the method of Fink (8).

Determination of NADP⁺-GDH and GOGAT activities. Soluble extracts for enzyme assays were prepared by suspending whole cells in the corresponding extraction buffers and grinding them with glass beads in a Braun cell disruptor. NADP⁺-GDH (EC 1.4.1.3) and NAD-GDH (EC 1.4.1.2) were assayed by the method of Doherty (6). GOGAT (EC 1.4.1.7) was assayed by the method of Room et al. (22), but with the assay buffer adjusted to the different pHs. The activities detected at different pHs were dependent on the presence of 2-oxoglutarate, glutamine, and NADH and were inhibited by azaserine. Extracts were desalted on a Sephadex G-25 column equilibrated and eluted with the extraction buffer.

Determination of glutamate pools. Cells were harvested by centrifugation, immediately suspended in 80% ethanol, and heated in boiling water for 10 min. Samples were lyophilized,

* Corresponding author.

TABLE 1. *Y. enterocolitica* strains

Strain	Genotype	Source or reference
S288C	<i>MA1a</i> <i>STC2</i> <i>ura2</i> <i>CUP1</i> <i>GDH1</i> <i>GUS1</i> <i>GUS2</i>	Cold Spring Harbor Laboratory
STX21-4A	<i>MATa</i> <i>ura2</i> <i>his</i> <i>ura1</i> <i>ura3</i> <i>his1</i> <i>met1</i> <i>ura2</i> <i>GDH1</i> <i>GUS1</i> <i>GUS2</i>	Yeast Genetic Stock Center
CN30	<i>MATa</i> <i>ura2</i> <i>his</i> <i>ura1</i> <i>ura3</i> <i>his1</i> <i>ura2</i> <i>gdh</i> <i>GUS1</i> <i>GUS2</i>	This study
D587-4B	<i>MA1a</i> <i>his1</i> <i>GDH1</i> <i>GUS1</i> <i>GUS2</i>	Cold Spring Harbor Laboratory
CN31	<i>MA1a</i> <i>his</i> <i>gdh</i> <i>GUS1</i> <i>GUS2</i>	This study
CN33	<i>MA1a</i> <i>his</i> <i>gdh</i> <i>ura1</i> <i>ura2</i>	This study
D585-11C	<i>MATa</i> <i>his1</i> <i>GUS1</i> <i>GUS2</i>	Cold Spring Harbor Laboratory
CN34	<i>MATa</i> <i>his1</i> <i>gdh</i> <i>ura1</i> <i>ura2</i>	This study
CN35	<i>his</i> <i>ura1</i> <i>ura2</i> <i>GDH1</i>	This study
CN36	<i>MATa</i> <i>his</i> <i>his1</i> <i>gdh</i> <i>GUS1</i> <i>GUS2</i>	This study
CN37	<i>MA1a</i> <i>gdh</i> <i>ura1</i> <i>GUS2</i>	This study
CN38	<i>MATa</i> <i>his</i> <i>his1</i> <i>gdh</i> <i>GUS1</i> <i>ura2</i>	This study
CN39	<i>MATa</i> <i>gdh</i> <i>ura1</i> <i>ura2</i>	This study

and glutamate pools were determined with an AMINCO amino acid analyzer as described previously (10).

Protein determination. Protein was measured by the method of Lowry et al. (15), with bovine serum albumin as a standard.

Chemicals. Amino acids, ethyl methanesulfonate, and bovine serum albumin were obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. *N*-Glycyl-polyfungin was a kind gift from Norman J. Pieniazek (Department of Genetics, University of Warsaw, Warsaw, Poland).

RESULTS

Isolation and characterization of a mutant altered in NADP⁺-GDH. A mutant devoid of NADP⁺-GDH (CN30) was isolated from a *ura2* mutant strain (STX21-4A) by the method of Drilfien and Lacroite (7). Those authors found that strains carrying the *ura2* mutation were able to grow on MM supplemented with ureidosuccinic acid in the presence of proline as the nitrogen source but not when this amino acid was replaced by ammonium sulfate or glutamic acid. From a *ura2* strain, mutants which were able to grow on ammonium or glutamic acid were obtained; these strains showed low levels of NADP⁺-GDH. Mutant strain CN30 had NADP⁺-GDH activity 100-fold lower than that of the STX21-4A parental strain and the S288C wild-type strain (Table 2). Mutant CN30 was mated with strain D587-4B. NADP⁺-GDH activity was determined in each of the clones recovered from 10 tetrads. The capacity to develop wild-type enzymatic activity against the 100-fold-lower activity found in the CN30 mutant strain followed a 2:2 segregation pattern. Wild-type activity and mutant strain activity show standard deviations of 0.013 and 0.0012, respectively. These data show that the alteration present in the mutant CN30 was due to a single gene mutation. Auxotrophic markers also showed a 2:2 segregation pattern. This cross allowed the recovery of a derivative from CN30 (CN31), which retained low levels of NADP⁺-GDH activity (Table 2) and histidine auxotrophy. CN31 was used to carry out the rest of the characterization.

The CN31 mutant strain showed a higher doubling time than that found in the wild-type strain when both strains were grown with ammonium as the nitrogen source (data not shown). Similar growth was observed in both strains when

TABLE 2. NADP⁺-GDH, NAD-GDH, and GOGAT-specific activities*

Strain	Specificity of		
	NADP ⁺ -GDH ^b	GOGAT ^c	NAD-GDH with: 40 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ^d
S288C	0.314	0.021 (0.0052)	0.010 ND
STX21-4A	0.400	0.025 (0.0045)	ND ND
CN30	0.003	0.022 (0.0040)	ND ND
CN31	0.003	0.023 (0.005)	0.010 ND
CN33	0.001	0.0023 (0.001)	ND ND
CN34	0.002	0.002 (0.0009)	ND ND
CN35	0.45	0.0041 (0.0012)	0.0035 0.13
CN36	0.003	0.0217 (0.0053)	0.0032 0.11
CN37	0.002	0.038 (0.0076)	0.002 0.12
CN38	0.003	0.0172 (0.0049)	0.003 0.14
CN39 ^e	0.001	0.0025 (0.0022)	0.004 0.11
Mixed extracts (STX21+CN31) ^f	2.18	ND	ND ND

* For the measurement of NADP-GDH and GOGAT, cells were grown for 12 h on MM with 40 mM (NH₄)₂SO₄ plus 0.01% of histidine and 0.01% lysine. NAD-GDH activity was determined with extracts obtained from cells grown on 40 mM (NH₄)₂SO₄ plus 0.01% histidine and 0.01% lysine or on proline plus 0.01% histidine and 0.01% lysine. ND, Not determined.

^b Expressed as m.u. (mole of NADPH oxidized per minute per milligram of protein).

^c Expressed as micromoles of NADH oxidized per minute per milligram of protein. The reported values are the means of 10 experiments. Numbers in parentheses show the standard deviations.

^d Cells were grown for 12 h on MM with 40 mM (NH₄)₂SO₄ plus 0.01% histidine, 0.01% lysine, and 1% glutamate.

^e Expected value, 2.22. Expressed as total units of enzyme.

they were incubated in MM plus glutamate (data not shown). This phenotype is similar to the one described for a *gdh1* mutant strain (7). Furthermore, the residual NADP⁺-GDH activity found in extracts obtained from CN30 and CN31 mutant strains showed a higher thermosensitivity than that found for the enzyme present in extracts obtained from strain STX21-4A (data not shown), which suggests that the CN30 and CN31 mutant strains carry a structural mutation. The observed activity of a mixture of extracts obtained from CN31 and STX21-4A (Table 2) shows that the low activity found in the CN31 mutant strain is not due to the presence of an inhibitor in extracts obtained from CN31. Since it has been proposed that the residual growth observed in a NADP⁺-GDH-less mutant could be attributed to the operation of the NAD-GDH (11), the activity of this enzyme was measured in strain CN31. As expected, the wild-type strain and CN31 mutant strain showed very low NAD-GDH activity when grown on MM (Table 2).

Isolation and genetic characterization of a mutant with altered GOGAT activity. A glutamate auxotroph (CN33) was isolated from mutant strain CN31, as described in Materials and Methods. We followed the protocol described by Poliana and Conde (20) and found a frequency of 0.5% for glutamate auxotrophs. Strain CN33 retained the low NADP⁺-GDH activity present in the CN31 parent strain; in addition, mutant strain CN33 showed a GOGAT activity 20-fold lower than that found in wild-type and NADP⁺-GDH mutant strains (Table 2). The results given above indicate that in a NADP⁺-GDH-less genetic background, an arrest in GOGAT activity results in glutamate auxotrophy. This phenotypic marker allowed us to analyze the genetic segregation of the mutation(s) responsible for the reduced GOGAT activity and to score glutamate auxotrophy. Following the rules of genetic nomenclature, we decided to use *GUS1* as the

TABLE 3. Segregation analysis of markers in crosses of strains CN31, CN34, CN36, CN37, CN38, and CN39

