

95
290



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ASIMILACIÓN DE AMONIO EN LA LEVADURA
Kluyveromyces lactis.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

SIMÓN GUZMÁN LEÓN



MEXICO, D. F.

FACULTAD DE CIENCIAS
REGION UCOBAE

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Baule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Asimilación de amonio en la levadura Kluyveromyces lactis
realizado por

Guzmán León Simón

con número de cuenta 8533999-4, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. González Maniarréz Alicia. *Alicia*

Propietario

M.enC. Valenzuela Sánchez Maria de Lourdes. *Maria de Lourdes*

Propietario

M.enC. Alba Lois Luisa Alvarina. *Luisa*

Suplente

Dra. Pardo Semo Annie. *Annie*

Suplente

Biol. Castillo Pompeyo Carlos. *Carlos*

[Firma]
Consejo Departamental de Biología
M. en C. Alejandro Martínez Mena
DIRECTOR GENERAL
BIOLOGIA

Dedicatoria

A ustedes padres por que han sido siempre un apoyo incondicional e imprecindible para lograr esta meta. Los quiero mucho. Gracias...

A ustedes hermanos por ser el complemento fundamental para esté paso. Con todo mi respeto, Gracias...

A mis pocos, pero valiosos amigos y amigas por que me brindaron su amistad en todo momento.

Agradecimientos

A la Dra. Alicia González Manjarréz por su exquisita disposición para guiar mi superación a cada día. Por ser Única... Gracias por tu confianza.

Agradezco especialmente el apoyo y co-dirección para este trabajo de la M. en IBB Lourdes Valenzuela Sanchez.

Al Dr. Diego González Haiphen, al Dr. Roberto Carla Ortega y al amigo Jorge Ramirez por que siempre aportaron su experiencia en este trabajo.

A la tecnico Cristina Aranda.

A Sandra, Lichi, Sol, Lina, Felipe, Augusto, y Gabriel por sus comentarios y aportaciones.

A Miriam y Ember por su fina atención fuera de los horarios de consulta.

A los revisores de este trabajo por que es un placer aprender de ustedes.

Este trabajo se realizo en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM; en el Dpto. de Microbiología, laboratorio 301-Oriente de la Dra. Alicia González Manjarréz.

Los más grandes entre los buenos comenzaron siendo pequeños como tú; pero un día y otro día, multiplicaron sus afanes, renovaron sus propósitos, y, trabajando siempre con la alegría de la esperanza, alcanzaron cada vez una nueva meta. Sé tu así: Sonriendo, estudia, persiste y realiza para que "cada uno de tus pasos sea una meta, sin que deje de ser un paso".

INDICE

Resumen

1 Introducción

1.1.- Biología de la levadura <i>Kluyveromyces lactis</i>	3
1.2.- Asimilación de nitrógeno.....	5
1.3.- Glutamino sintetasa.....	8
1.4.- Glutamato sintasa.....	11