Cross	No. of tetrads dissected	Segregation of auxotrophic phenotypes								
		Glutamate			Tyrosine			Histidine		
		4:0	3:1	2:2	4:0	3:1	2:2	4:1	3:1	2:2
CN34 <i>MATa lys1 edh1 gus1 gus2</i> × CN31 <i>MATa his1 edh1</i>	15	1	9	5	0	0	15	0	0	15
CN36 <i>MATa his1 edh1 gus1 gus2</i> × CN39 <i>MATa adh1 gus1 gus2</i>	10	1	6	3	0	0	10	0	0	10
CN37 <i>MATa adh1 gus1 gus2</i> × CN38 <i>MATa his1 edh1 gus1 gus2</i>	10	2	5	3	0	0	10	0	0	10
CN38 <i>MATa his1 edh1 gus1 gus2</i> × CN39 <i>MATa adh1 gus1 gus2</i>	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10

gene symbol for GOGAT. Strain CN34 (*MATa lys1 edh1 gus1 gus2*) was obtained from a cross between strain CN33 (*MATa his1 edh1 gus1 gus2*) and strain D585-11C (*MATa lys1 GDH GC3*). Strain CN34 was then mated with strain CN31 (Table 3), and GOGAT-less segregation was scored by replica plating on media containing ammonium or ammonium plus 0.1% glutamate. Fifteen tetrads were analyzed. Five segregated 2:2 nine segregated 3 prototrophic:1 glutamate auxotroph, and one segregated 4 prototrophic clones. The auxotrophic markers showed a 4:2 segregation pattern (Table 3). We further characterized these clones by determining GOGAT activity in each of the strains of the 15 tetrads. All the prototrophic clones showed GOGAT activity, while the auxotrophic strains had activities which were severalfold lower than the ones found in the wild-type strain or in the prototrophic segregants (data not shown). These results indicate that the GOGAT-less phenotype displayed by the mutant strain CN34 was due to the presence of two loosely linked mutations. Thus, in the tetrads showing the 3:1 segregation, the glutamate auxotrophic segregant would carry the double mutation present in strain CN34, of the three prototrophic clones, one would harbor the two wild-type alleles present in the CN31 strain, and each of the other two would bear one wild-type and one mutant allele. Strains CN36, CN37, CN38, and CN39 (Table 1) belonged to a tetrad in which glutamate auxotrophy showed a 3:1 segregation pattern. As expected, three of them (CN36, CN37, and CN38) showed GOGAT activity, while CN39 lacked this activity (Table 2).

Crosses were performed among the segregants. CN36 bears the two wild-type alleles, while CN39 carries the two mutant genes (Table 3). Finally, CN37 and CN38 harbor single gene mutations. These results show that the GOGAT-less phenotype shown by strain CN34 is due to the presence of two loosely linked mutations.

NAD-GDH activities were determined for strains CN36, CN37, CN38, and CN39 in extracts obtained from cells grown with ammonium or proline as the nitrogen sources. These strains showed wild-type activity, and the enzyme was normally regulated in these strains (Table 2).

Phenotypic characterization of strains CN36, CN37, CN38, and CN39. Strains CN36, CN37, CN38, and CN39 were incubated on liquid cultures of MM and MM plus 0.1% glutamic acid in order to analyze the phenotypic behavior of strains carrying double and single gene mutations (Fig. 1A). It can be seen that strain CN36 showed a doubling time on MM twofold higher than that of the wild-type strain S288C. As mentioned above, this would be the expected phenotype for a NAD⁺-GDH mutant strain. Strains CN38 and CN37 showed higher doubling times on MM than did CN36, finally, CN39 was unable to grow on MM. When these strains were

grown on MM plus 0.1% glutamic acid, similar growth curves were obtained (Fig. 1B). These results indicate that the partial glutamate auxotrophy observed in NAD⁺-GDH-less mutants is accentuated in those segregants carrying single gene mutations (CN37 and CN38) and that glutamate auxotrophy is attained only in the double GOGAT-less mutant.

It has been shown that when some microorganisms, like *Klebsiella* species, are grown under ammonium limitation, the NAD⁺-GDH does not participate in the assimilation of this compound (23). Under this condition, the metabolic pathway comprising glutamate synthetase and GOGAT is responsible for both ammonium assimilation and glutamate synthesis (23). In order to analyze the participation of GOGAT in the assimilation of low ammonium concentrations in *S. cerevisiae*, strains CN36, CN37, CN38, CN39, and wild-type S288C were grown in ammonium-limited conditions. Strains CN36, CN37, CN38, and wild-type S288C grew with the same doubling times (Fig. 1C). As expected, CN39 was unable to grow under this condition (Fig. 1C). Strain CN38 (*his1 GDH1 gus1 gus2*), which was obtained from the cross between CN33 and D585-11C, grew as well as the wild-type S288C and strains CN36, CN37, and CN38. The lack of GOGAT activity affected the growth on MM of the CN35 mutant strain, which showed an increase in the doubling time compared with that found in the wild-type strain (Fig. 1A). The activity of NAD-GDH was also determined in extracts obtained from CN35. This strain retained wild-type activity (Table 2).

Effect of single gene mutations on GOGAT activity. GOGAT activity was assayed at pH 7.8 as described by Roon et al. (22). However, when GOGAT activity was measured at different pHs, two peaks of activity were evident. Both activities (GOGAT A and GOGAT B) depend on the presence of 2-oxoglutarate, glutamine, and NADH. Extracts obtained from strain CN36 incubated on MM showed two pH optima at 6.5 and 7.0 (Fig. 2A). Extracts obtained from strains CN37 and CN38 showed only one peak of activity each at pHs 7.0 and 6.5, respectively (Fig. 2B). CN39 showed very low levels of enzyme activity regardless of the pH used for the assay (Fig. 2B). These results suggest that *S. cerevisiae* has two GOGAT activities, and that the mutation in strain CN37 affected GOGAT A activity (pH 6.5) while the mutation in strain CN38 altered GOGAT B activity (pH 7.0). Furthermore, the fact that the double GOGAT mutant CN39 showed very low GOGAT activities at all pHs suggests that the activity detected at pH 6.5 in extracts obtained from strain CN37 represents a fraction of GOGAT B activity that can still be detected at pH 6.5. Similarly, the activity detected at pH 7.0 in extracts obtained from strain CN38 should be GOGAT A activity (Fig. 2A and B). Desalted

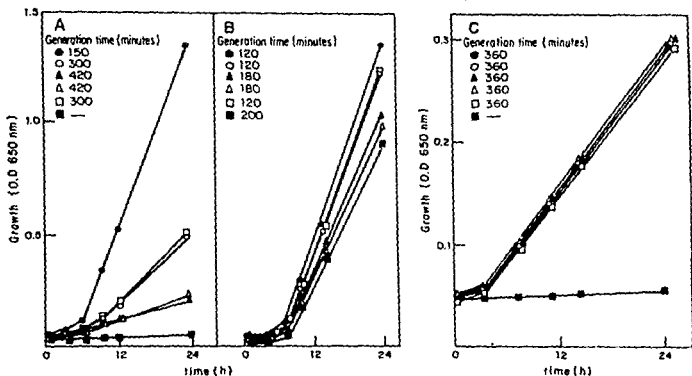


FIG. 1. Growth of strains S288C (●), CN36 (○), CN37 (▲), CN38 (△), CN39 (■), and CN35 (□). Cells were grown on MM with 40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% histidine, and 0.01% lysine (A); on MM plus 0.1% glutamate, 0.01% histidine, and 0.01% lysine (B); or in fed batch ammonium-limited cultures with 0.01% histidine and 0.01% lysine (C). O.D. 650 nm, Optical density at 650 nm.

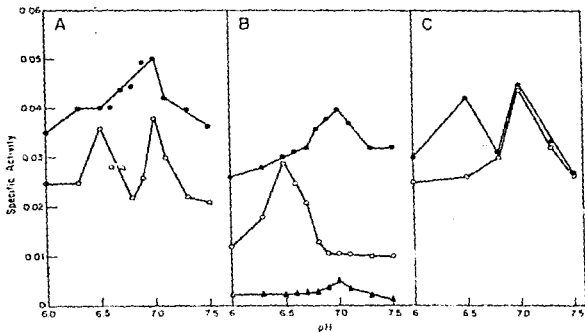


FIG. 2. GOGAT activity at different pHs. Cells were incubated in MM with 40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ plus 0.01% lysine and 0.01% histidine for 12 h. Extracts were prepared as described in Materials and Methods. (A) S288C (●) and CN36 (○). (B) CN37 (●), CN38 (○), and CN39 (▲). (C) Strain CN36 was grown on MM with 40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ plus 0.01% lysine and 0.01% histidine. After 12 h, the culture was divided and glutamate was added to one half of the culture. After 6 h, GOGAT activity in cultures with (○) and without (●) glutamate was determined.

TABLE 4. Intracellular glutamate pools

Time (h)	nmol of glutamate/mg of protein in strain ^a				
	S288C	CN36	CN37	CN38	CN39
6	0.65	0.15	0.15	0.18	0.09
12	0.55	0.22	0.30	0.32	0.10

^a Cells were incubated on MM plus 0.01% lysine and 0.01% histidine.

^b Incubated in non-growing conditions.

extracts prepared from strains CN36 and CN37 gave results similar to the ones found in nonsalted extracts (data not shown). When activity was assayed in desalted extracts obtained from strains CN38 and CN39, GOGAT B enzymatic activity was uncovered, showing a 100% increase in activity compared with that found in nonsalted extracts (data not shown). These data suggest that the mutation which affected GOGAT B activity rendered it sensitive to inhibition by some negative modulator.

GOGAT activities were also determined in crude extracts obtained from wild-type strain S288C. Only GOGAT B activity (pH 7.0) was apparent (Fig. 2A). Similar results were obtained with desalted extracts (data not shown). The lack of GOGAT A activity in the wild-type strain could be attributed to a repressive effect due to the higher intracellular glutamate concentration found in the wild-type strain compared with that found in CN36, CN37, CN38, and CN39 (Table 4). When GOGAT activities were determined at the various pHs, strain STX21-4A showed behavior similar to that described for wild-type strain S288C (data not shown), while the *adhI* derivative showed two peaks of activity. Furthermore, strain CN36 was grown on MM for 12 h, the culture was divided, and glutamate (20 mM) was added to one half of the culture. The rest of the culture remained without glutamate; at 6 h after the addition of glutamate, only GOGAT B activity could be detected (Fig. 2C). These results suggest that GOGAT A activity is arrested in the presence of glutamate.

DISCUSSION

A glutamate auxotroph was obtained from a NADP⁺-GDH-less mutant strain; this strain lacks GOGAT activity. The genetic analysis of this mutant showed that the GOGAT-less phenotype was conferred by a double gene mutation. Since it has been found that double mutants with altered cytosolic and mitochondrial citrate synthase activities show lower levels of other enzymatic activities (13), we determined citrate synthase activity in the CN39 mutant strain. This enzyme showed wild-type activity (data not shown).

It has been proposed that in *Klebsiella* species, GOGAT activity is necessary for growth under conditions of nitrogen limitation (23, 26). Our results indicate that this is not the case in *S. cerevisiae*, since mutants devoid of GOGAT activity are able to grow with NADP⁺-GDH.

We have found that extracts obtained from a NADP⁺-GDH-less strain show two peaks of GOGAT activity with different pH optima. This is an unexpected result, since GOGAT has been previously purified from *S. cerevisiae*, showing a broad optimal pH range between pHs 7.0 and 7.5 (17). Since, as mentioned above, the expression of the GOGAT-less phenotype was dependent on the presence of a double gene mutation, we made the pertinent crosses in order to obtain strains carrying a single mutation each. These strains (CN37 and CN38) showed only one peak of activity each, i.e., GOGAT B and GOGAT A, respectively.

Further experiments showed that GOGAT B activity appeared in desalted extracts obtained from strain CN38, which suggests that the mutation present in this strain either affected GOGAT B sensitivity to some negative modulator or resulted in increased synthesis of a negative modulator. Experiments are under way to determine whether the mutation present in strain CN38 is structural or regulatory. The fact that strains CN37 and CN38 showed only one peak of activity each could be explained by assuming that the mutations present in each one of these strains have affected a different GOGAT activity or that one of the mutations has affected GOGAT activity and the other one has altered a regulatory gene whose product is involved in a modification system. The operation of this system should give rise to a modified enzyme which retains GOGAT activity while its pH optimum is changed.

Extracts obtained from wild-type strain S288C and parent strain STX21-4A showed only GOGAT B activity. As mentioned above, the wild-type strain accumulates glutamate pools which are higher than those found in NADP⁺-GDH mutant strains. This large amount of glutamate could negatively modulate the expression of GOGAT A activity. This possibility is supported by the fact that the addition of glutamate to a culture of strain CN36 grown on MM results in a decrease of GOGAT activity (Fig. 2C). It is probable that under the conditions used to purify this enzyme (17), the synthesis of GOGAT A (pH 6.5) was repressed by the high glutamate pool accumulated as a result of the presence of NADP⁺-GDH activity. Taken together, these results suggest that *S. cerevisiae* has two GOGAT activities. Since all the microorganisms studied so far have shown only one GOGAT activity, further work will have to be done in order to establish this matter. Experiments to purify GOGAT from CN36 strain are under way. They will allow a biochemical analysis of these enzymatic activities. In this regard, it is worth noting that the existence of two GOGAT activities in higher plants has been fully demonstrated (1, 18, 25).

The negative effect of glutamate on GOGAT activity suggests that GOGAT A could play a biosynthetic role when the activity of NADP⁺-GDH is impaired. In this regard, it has been shown that in *Bacillus subtilis*, which naturally lacks NADP⁺-GDH activity, GOGAT plays a biosynthetic role and is repressed by glutamate (9). Our results indicate that in the absence of NADP⁺-GDH activity, both GOGAT activities must have a physiological role, since the lack of either one results in an increase of the doubling time when CN37 or CN38 is grown on MM. Also, CN35 bearing wild-type NADP⁺-GDH but lacking GOGAT activity shows an increased doubling time on MM. The fact that GOGAT B activity did not decrease after the addition of glutamate to a culture of CN36 growing on MM indicates that this enzyme is not sensitive to this kind of regulation; this suggests that its physiological role is related to glutamine degradation rather than to glutamate synthesis, as has been proposed for *S. cerevisiae* (4). The evidence presented here indicates that GOGAT activity plays an important role in glutamate synthesis under conditions of ammonium excess and establishes that the residual growth found in NADP⁺-GDH-less mutants is due to the operation of GOGAT and not to the presence of NAD-GDH, as has been previously proposed (11).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Gloria Soberón, Mario Soberón, and David Romero for their critical review of the manuscript and to Magdalena Miranda and Herlinda Manrique for their secretarial assistance.

This work was supported in part by grant BNF-MX-6-87-77 from the National Academy of Sciences.

LITERATURE CITED

- Avila, C., J. R. Botella, F. M. Canovas, I. Nuez de Castro, and V. Valpuesta. 1987. Different characteristics of the two glutamate synthases in the green leaves of *Lythrum salicaria*. *Plant Physiol.* 85:1079-1079.
- Bogner, E., J. Natrusiegt, and A. Machado. 1985. Regulation by ammonium of glutamate dehydrogenase (NADP⁺) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 131:1425-1432.
- Bravo, A., and J. Mora. 1988. Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase glutamate synthase pathway. *J. Bacteriol.* 170:980-984.
- Calderon, J., and J. Mora. 1985. Glutamine cycling in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 131:3237-3242.
- Castan, I., E. Bastarrachea, and A. A. Cuarrubias. 1988. *gltII* operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170:821-827.
- Doherty, D. 1979. α -Glutamate dehydrogenases (yeast). *Methods Enzymol.* 17:855-866.
- Drillien, M., and E. Lacroix. 1972. Argininosuccinic acid uptake in yeast and some aspects of its regulation. *J. Bacteriol.* 109:203-209.
- Fink, G. R. 1970. The biochemical genetics of yeast. *Methods Enzymol.* 16:15-78.
- Fu, Lin Pan, and J. G. Coote. 1979. Glutamine synthetase and glutamate synthase activities during growth and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 112:373-377.
- Gonzalez, A., M. Tenorio, G. Vaca, and J. Mora. 1983. *Neurospora crassa* mutant impaired in glutamine regulation. *J. Bacteriol.* 155:1-7.
- Grenson, M., E. Dubois, and M. Piotrowska. 1974. Ammonia assimilation in *Saccharomyces cerevisiae* as mediated by the two glutamate dehydrogenases. Evidence for the *gdhA* locus being a structural gene for NADP-dependent glutamate dehydrogenase. *Mol. Gen. Genet.* 128:73-80.
- Hummelt, G., and J. Mora. 1980. Regulation and function of glutamate synthase in *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96:1688-1694.
- Kispaal, G., M. Rosenkrantz, L. Guarent, and P. Szere. 1988. Metabolic changes in *S. cerevisiae* strains lacking citrate synthase. *J. Biol. Chem.* 263:11145-11149.
- Limon-Lason, J., M. Lara, B. Reséndiz, and J. Mora. 1977. Regulation of glutamate 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.* 193:265-275.
- Madonna, M. J., R. L. Fuchs, and J. E. Brenchles. 1985. Fine structure analysis of *Salmonella typhimurium* glutamate synthase genes. *J. Bacteriol.* 161:353-360.
- Masters, D. S., and A. Meister. 1982. Inhibition by homocysteine sulfonamide of glutamate synthase purified from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 257:8711-8715.
- Mifflin, B. J., P. J. Lea, and R. M. Wallgrove. 1980. The role of glutamine in ammonium assimilation and re-assimilation in plants, p. 213-234. *In* J. Mora and R. Palacios (ed.), *Glutamine: metabolism, enzymology and regulation*. Academic Press, Inc., New York.
- Pahel, G., A. H. Zelenetz, and B. M. Tyler. 1978. *gltII* gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamate synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 137:139-148.
- Polaina, J. A., and J. Coude. 1981. Use of the polyene antibiotic N-glycosyl-polyfungin in counterselecting yeast mutants. *Mutat. Res.* 91:111-114.
- Romero, D., and G. Davila. 1986. Genetic and biochemical identification of the glutamate synthase structural gene in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 167:1043-1047.
- Roon, R. J., H. E. Even, and F. Larimore. 1974. Glutamate synthase: property of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide dependent enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 118:89-95.
- Senior, P. J. 1975. Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*: studies with the continuous culture technique. *J. Bacteriol.* 123:407-418.
- Tempest, D. W., J. L. Mers, and C. M. Brown. 1970. Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. *Biochem. J.* 117:405-507.
- Wallgrove, R. M., P. J. Lea, and B. J. Mifflin. 1982. The development of NAD(PH)-dependent and ferredoxin-dependent glutamate synthase in greening barley and pea leaves. *Plant J.* 15:473-476.
- Wlame, S. M. 1985. Nitrogen catabolite repression in fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 26:2-87.