2 Antecedentes.....12

3 Objetivos.....15

4 Materiales y métodos.....16

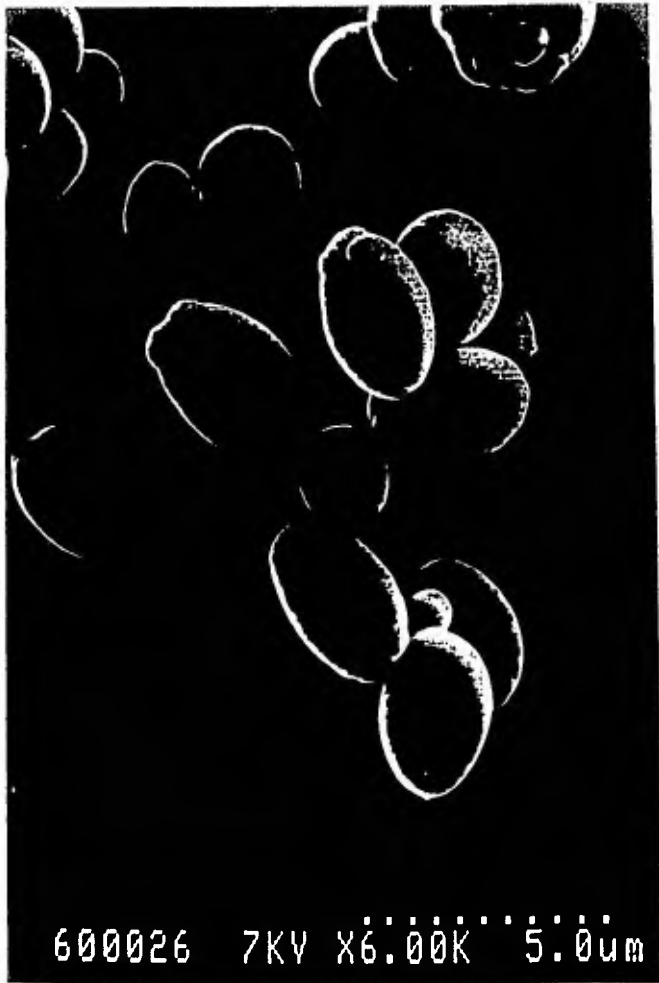
5 Resultados.....23

6 Discusión y Conclusiones.....42

7 Referencias.....48



600026 7KV X6.00K 5.0um



Resumen

El presente trabajo demuestra que la levadura *Kluyveromyces lactis* utiliza las dos vías previamente descritas para la asimilación del amonio y la síntesis de glutámico: la enzima glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH (GDH-NADPH), y la glutamino sintetasa (GS) acoplada con la glutamato sintasa dependiente de NADH (GOGAT-NADH).

La purificación de la enzima GOGAT de *K. lactis* MD 2/1 nos dice que es un polipéptido de alto peso molecular (200 KDa). El análisis por inmunorréplicas tipo Western llevado a cabo con el anticuerpo contra la GOGAT de *Saccharomyces cerevisiae* mostró reacción cruzada con la GOGAT de *K. lactis*. Por otro lado este anticuerpo no reconoce la GOGAT-NADPH de *Escherichia coli*. El análisis del RNA y DNA totales de *K. lactis*, utilizando como sonda un fragmento EcoR1-EcoR1 de 4.3 Kb del gen GOGAT de *S. cerevisiae*, dió una señal positiva de hibridación. El tamaño del RNA-mensajero se encontró alrededor de 7-8 Kb, que corresponde al tamaño esperado para una proteína de 200 KDa.

La actividad obtenida de GDH-NADPH en *K. lactis* MD 2/1 es cinco veces menor a la reportada en *S. cerevisiae*. Una mutante totalmente carente de actividad GDH-NADPH se obtuvo por transformación de la cepa MD 2/1 *uraA* con un vector linearizado e integrativo de levadura que contiene el fragmento de 390 pb del gen estructural GDH-NADPH. Esta mutante crece en amonio con el mismo tiempo de duplicación que la cepa silvestre, lo cual sugiere que en *K. lactis* la ruta GS-GOGAT tiene el

papel principal en la síntesis de glutámico. El análisis por Southern reveló que el gen de GDH-NADPH se encuentra en el cromosoma VI de esta levadura.

1 Introducción

1.1 Biología de la levadura *Kluyveromyces lactis*:

La levadura *Kluyveromyces lactis* es un ascomyceto que se encuentra taxonómicamente ubicado en la familia de los Saccharomycetaceae junto con *Saccharomyces*, *Pichia* y *Schizosaccharomyces*, los cuales se caracterizan por tener esporas (redondas) dentro de un asca. Esto implica que pueden reproducirse sexualmente, pero además se pueden reproducir asexualmente por gemación y sólo algunos por fisión.