RESULTADOS:

El presente trabajo consta de dos partes: los resultados publicados en el artículo: *Isolation and Characterization of a Saccharomyces cerevisiae mutant with impaired Glutamate Synthase Activity* y de resultados adicionales que no han sido publicados. A continuación se resumen los resultados del trabajo publicado seguido por los resultados adicionales y al final las conclusiones de ambas partes.

Los aspectos más relevantes presentados en el artículo se pueden resumir como sigue: :

- A. El fenotipo *GOGAT*⁻, es causado por dos mutaciones, en una cepa *GDH*⁻ confiere auxotrofia por ácido glutámico.
- B. En la tetrada que decidimos analizar con una segregación 3:1 podemos distinguir dos actividades de *GOGAT* con diferentes pH óptimos, en la cepa CN36 los pH óptimos son a pH 6.5 y pH 7.0, en la cepa CN37 es de pH 7.0, en la cepa CN 38 es de pH 6.5 y la cepa CN39 carece de actividad de *GOGAT*.
- C. La actividad de pH 6.5 disminuye en presencia de glutamato.

Estos resultados sugieren que en *S. cerevisiae* hay dos actividades de *GOGAT* que se pueden distinguir principalmente por su pH óptimo. Por ello nos interesó seguir el estudio bioquímico de estas actividades y tratar de determinar en qué condiciones están presentes. También quisimos buscar en qué condiciones una cepa silvestre *GDH*⁺ tiene la actividad de pH 6.5, porque en las condiciones que utilizaron Roon (1974) y Masters y Meister cuando purificaron la *GOGAT*, sólo encontraron una actividad con pH óptimo de 7.0.

El papel fisiológico de la GOGAT en diferentes bacterias constituye una vía alterna de producción de glutamato en limitación de amonio junto con la GS (Tempest, 1972, Senior, 1975), en *N. crassa* tiene un papel de recambio de la glutamina (Calderón, 1985, Lomnitz, 1987), sin embargo, en *S. cerevisiae* la actividad baja de GOGAT parece ser constitutiva, y no se altera en condiciones de limitación de amonio por lo que su papel fisiológico no está claro. Pero como ahora encontramos dos picos de actividad de GOGAT a diferente pH óptimo quisimos ver su comportamiento en limitación de amonio.

RESULTADO ADICIONALES:

Crecimos a las mutantes y a la cepa silvestre en limitación de amonio. En un cultivo de 1 lt. de SN (Glucosa y trazas minerales, sin aminoácidos), en un matraz Ferenbach a 200 rpm, se limita el amonio al inyectar $0.035 \mu\text{g}/\text{ml}$ hora de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Como podemos ver en la figura 4, en los extractos no dializados (O) tanto en la cepa silvestre (4A) como en la cepa CN36 (4B) la enzima que se encontró fue la de pH 6.5, aunque las actividades fueron más bajas que en otras condiciones. En los extractos dializados (O) apareció el pico de pH 7.0; la cepa CN38 (4D) en el extracto crudo (O) tuvo la actividad de pH 6.5 aunque no muy pronunciada, y al dializar (O) también apareció la actividad de pH 7.0. En cambio, la cepa CN37 (4C) en extracto crudo (O) sólo tuvo el pico de pH 7.0, y al dializar (O) aumentó esta actividad pero no apareció el pico de pH 6.5.

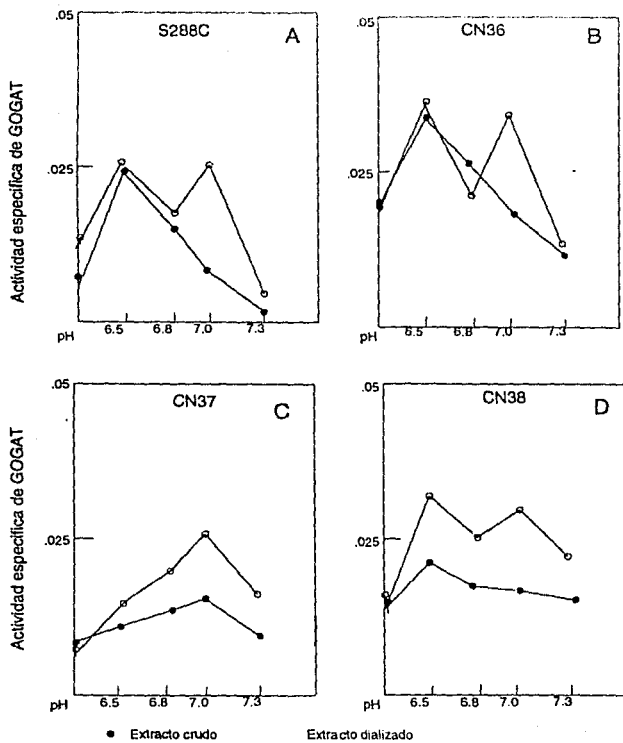


Figura 4: Actividad específica de GOGAT en las cepas S288C, CN36, CN37, CN38 en Medio Mínimo, limitación de amonio 24H.

Estos resultados nos sugieren que en la limitación de amonio, la enzima importante era la de pH óptimo 6.5, y que no había diferencia en una cepa silvestre(S288C) ni en una cepa *GDH-GOGAT⁺⁺*(CN36), pero que la carencia de esta actividad (como se podía ver en la mutante *GOGAT⁻⁺* (CN37), no resultaba en una incapacidad de crecer. Es decir, que en limitación de amonio, la levadura puede sintetizar ácido glutámico por la vía GDH-GS o por la vía GS-GOGAT.

La asimilación de amonio está estrechamente relacionada con el metabolismo de carbono. En nuestro laboratorio se ha visto que la actividad de GDH está regulada por los esqueletos de carbono, y se encuentra disminuida en cultivos de etanol y acetato. Por lo anterior, quisimos estudiar la actividad de las dos GOGATs, en fuentes de carbono no fermentables como son etanol y acetato, donde el rendimiento neto de ATP está disminuido supuestamente (aunque nosotros no medimos los niveles de ATP) al igual que los esqueletos de carbono, pues en estas condiciones alguna de las GOGATs podría tener un papel importante, dado que la GDH está disminuida.

En la curva de crecimiento en etanol (fig. 5) podemos ver como la cepa CN37 que carece de la actividad de pH 6.5 no creció (sin embargo, somos capaces de medir actividad enzimática de GOGAT), mientras que la cepa CN36 y la cepa CN38 crecieron prácticamente igual que la cepa silvestre S288C.

Quando medimos la actividad de GOGAT a las 24 horas (figura 6A)) observamos que en el extracto crudo de la cepa silvestre S288C (O) habia un pico de actividad a pH 6.5, al igual que en el extracto crudo de la cepa CN36 (6B, (O)). Al dializar los extractos, fue posible medir la actividad tanto a pH 6.5 como a pH 7.0 en ambas cepas (6A y 6B (O)). La cepa CN37 (6C) en el extracto crudo sólo se pudo medir la actividad de pH 7.0 (O) y con la diálisis solo aumentó la actividad (O), lo que sugiere que en esta cepa se sobreexpresa esta actividad para compensar la carencia de la actividad a pH 6.5. La cepa CN 38 (6D) en el extracto crudo presentó una mayor actividad a pH 6.5(O) comparada con la cepa silvestre o con la CN36, sin embargo, cuando dializamos fue posible medir la actividad a ambos pHs (O).

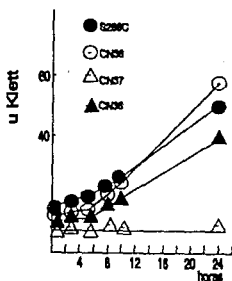


Figura 5: Curva de crecimiento en Etanol.

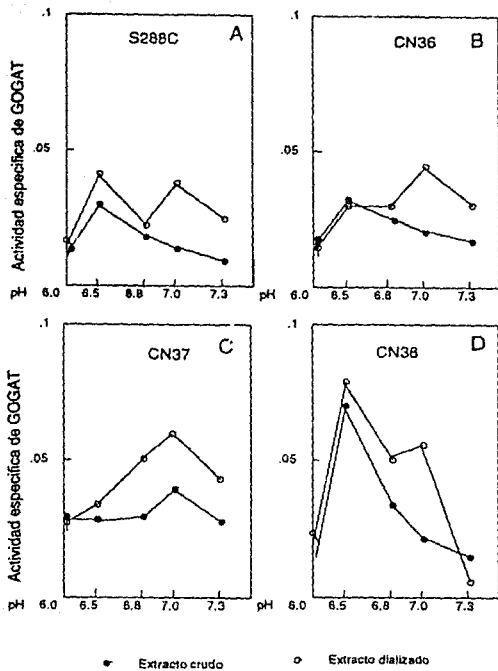


Figura 6 : Actividad específica de GOGAT en las cepas S288C, CN36, CN37 y CN3 en Medio Mínimo Etanol 24 H.

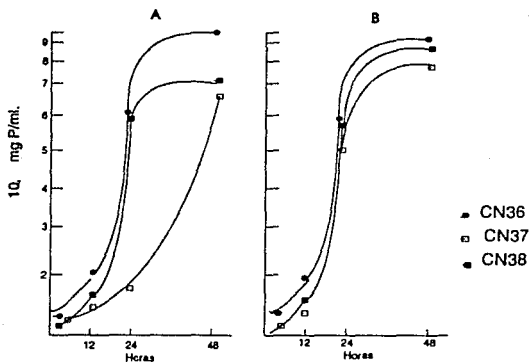


Figura 7: Curva de Crecimiento. Panel A: Acetato, Panel B: Acetato más glutámico.

Cuando crecimos las cepas en acetato, los resultados fueron similares a los de etanol; es decir, aunque la actividad específica de GOGAT fue alrededor de la mitad, aquí encontramos que a las 48 horas de cultivo (Fig. 8), la cepa silvestre S288C (8A) en un extracto no dializado, la actividad de GOGAT predominante también es a pH 6.5 (O), y lo mismo podemos apreciar

en el extracto no dializado de la cepa CN36 (8B)(O); cuando dializamos los extractos, podemos medir la actividad a pH 7.0 como en etanol, en la cepa silvestre (8A) y en la cepa CN36 (8B)(O). Con la cepa CN38 (8D) en el extracto no dializado (O) observamos la actividad de pH 6.5 y cuando dializamos el extracto pudimos medir la actividad a pH7.0(O). La cepa CN37 (8C) carece de la actividad de pH 6.5 en el extracto no dializado (O) y cuando dializamos el extracto, aumenta extraordinariamente la actividad a pH 7.0, lo que nos sugiere que esta cepa está sobreproduciendo la enzima de pH 7.0 (O), esta mutante (CN37) tuvo un tiempo de duplicación mayor en acetato comparado con las otras cepas (fig. 7, panel A). Pero cuando le agregamos ácido glutámico al medio de cultivo (fig. 7, panelB) recuperó su crecimiento y creció como las otras cepas.

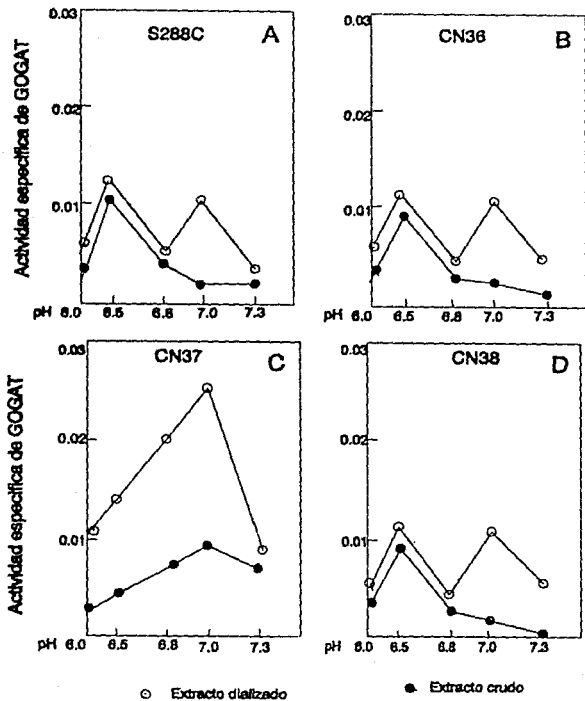


Figura 8: Actividad específica de GOGAT en las cepas S288C, CN36, CN37 y CN38, en Medio Mínimo Acetato 24H.

De estos resultados pudimos concluir que en fuentes no fermentables, la enzima que fue necesaria para crecer es la GOGAT de pH 6.5, y que no hubo diferencia de crecimiento entre una cepa silvestre (S288C) y una mutante *GDH⁻ GOGAT⁺⁺*(CN36). Por otro lado, la enzima de pH 7.0 parece estar inhibida por algún efector que se elimina por la diálisis. La mutante que carece de la actividad de pH 6.5 (CN37) creció con un tiempo de duplicación mayor en estas condiciones, pero este lag disminuyó cuando añadimos ácido glutámico al medio.

En las levaduras, el metabolismo general es muy diferente en condiciones de microaerofilia o de superagitación: durante la microaerofilia disminuye mucho el número de mitocondrias, y se reduce la capacidad respiratoria, mientras que en un cultivo superagitado (300 rpm) el número de mitocondrias aumenta. Quisimos explorar en estas condiciones cual de las GOGATs está más activa.

Como podemos ver en la figura 9, la cepa silvestre S288C en un cultivo de superagitación (300 rpm) a las 4 horas (9A,) tuvo muy poca actividad de GOGAT, pero se distinguió la actividad de pH 7.0. Conforme pasaba el tiempo, la actividad de GOGAT aumentó considerablemente (8 horas, y 12 horas,) y a las 24 horas () empezó a disminuir nuevamente. En microaerofilia encontramos a las 12 horas también el mismo pico de actividad a pH 7.0 (fig. 9B), aunque la actividad específica es como la mitad en estas condiciones, lo que es de esperarse pues el metabolismo general está disminuido en esta condición.

Como un control medimos la actividad de GDH en ambas condiciones; como podemos apreciar en la fig. 10, la actividad de GDH se indujo a las 8 horas y disminuyó un 50% en superagitación en la fase estacionaria, mientras que en microaerofilia permaneció igual todo el tiempo, lo que nos sugiere que sí hay una regulación diferente de esta enzima en las dos condiciones.

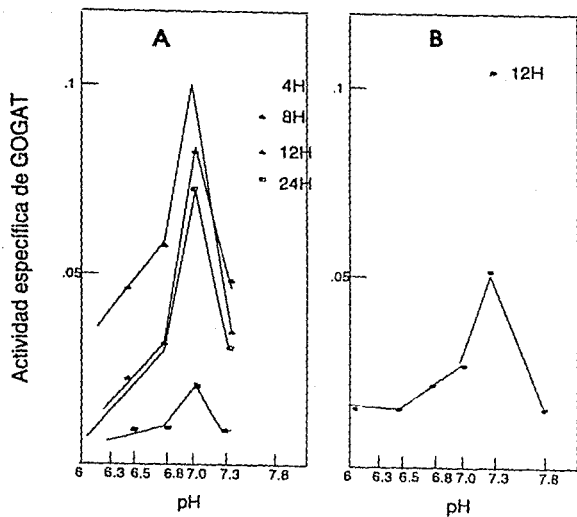


Figura 9: Actividad específica de GOGAT en la cepa silvestre S288C en superagitación A: 300rpm a diferentes tiempos ó en Microaerofilia a las 12 horas: B

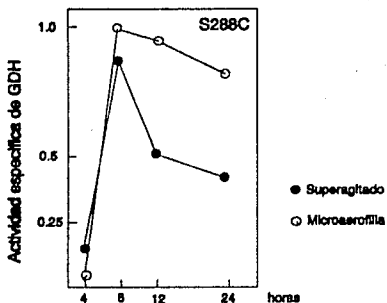


Figura 10: Actividad específica de la GDH de la cepa silvestre S288C en Superagitación (300 rpm) ó en Microaerofilia

La cepa CN36, crecida 12 Horas en Microaerofilia (fig.11.) presentó el mismo patrón que en agitación (fig 2 , del artículo); tiene dos actividades de GOGAT con valores de pH óptimos de 6.5 y 7.0, la cepa CN37 () tuvo la actividad óptima a pH 7.0 y la cepa CN 38() tuvo la actividad óptima a pH 6.5.

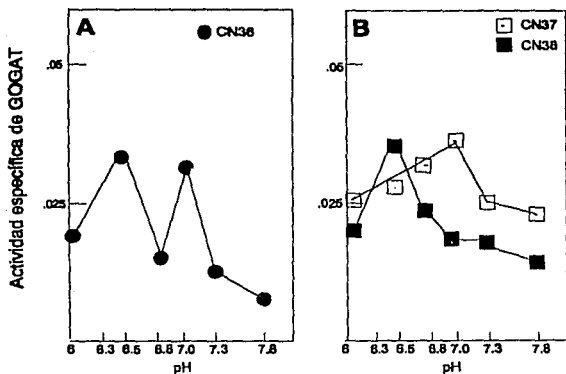


Figura 11: Actividad de GOGAT de las cepa CN36; panel A y de las cepas CN37 y CN 38; panel B. Medio Mínimo 12H Microaerofilia

Finalmente exploramos la posibilidad de que cada una de las actividades tuviera diferente sensibilidad a diversos inhibidores, ya que Folch (comunicación personal) encontró que la actividad de pH 6.5 era sensible a isocitrato mientras que la actividad de pH 7.0 era resistente, excepto para la cepa CN38, donde la actividad de pH 7.0 también era sensible a isocitrato. Probamos varios posibles inhibidores como: malato, glioxilato, isocitrato y succinato (tabla 2). Prácticamente todos ellos inhiben a la actividad de pH 6.5 y no a la actividad de pH 7.0, pero encontramos que la actividad de pH 6.5 fue más sensible al ácido succínico. Por lo tanto, hicimos una curva de concentración, que se muestra en la figura 12 (A, C, y D). Con este ácido no encontramos diferencias en la cepa CN 38, pues la actividad de pH 7.0 en esta cepa era resistente a succinato al igual que en las cepas CN36 y CN37. Al probar otros inhibidores como ATP, ADP, NADP y NAD (tabla 2) encontramos que la actividad de pH 7.0 era extremadamente sensible al NAD (Fig. 12, panel B). Este experimento se hizo con extractos dializados de cepas crecidas 12 horas en microaerofilia.