K. lactis es una cepa comúnmente heterotálica. La complementariedad de los tipos de apareamiento se designan α y α .

El ciclo de vida de esta levadura es esencialmente similar al de *S. cerevisiae*, sin embargo su fase diploide es transitoria. El cultivo de células diploides tiende a esporular espontáneamente razón por la cual esta levadura es muy útil en experimentos de genética.

La forma de *K. lactis* va de esférica a oval y algunas veces es más pequeña que *S. cerevisiae*. Su hábitat es diverso, pero muchas de ellas se han aislado a partir de productos derivados de la leche.

K. lactis es esencialmente aerobio y bajo estas condiciones fermenta glucosa y produce etanol, pero el sistema respiratorio funciona principalmente para su fase de crecimiento.

Aparentemente la biogénesis del sistema respiratorio en esta levadura no es sensible a represión por glucosa. Este fenómeno ha sido descrito para muchas especies *petite*-negativas que generalmente se proponen como

aerobios obligados. De esta manera, a *K. lactis* se le conoce como una petite-negativa (Weselowski, Breunig y Fukuhara).

1.2 Asimilación del nitrógeno.

En todos los sistemas biológicos la asimilación de nitrógeno tiene como consecuencia la síntesis de macromoléculas esenciales para el crecimiento, razón por la cual estas rutas del metabolismo nitrogenado pueden dividirse en :

1) Las rutas de asimilación necesarias para la utilización del nitrógeno a partir de compuestos disponibles en el medio.

2) Las rutas biosintéticas que llevan a la formación de compuestos que contienen nitrógeno en la célula.

Los pasos específicos en estas rutas varían con el organismo y para algunas fuentes de nitrógeno, pero virtualmente en todas las células el glutámico y la glutamina son los principales donadores de nitrógeno (Tyler, B. 1978; Magasanik, B. 1992).

En bacterias y probablemente en levaduras aproximadamente el 88% de todo el nitrógeno celular se deriva del grupo amino del glutámico y un 12% del grupo amido de la glutamina (Miller y Stadman 1972).

El glutámico es el donador primario de grupos amino en los aminoácidos, mientras que el grupo amido de la glutamina es el donador directo de nitrógeno para ciertos pasos en la biosíntesis de algunos aminoácidos, purinas, pirimidinas y otros compuestos relacionados.

De todo esto, la pregunta inmediata es: ¿Cómo es incorporado el nitrógeno para sintetizar glutámico y glutamina ?

Los organismos que no pueden fijar el nitrógeno atmosférico, como lo hacen algunas bacterias y algas azul-verdes, lo obtienen en forma combinada como amonio, nitritos, nitratos y compuestos más complejos como son los aminoácidos.

El amonio se ha utilizado mucho como fuente única de nitrógeno en medios de crecimiento para levaduras, bacterias y plantas, donde están descritas las vías de su asimilación.

La entrada de amonio a la célula se facilita por permeasas (pueden ser dos o tres dependiendo del microorganismo) de alta afinidad ($K_M=0.25mM$) y de baja afinidad pero de alta capacidad por amonio ($V_{max}=50\text{ nmol/min/mg de proteína}$)(Magasanik, B. 1992).

Ya en el interior celular el amonio puede seguir dos rutas principales para la biosíntesis de glutámico. En la primer ruta, la NADPH-glutamato deshidrogenasa (NADPH-GDH) cataliza la aminación reductiva del 2-oxoglutarato para formar glutámico, por lo que su función sería la asimilación del amonio y la síntesis de glutámico (Holzer y Schneider 1957). La existencia de una ruta alternativa para la biosíntesis de este aminoácido, fue demostrada por Tempest y cols.(1970). En esta ruta el glutámico es aminado para formar glutamina por la glutamino sintetasa (GS) y el grupo amido es luego transferido reductivamente al 2-oxoglutarato por la Glutamato Sintasa (GOGAT), resultando en la síntesis de dos moléculas de glutámico (Fig.1). Debido al reclutamiento del glutámico a esta ruta se le denominó GS-GOGAT. Las funciones

propuestas para estas enzimas son : La GS sintetiza glutamina y asimila amonio, mientras que la GOGAT degrada glutamina y sintetiza glutámico.