Inhibidores % de Inhibición pH 6.5 %de Inhibición pH 7.0

Isocitrato 5 mM	5	8
Málico 5 mM	5	8
Succínico 5mM	30	8
Glioxílico 5mM	5	8
NADP 10mM	0	0
NAD 2.5mM	45	95
AMP 10mM	7	8.5
ADP 10mM	17	0
ATP 10mM	0	0

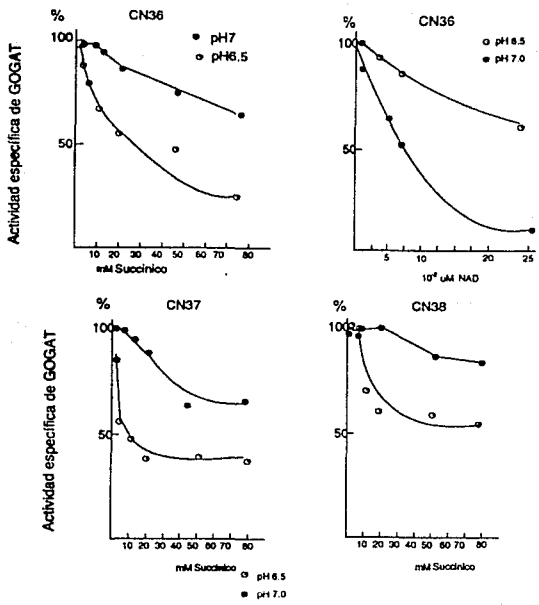


Figura 12: Inhibiciones de la actividad de GOGAT a pH 6.5 y pH 7.0 en las cepas CN36, CN37 y CN38.

DISCUSION:

En el presente trabajo se obtuvo una cepa auxótrofa de ácido glutámico a partir de una mutante *GDH⁻*; esta cepa presenta 10 veces menos actividad de GOGAT que la cepa silvestre. El análisis genético de esta mutante mostró que para obtener un fenotipo *GOGAT⁻* se requieren dos mutaciones. Como se ha encontrado que dobles mutantes con actividades alteradas de citrato sintasa citosólica y mitocondrial tienen bajos niveles de otras actividades enzimáticas (Kispaal y cols., 1988), se determinó la actividad de la citrato sintasa y se encontró una actividad normal. Sin embargo, no sabemos cómo diferenciar estas dos mutantes, dado que en la literatura hasta entonces solo se había descrito una GOGAT con pH óptimo de 7.0 (Roon y cols. 1974; Masters y Meister, 1982). Al hacer una curva de pH en una cepa *GDH⁻*, pudimos distinguir dos actividades de GOGAT a diferentes pH óptimo, una a pH 6.5 y otra, como se había reportado, a pH 7.0, que denominamos GOGAT A y GOGAT B, respectivamente. Este hallazgo nos permitió, a partir de ese punto, estudiar las características de cada una de estas actividades de GOGAT.

El papel fisiológico de la GOGAT no es del todo claro, pero dado que encontramos dos actividades, era necesario volver a estudiar esta actividad en limitación de amonio, pues en varios organismos como en la especie *Klebsiella* (Senior, 1975; Wiame, 1985), se ha propuesto que es aquí donde juega un papel importante la GOGAT en la asimilación de amonio. Nuestros resultados indican que este no es el caso para *S. cerevisiae*, puesto que las cepas que carecen de la actividad de GOGAT son capaces de crecer con la *GDH-NADP⁺* en estas condiciones.

Como se mencionó anteriormente, el fenotipo *GOGAT⁻* depende de la presencia de dos mutaciones génicas, por lo que se hicieron las cruces pertinentes para poder obtener cepas que presentaran una sola mutación. De las tétradas que tenían una segregación 3:1, la tétrada que decidimos analizar tenía la cepa CN36, con las dos actividades muy claras, la cepa CN37 con la GOGAT B, la cepa CN38 con la GOGAT A y la cepa CN 39 que carecía de ambas actividades.

Quisimos estudiar entonces, esta tetrada y a la cepa silvestre en limitación de amonio, pues aunque una cepa *GOGAT* podía crecer en limitación de amonio, quisimos ver cual de las dos *GOGATs* aparecía en estas condiciones. Nuestros resultados mostraron que en efecto, en estas condiciones, predomina la actividad de pH 6.5, y que la actividad de pH 7.0 estaba inhibida por algo que desapareció al dializar, y entonces se hacía evidente la actividad a pH 7.0, menos en la cepa CN 37, donde aumentaba considerablemente la actividad de pH 7.0, y a pesar de eso esta cepa tiene un retardo en el crecimiento comparado con las otras cepas. La cepa silvestre también tenía la actividad de pH 6.5 en estas condiciones, aunque la actividad de GDH no nos permite decir si la *GOGAT* era la única aportación de ácido glutámico en la levadura. Sin embargo, podría ser que la actividad de *GOGAT* de pH 6.5 tenga mayor afinidad por el amonio y en limitación de éste sea importante tener esta actividad además de la GDH.

En fuentes de carbono no fermentables como el etanol y el acetato, la actividad de pH 6.5 aparecía nuevamente, mientras que la actividad de pH 7.0 se encontraba disminuida. Probablemente la *GOGAT* con pH óptimo de 6.5 tenga mayor afinidad por el 2-oxoglutarato, pues en estas condiciones, la poza de este cetoácido es menor, y ayude a la GDH en la formación de ácido glutámico. La cepa CN37 en las condiciones que nosotros medimos no presentó la actividad de pH 6.5, y en cambio se aumentaba la actividad con pH óptimo de 7.0 en las condiciones donde es necesaria la actividad de pH 6.5, como son etanol y acetato, al igual que en limitación de amonio. A pesar de aumentar la actividad de pH 7.0 tuvo un retardo en crecimiento, mayor que las otras dos mutantes, y el crecimiento mejoró al añadir ácido glutámico al medio.

Por otra parte, al dializar los extractos de la cepa CN38 pudimos medir la actividad de pH 7.0, que parecía ser sensible a algún inhibidor, pues en las condiciones donde normalmente se expresa esta actividad de pH 7.0, la cepa CN 38 presentaba la actividad de pH 6.5 y tenía inhibida la actividad de pH 7.0, lo que sugiere que la mutación de esta cepa es modifica a la enzima haciéndola más sensible a algún tipo de efector, presente en estas condiciones; posiblemente esta actividad esté inhibida en el interior de la célula, aunque existe la posibilidad

de que si son dos isoformas, una esté compartimentalizada, por ejemplo, en la mitocondria, por lo que intentamos medir la actividad de GOGAT en mutantes de *S. cerevisiae* ρ^0 , es decir, mutantes con grandes deleciones en el ADN mitocondrial por lo que carecen de mitocondrias, pero fuimos incapaces de medir la actividad de GOGAT tanto en estas cepas como en fracciones mitocondriales de la cepa CN 36 por lo que no podemos concluir nada al respecto.

El hecho de que las cepas CN37 y CN38 mostraran un solo pico de actividad, podría ser explicado suponiendo que las mutaciones presentes en cada una de estas cepas ha afectado a una actividad de GOGAT diferente, o que una de las mutaciones afectó la actividad de GOGAT y la otra ha sido alterada en un gene regulador, cuyo producto está involucrado en un sistema de modificación. Al operar este sistema debería dar lugar a una enzima diferente que mantiene su actividad de GOGAT modificando su pH óptimo.

La diferente sensibilidad a los inhibidores nos sugiere que podrían ser dos isoenzimas, con diferentes pH óptimos: la enzima de pH 6.5 es sensible a diferentes ácidos, aunque el mejor inhibidor fue el ácido succínico, mientras que la enzima de pH 7.0 es mucho más resistente a estos ácidos, y es muy sensible al NAD del orden de 50% a $5\mu\text{M}$, este podría ser el inhibidor que desaparece al dializar, pues la actividad que aparece es la de pH 7.0 aunque nosotros no medimos las pozas intracelulares de NAD por lo que no podemos concluir nada.

Otra posibilidad sería que: es un solo gene, pero que la enzima sufre alguna modificación posttranscripcional que le confiere diferentes pH óptimos y diferente sensibilidad a varios inhibidores.

La cepa silvestre tiene pozas de glutamato mayores a las encontradas en las mutantes *GDH*. Esta gran cantidad de ácido glutámico podría modular negativamente la actividad de la GOGAT A (pH6.5). Esta posibilidad es apoyada por el hecho de que la adición de glutamato al cultivo en MM de la cepa CN36 resulta en una disminución en la actividad de esta GOGAT, aún en extractos dializados. Es probable que en las condiciones donde Masters y Meister (1982) purificaron a la GOGAT, la síntesis de ésta estuviera reprimida por la alta poza de ácido glutámico acumulada, debido a la presencia de la actividad de la GDH.

Como todos los microorganismos estudiados hasta ahora tienen una sola actividad de GOGAT, es necesario purificar esta enzima en *S. cerevisiae* en las condiciones donde encontramos los dos picos en una cepa *GDH⁻* para ver si se encuentran dos enzimas diferentes. Estos experimentos se están llevando a cabo en el laboratorio de la Dra. A. González por Lourdes Valenzuela en colaboración con el Dr. Diego González-Halphen. Una vez puras las enzimas se podrán continuar los estudios bioquímicos. Sin embargo, no sería tan raro encontrar dos enzimas de GOGAT, pues en plantas superiores se ha demostrado claramente la existencia de 2 enzimas GOGAT (Avila y cols, 1987; Miflin y cols, 1980 y Wallsgrave y cols, 1982).