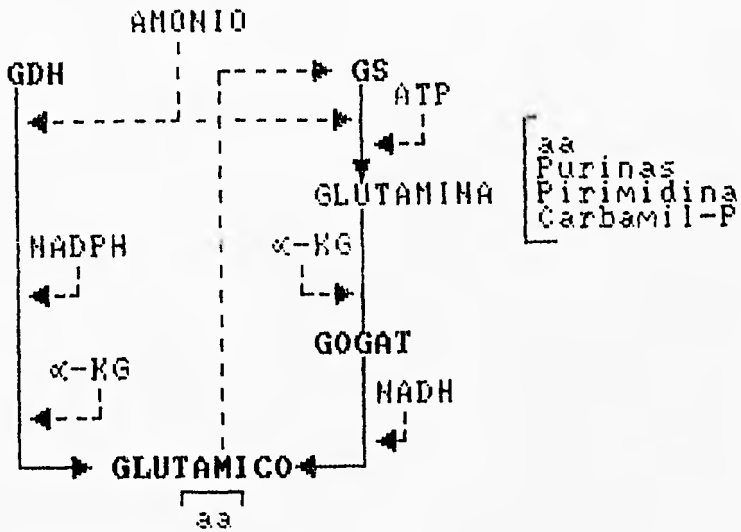


Fig 1.- Asimilación de amonio y síntesis de glutámico por la vía GDH-NADPH y la vía GS-GOGAT.

1.3 Glutamino Sintetasa (GS)

La función de la enzima GS (producto del gen *GLN1*) es catalizar la síntesis de glutamina que es un paso esencial para el crecimiento en un medio con glucosa y amonio como única fuente de carbono y nitrógeno. Cepas mutantes en esta vía requieren de glutamina suplementada en el medio de crecimiento.

Estudios hechos en *E.coli* y *Salmonella typhimurium* revelaron que la GS se reprime en presencia de glutamina, o bien por los productos finales del metabolismo de este aminoácido o por exceso de amonio. En estas condiciones la enzima se encuentra parcialmente adenilada y pierde la actividad de síntesis de glutamina; por otro lado cuando el amonio es limitante, GS-no adenilada, conserva su actividad de transferasa y sintetasa: asimilar el amonio y sintetizar glutamina. Los valores más altos de actividad de GS se encuentran cuando la fuente de nitrógeno es el glutámico (Reitzer y Magasanik 1987).

En *S. cerevisiae* no se tiene el mismo mecanismo de adenilación pero se ha propuesto que la pérdida de actividad de sintetasa resulta en la modificación de grupos sulfhidrilos de la enzima (Kim y Rhee 1988). Sin embargo los niveles más altos de actividad de GS se encuentran cuando la fuente única de nitrógeno es el glutámico o amonio, tal como sucede en bacterias.

La GS purificada de *E. coli* tiene un peso molecular de 600 KDa y esta formada por doce subunidades idénticas. Las subunidades se arreglan en

dos unidades hexagonales con un espacio entre ellas de 4.5 nm. Para su estabilidad requiere de Mg^{2+} o Mn^{2+} .

1.4 Glutamato Sintasa (GOGAT)

La enzima GOGAT es una amidotransferasa que ha sido descrita en una gran variedad de bacterias (Nagatani 1971; Tempest 1973) en algunas levaduras (Roon y cols., 1974; Hummelt y Mora, 1980; Zwart y Harder, 1983; Barel y MacDonald, 1993; Cogoni y cols., 1995) y en plantas (Suzuki y Gadal, 1984; Lea y cols., 1990; Sakakibara y cols., 1991).

De forma natural y a pesar de llevar a cabo la misma función, podemos encontrar tres distintas formas de la GOGAT: GOGAT-NADH, GOGAT-NADPH y GOGAT-Ferredoxina. Además cada una de éstas difiere en masa molecular, forma oligomérica y el cofactor que utiliza.

La GOGAT-NADH de los nódulos de alfalfa y lupino está formada por una subunidad de masa molecular que no excede de 200 KDa; lo interesante de la GOGAT de alfalfa es el presentar secuencias de aminoácidos que corresponden tanto a la subunidad pequeña como a la subunidad grande de la GOGAT-NADPH de bacterias.

En bacterias la enzima GOGAT, al igual que en plantas y levaduras es una flavoproteína hierro-azufre, constituida por un péptido de bajo peso molecular (57 KDa) y otro péptido de alto peso molecular (155 KDa). En *E.coli* la GOGAT tiene un peso molecular aproximado de 800 KDa indicando una asociación en 4 dímeros (Miller y Stadman, 1972) y en

Klebsiella aerogenes se ha reportado como un unico dímero (Trotta y cols., 1974).

Las GOGAT-NADH de levaduras, al igual que las de plantas y a diferencia de las GOGATs de procariotes contienen un solo polipéptido. Masters y Meister en 1982 purificaron a homogeneidad la GOGAT-NADH de *S. cerevisiae* y obtuvieron un dímero de 265 KDa que comprende una subunidad de 169 KDa y otra de 61 KDa; posteriormente en el laboratorio de la Dra. Alicia González Manjarrez, se purificó a homogeneidad la GOGAT-NADH de esta levadura y se demostró que es un solo polipéptido que se arregla como un trímero formado por monómeros de aproximadamente 200 KDa, es decir, masas moleculares muy semejantes a las enzimas GOGAT-NADH descritas para otros eucariotes como *Neurospora crassa* y plantas (Cogoni y cols., 1995).

En lo que se refiere a la regulación de esta enzima se conoce muy poco: en *K. aerogenes*, *E. coli* y *S. cerevisiae* se ha encontrado que la actividad específica de GOGAT se incrementa cuando el amonio en el medio de cultivo es limitante (< 1 mM); y en exceso de amonio el nivel de actividad disminuye. Lo mismo sucede cuando se proporciona glutámico como única fuente de nitrógeno; y niveles de actividad enzimática intermedios se obtienen en presencia de glutamina (Tyler, B. 1978).

1.5 Glutamato deshidrogenasa (GDH-NADPH)

Las GDH-NADPH de origen animal, vegetal y de hongos están generalmente compuestas de seis subunidades idénticas con un peso molecular entre 43 y 50 KDa. Su función es la biosíntesis de glutámico, a diferencia de las GDH-NAD*s tetraméricas cuya función es el catabolismo del mismo aminoácido (Mifflin y cols, 1980).

Los niveles más altos de actividad de esta enzima se encuentran cuando la fuente de nitrógeno es el amonio en concentraciones mayores de 1 mM por lo cual en condiciones de limitación de amonio la eficiencia de esta enzima para asimilarlo es baja, es decir la K_m por el amonio en esta enzima es alta (>1mM) (Miller y Stadman, 1972; Mäntsälä y Zalkin, 1976). La actividad de esta enzima también disminuye cuando la fuente de nitrógeno es el glutámico.

En levaduras el nivel máximo de actividad específica de la GDH-NADPH es unas diez veces mayor que la actividad máxima encontrada para la GOGAT-NADH (Miller y Magasanik 1990).

Estas enzimas GDH-NADPH son de las proteínas mejor conservadas estructuralmente, con una tasa evolutiva de aproximadamente 1.8 mutaciones por cada 100 residuos en 10^8 años, es por tal razón que son una buena herramienta para estudios evolutivos (Benachenhou y cols., 1993).