El efecto negativo que tiene el glutamato en la actividad de GOGAT A sugiere que esta actividad podría tener un papel biosintético cuando la actividad de $GDH-NADP^+$ está bloqueada o disminuida. Al respecto se ha mostrado que en *Bacillus subtilis*, que no tiene naturalmente actividad de $GDH-NADP^+$, la GOGAT tiene un papel biosintético y es reprimida por ácido glutámico (Fui Lin Pan y Coote, 1979).

Nuestros resultados indican que en ausencia de la actividad de GDH, las dos actividades de GOGAT tienen un papel fisiológico, porque la falta de cualquiera de ellas resulta en un incremento en el tiempo de duplicación, como se ve en las cepas CN37 y CN38 crecidas en medio mínimo. También la cepa CN35 que tiene la actividad de GDH y no tiene la actividad de GOGAT aumenta su tiempo de duplicación en MM.

El hecho de que la GOGAT B no disminuya al añadir glutamato a un cultivo de MM de la cepa CN36, indica que esta actividad no es sensible a este tipo de regulación, por lo que la GOGAT de pH 7.0 podría jugar un papel en el reciclamiento y/o degradación de la glutamina como propone Lomnitz (1987) para *N. crassa*. Cuando la fuente de carbono es glucosa y el amonio no está limitado, las pozas de glutamato están elevadas, no se necesita sintetizar ácido glutámico, y la GS está sintetizando glutamina, por lo que para regular las pozas de glutamina que en grandes cantidades puede ser tóxica para la célula, la GOGAT transforma esta glutamina en ácido glutámico, haciendo así un ciclo.

La evidencia aquí presentada indica que la actividad de GOGAT tiene un papel importante en la síntesis de glutamato en exceso de amonio, pues las cepas *GDH⁻-NADP⁺*, crecen igual que la silvestre, y se establece que el crecimiento residual encontrado en las mutantes que carecen de la actividad de GDH-NADP⁺ se debe a la actividad de GOGAT y no a la presencia de GDH-NAD, como se había propuesto antes (Grenson y cols., 1974). En malas fuentes de carbono como el etanol y el acetato, la GOGAT que participa aún en la cepa silvestre es la de pH 6.5 (A), al igual que en condiciones de limitación de amonio.

En la levadura, la síntesis de la mayoría de los aminoácidos está regulada de manera coordinada, la privación de un sólo aminoácido da lugar a la desrepresión de actividades enzimáticas de diferentes rutas biosintéticas. A este fenómeno se le conoce como "Control general de la biosíntesis de aminoácidos"; este mecanismo es mucho más complejo que en procariones donde los genes están organizados en operones. En los organismos eucariotes, donde no existen estos operones, los genes de una misma ruta biosintética están dispersos en diferentes cromosomas; sin embargo, existe la regulación coordinada de estos genes. Ejemplos de las rutas biosintéticas que se encuentran bajo el control general son las de aminoácidos ramificados, los aminoácidos básicos, la serina y la valina (Niederberger y cols. 1981); sin embargo, no todas las enzimas de una misma ruta se encuentran bajo el mismo control. Por otro lado, la magnitud de la desrepresión también varía según la enzima que se trate.

Se ha encontrado que la desrepresión generada por la limitación de un aminoácido requiere el producto de genes regulatorios positivos denominados GCN que a su vez están regulados por moduladores negativos, denominados GCD. El producto del gene GCN4 es una proteína que se une a ADN con un motivo llamado bZIP con varios aminoácidos básicos unido a un "zipper" de leucinas compuesto por 30 aminoácidos con una leucina cada 7 aminoácidos. Se sabe que el motivo bZIP se une al ADN y que el "zipper" de leucinas dimeriza a la proteína (Taliani y cols. 1990). Los productos de GCN1, GCN2 y GCN3 regulan la expresión del ARN mensajero de GCN4 (Thireos y cols. 1984, Hineshush, 1985) y los productos de GCD1, GCD2, GCD10, GCD11 y GCD13 funcionan como represores de GCN4 (Hineshush, 1985, 1988).

Messenguy y cols. (1990) proponen que esta proteína GCN4, puede estar relacionada con las proteínas que se expresan durante el stress, como son las proteínas de heat shock, pues aunque no está coordinadamente regulada con estas proteínas como es el caso de la ubiquitina si se induce en células crecidas toda la noche a la temperatura no permisiva en *S. cerevisiae* (37°C) (las proteínas de heat shock se expresan con solo poner a las células 30 minutos a la temperatura no permisiva). También se ha reportado que GCN4 regula otros genes como el LPD1 (que codifica para la lipoamida deshidrogenasa) (Ross y cols, 1988). También se ha reportado que la GS se encuentra regulada por este gene (Mitchel y Magasanik.1984).

La mutante GOGAT⁻ (CN39), reportada por Folch ha sido transformada con el banco unicopia de *S. cerevisiae* por A González (Comunicación personal) y el 90 % de las transformantes que recuperan la actividad de GOGAT fueron complementadas con un plásmido que tiene clonado un gene denominaron "GUS 2", la secuencia de este gene es idéntica a la reportada por Georgakopoulos y Thireos (1992) gene que ellos denominan GCN5. Estos autores clonaron este gene a partir de un estudio completamente diferente en condiciones de limitación de aminoácidos, donde se desreprimen diferentes proteínas que participan en la síntesis de aminoácidos a través de un mecanismo de control general. Este gene GCN5, tiene una región regulatoria, y ellos proponen que es un coactivador del GCN4 cuando el sitio de pegado de éste es débil, es decir, cuando la secuencia de reconocimiento de GCN4: 5' ATGACTCAT 3' tiene alguna modificación. Este gene GCN5 también se necesita para la actividad de los genes HAP2-HAP3-HAP4 complejo de activación transcripcional, que regula la transcripción de genes con funciones respiratorias.

El que el 90 % de las transformantes de la cepa CN 39 se hayan complementado con este gene, aunque no se ha reportado que la GOGAT esté regulada por este mecanismo general de GCN4-GCN5, nos hace pensar que cuando menos una de las actividades de GOGAT que nosotros estudiamos, la actividad de GOGAT a pH 6.5, esté regulada de la misma manera.

Otra posibilidad es que para obtener el fenotipo de av. otrofia por ácido glutámico, en las condiciones donde nosotros las buscamos, con cepas que de por sí eran auxotrofas de histidina y

lisina, se necesita mutar a la GOGAT y a alguna transaminasa que con los aminoácidos del medio esté dando glutamato y que esta transaminasa se encuentre bajo el mecanismo de control general de GCN4-GCN5.

CONCLUSIONES:

- En limitación de amonio y en fuentes pobres de carbono como etanol y acetato la actividad que encontramos es la de pH 6.5, sin embargo la enzima de pH 7.0 también es sintetizada, puesto que aparece en los extractos dializados, aunque muy probablemente *in vivo* no esté activa.
- La enzima de pH 6.5 es sensible a ácido succínico mientras que la de pH 7.0 es sensible a NAD.
- La cepa CN37 en las condiciones que medimos no tiene la actividad de pH 6.5, y la actividad de pH 7.0 está aumentada.
- En la cepa CN38 la actividad de pH 7.0, es más sensible a algún inhibidor, pues en extractos dializados somos capaces de medir esta actividad, sin embargo, donde la cepa CN 36 presenta ambas actividades, la cepa CN38 solo presenta la actividad de pH 6.5. Un posible inhibidor podría ser isocitrato pues la actividad a pH 7.0 en la cepa CN38 es más sensible a éste inhibidor, que la cepa CN36. Esto nos sugiere que *in vivo* la enzima este inactiva.
- La actividad de pH 6.5 desaparece en presencia de glutamato, porque cuando en el medio mínimo se dió el shock de ácido glutámico aún en los extractos dializados no aparece esta actividad, mientras que la enzima de pH 7.0 no parece estar bajo esta regulación negativa.
- Que la cepa silvestre, GDH⁺, (por lo que tiene altas pozas de glutamato intracelular) no tenga la actividad de pH 6.5, permite proponer que esta actividad pueda ser regulada negativamente por glutamato.

-Cuando la cepa silvestre es crecida en superagitación, hay mayor actividad de GOGAT que en microaerofilia; el metabolismo en general es más rápido, pero en ambas condiciones en una cepa *GDH+* la actividad que se detecta en medio mínimo es la de pH 7.0. Es necesario una cepa *GDH-* para poder distinguir las dos actividades en estas condiciones como es el caso de la cepa CN36.

BIBLIOGRAFIA

- Alberts et al. *Molecular Biology of the cell*. 2nd Edition. Edit. Garland, 42-43p. New York (1989).
- Anderson, MP, Vance, C.P., Heichel, G.H and Miller, S. (1989) *Plant. Physiol.* **90**: 351-358
- Avila, C., Cánovas, F.M., Nuñez de Castro, I. and Valpuesta, V. (1984) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* **122**: 1125-1130.
- Avila, C., Botella, J.R., Cánovas, F.M., Nuñez de Castro, I. and Valpuesta, V. (1987). *Plant. Physiol.* **85**: 1036-1039.
- Baldani, V.L.D. and Dokereiner J. (1980). *Soil. Biol. Biochem.* **12**: 433-439.
- Bogoñez, E., Salrustegui, J. and Machado, A. (1985). *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1425-1432.
- Bohannon, D.E., Rosenbrantz, M.S. and Sonenshein, A.L. (1985). *J. Bacteriol.* **163**: 957-964.
- Boland, M.J. and Benny, A.G. (1977). *Eur. J. Biochem.* **79**: 355.
- Boland, M.J. and Court, C.B. (1981). *Biochem. Biophys. Acta.* **657**: 539.
- Botella, J.R., Verbelen, J.P. and Valpuesta, V. (1988). *Plant. Physiol.* **87**: 255-257.
- Bravo, A. and Mora, J. (1988). *J. Bacteriol.* **170**: 980-984.
- Brenchley, J.E., Prival, M.E. and Magasanik, B. (1973). *J. Biol. Chem.* **248**: 6122-6128.
- Calderón, J. and Mora, J. (1985). *J. Gen. Microbiol.* **131**: 3237-3242.
- Castaño, I., Bastarrachea, F. and Covarrubias, A.A. (1988). *J. Bacteriol.* **170**: 821-827.
- Chen, F.L. and Cullimore, J.V. (1988). *Plant. Physiol.* **88**: 1411-1417.
- Chiu, J. and Shargool, P.D. (1979). *Plant. Physiol.* **63**: 409-415.
- Darrow et al. (1981). *Current perspectives in nitrogen fixation*, Australian Academy of Science. 182-185.
- Darrow, R., (1980). Academic Press Inc. 139-166.
- Dávila, G., Lara, M., Guzmán, J. and Mora, J. (1980). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **92**: 134-140.

- Dean, D. R. and Aronson, A. I. (1980). *J. Bacteriol.* **141**:985-988.
- Desphande, K. L. and Kane, J. F. (1980). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **93**:308-314.
- Deuel, T. F. and Prusiner, S. (1974). *J. Biol. Chem.* **249**: 257-264.
- Donald, R.G.K. and Ludwig, R.A. (1984) *J. Bacteriol.* **158**: 1144-1151.
- Drillien, R. and Lacroute, F. (1972). *J. Bacteriol.* **109**: 203-209.
- Dubois, E. and Grenson, M. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **60**:150-155.
- Folch, J. (1986). Tesis de licenciatura. Unidad Académica de los ciclos Profesionales y de Posgrado del C.C.H. UNAM.
- Freese, E. Park, S. W. and Cashel, M. (1964). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **51**:1164-1172.
- Fui Lin Pan and Coote, J. G. (1979). *J. Gen. Microbiol.* **112**:373-377.
- Garcíarrubio, A., Lozoya, E., Covarrubias, A.A. and Bolívar, F. (1983). *Gene*. **26**: 165-170.
- Georgakopoulos, T. and Thireos, G. (1992). *EMBO J.* **11**: 4145-4152.
- Grenson, M., Dubois, E. and Piotrowska, M. (1974) *Mol. Gen. Genet.* **128**: 73-80.
- González, A., Tenorio, M., Vaca, G. and Mora, J. (1983). *J. Bacteriol.* **155**: 1-7.
- González, A., Olivera, H., Rodríguez, L. and Soberón, M. (1985). *J. Gen. Microbiol.* **135**: 2565-2569.
- Henning, S.B. and Ginsburg, A. (1971). *Arch. Biochem. Biophys.* **144**: 611-620.
- Hernández, G., Sánchez-Pescador, R., Palacios, R. and Mora, J. (1983). *J. Bacteriol.* **154**. 524-528.
- Hecht, U., Oelmüller, R. Schmidt, B. and Mohr, H. (1988). *Planta*. **175**: 130-138.
- Hinnessbush, A.G. (1985) *Mol. Cell. Biol.* **5**: 2349-2360.
- Hinnessbush, A.G. (1988) *Microbiol. Rev.* **52**: 248-273.
- Hummelt, G. and Mora, J. (1980) *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **92**: 127-135.
- Hummelt, G. and Mora, J. (1980) *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96**. 1688-1694.
- Kendall, A.C., Wallsgrove, R.M., Hall, N.P., Turner, J.C. and Lea, P.J. (1986). *Planta*. **168**: 316-323.

- Kispał, G. Rosenkrantz, M., Guarente, L. and Srere, P.A. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**: 11145-11149.
- Kusnan, M.B., Berger, M.G. and Fock, H.P. (1987). *J. Gen. Microbiol.* **133**: 1235-1242.
- Lehninger. *Biochemistry*. 1st Edition. (1970). Edit. Worth, New York. 269-270.
- Lomnitz, A., Calderón, J., Hernández, G. and Mora, J. (1987) *J. Gen. Microbiol.* **133**: 2333-2340.
- Lozoya, E., Sánchez-Pescador, R., Covarrubias, A., Uichido, I. and Bolivar, F. (1980). *J* **44**: 616-621.
- Magasanik, B. and Rothstein, D.M. (1980). Acad. Press. Inc. 61-68.
- Márquez, A.J., Avila, C., Forde, B.J. and Wallsgrove, R.M. (1988). *Plant. Physiol. Biochem.* **26**: 645-651.
- Masters, D.S. and Meister, A. (1982). *J. Biol. Chem.* **257**: 8711-8715.
- Matoh, T., Ida, S. and Takahashi, E. (1980). *Plant. Cell. Physiol.* **21**: 1461-1474
- Matoh, T. and Takahashi, E. (1982). *Pkabta*. **154**: 289-294.
- Mazón, J.J. (1978). *J. Bacteriol.* **133**: 780-785.
- Meers, J.L., Tempest, D.W. and Brown, C.M. (1970). *J. Gen. Microbiol.* **64**: 187-194.
- Messenguy, F. and Snerens, B. (1990) **223**: 257-263.
- Miller, R.E. and Stadtman. (1972). *J. Biol. Chem.* **247**: 7407-7419.
- Mitchell, A.P. and Magasanik, B. (1983). *J. Biol. Chem.* **258**: 119-124.
- Mitchell, A.P. and Magasanik, B. (1984). *Mol. Cell. Biol.* **4**: 2767-2773.
- Nagatani, H., Shimizu, J. and Valentine, R.C. (1971). *Arch. Microbiol.* **79**: 164-175.
- Niederberger, P., Miozzari, G. and Hutte, R. (1981) *Moll. Cell. Biol.* **1**: 584-593.
- Osmond, C.B. and Woo, K.C. (1982). *Plant. Physiol.* **69**: 591.
- Osmond, C.B., Woo, K.C., Morot-Gaudry, R.E. and Summons. (1982). *Plant. Physiol.* **70**: 1514-1517.
- Pahel, G., Rothstein, D.M. and Magasanik, B. (1982). *J. Bacteriol.* **150**: 202-213.
- Pahel, G., Zelenetz, A.D. and Tyler, B.M. (1978). *J. Bacteriol.* **133**: 139-148.

- Pateman, J.A.(1969). *Biochem. J.* **115**:769-783.
- Patriquin, D.G. Dobreiner, J. and Jam, D.K.(1983). *Can. J. Microbiol.* **29**: 900-915.
- Roon, J.R., Harvey, L. and Larimore, F.J. (1974). *118*: 89-92.
- Roon, R.J. and Even, H.L.(1978). *J. Bacteriol.* **116**: 36-40.
- Sakakibara, H., Watanabe, M., Toshiharu, H. and Sugiyama, T. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**: 2028-2035.
- Sakamoto, N., Kotre, A.M. y Savagean, M.A. (1975). *J. Bacteriol.* **124**: 775-778.
- Sánchez, F., Calva, E., Campomanes, M., Blanco, L., Gúzman, J., Saborio, J.L. and Palacios, R. (1980). *J. Biol. Chem.* **255**: 2231-2234.
- Senior, P.J. (1975). *J. Bacteriol.* **123**: 407-418.
- Servín-González, L. and Bastarrachea, F. (1984). *J. Gen. Microbiol.* **130**: 3071-3077.
- Shapiro, B.M. and Stadtman, E.R. (1968). *J. Biol. Chem.* **243**. 3769-3772.
- Shapiro, B.M. and Stadtman, E.R. (1970). *Annu. Rev. Microbiol.* **24**: 501.
- Somerville, C.R. and Ogren, W.L. (1980). *Nature.* **286**: 257.
- Stryer. *Biochemistry.* (1988).
- Suzuki, A., Vidal, J. and Gadal, P. (1982). *Plant. Physiol.* **170**: 827.
- Talanian, R.V., Mcknight, C.J. and Kim, P.S. (1990) *Science* **249**: 769-771.
- Tempest, D.W., Meers, J.L. and Brown, C.M. (1970). *Biochem. J.* **117**: 405-407.
- Tyler, B. (1978) *Ann. Rev. Biochem.* **47**: 1127-1162.
- Umbarger, H.E. (1978). *Ann. Rev. Biochem.* **47**: 533-606.
- Wallsgrave, R.M. Lea, P.J. and Mifflin, B.J. (1982). *Planta.* **154**: 473-476.
- Watanabe, M. Hayashi, M. and Sugiyama, T. (1985). *Soil Sci. Plant. Nutr.* **91**: 578-580.
- Westby, C.A., Enderlyn, C.S., Steinberg, N.A., Joseph, C.M. and Meeks, J.C. (1987). *J. Bacteriol.* **169**: 4211-4214.
- Wiame, S.M. (1985) *Adv. Microb. Physiol.* **26**: 287.
- Wootton, J.C., Chambers, G.K., Holder, A.A., Baron, A.J., Taylor, J.G., Fincham, J.R.S., Blumenthal, K.M., Moon, K. and Smith, E.L. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**:4361- 4365.