2 Antecedentes :

La vía GS-GOGAT ha sido reportada en diferentes microorganismos (Roon y cols., 1974; Senior, 1975; Hummelt y Mora, 1980; Bravo y Mora, 1988; Marqués y cols., 1992; Cogoni y cols. 1995) y en plantas superiores (Mifflin y cols., 1980; Suzuki y Gadal, 1984; Chen y Cullimore, 1988; Anderson y cols., 1989; Sakakibara y cols., 1991; Hayakawa y cols., 1992).

La presencia de dos rutas para la biosíntesis de glutámico (GS-GOGAT y GDH-NADPH) ha sido abierta a discusión con el fin de responder porqué existen estas dos vías que finalmente llevan a un mismo producto. En plantas, el ciclo GS-GOGAT constituye la principal ruta de asimilación de amonio (Mifflin y cols., 1980). En *K. aerogenes*, GS-GOGAT funciona para asimilar amonio y sintetizar glutámico cuando la concentración de amonio es baja, mientras que la GDH toma este papel cuando las células están cultivadas en exceso de amonio (Tempest y cols., 1970; Meors y cols., 1970).

Las actividades de GOGAT y GDH en *E. coli* están también presentes pero aún se desconocen sus funciones precisas (Senior, 1975). En esta bacteria se propuso que la pérdida de GOGAT resultaba en la incapacidad para usar una variedad de fuentes de nitrógeno (fenotipo *Ntr*-). Sin embargo Castaño y cols. (1992) probaron que la inducción de enzimas *Ntr* es independiente de la actividad de GOGAT, aislando mutantes en GOGAT capaces de inducir histidasa. Recientemente Helling (1994) propuso que en *E. coli*, la biosíntesis de glutámico podría proceder

a través de GDH-NADPH cuando la célula esta limitada de energía, mientras que la vía GS-GOGAT podría funcionar cuando la célula no está en limitación de energía (fuente de carbono).

El papel de las vías GDH y GS-GOGAT se ha estudiado en algunas levaduras. En *Neurospora crassa*, se ha demostrado que la principal función de GOGAT es el reciclamiento de nitrógeno orgánico de la glutamina a glutámico y que ambas rutas están involucradas en la síntesis de glutámica tanto en exceso como en limitación de amonio (Laminitz y cols. 1987).

El estudio de las actividades de estas dos vías de asimilación de amonio en cultivos continuos de *Candida albicans* y el aislamiento de auxótrofos de glutámico en *Schizosaccharomyces pombe* indicó que la ruta GS-GOGAT es la principal vía para asimilar el amonio en estas levaduras (Halmes y cols.,1989; Barel y MacDonald,1993). Mutantes de *S. cerevisiae* carentes de GDH-NADPH o de GOGAT también han sido obtenidas (Falch y cols.,1989; Miller y Magasanik, 1990; Cogoni y cols.,1995). Aquellas alteradas en GDH-NADPH muestran un tiempo de duplicación das veces más alto que el de la cepa silvestre cuando se crecen en amonio como única fuente de nitrógeno (Falch y cols.,1989). La carencia de actividad de GOGAT no muestra ningún fenotipo cuando estas levaduras se crecen ya sea en alta o bajo amonio (Falch y cols.,1989). Así en *S. cerevisiae* a la GDH-NADPH se le ha asignado un papel en la síntesis de

glutámico, mientras que la participación de GOGAT ha permanecido
Incierta.

3 Objetivos

Objetivo General :

Establecer como se lleva a cabo la asimilación del amonio y síntesis de glutámico en la levadura *Kluyveromyces lactis* mediante la vía GDH-NADPH y la vía GS-GOGAT.

Objetivos particulares :

Determinar la presencia de las enzimas GDH-NADPH, GS y GOGAT involucradas en la asimilación del amonio y síntesis de glutámico en la levadura *K. lactis*.

Obtención de mutantes carentes de actividad en GDH-NADPH con el fin de determinar su papel en la biosíntesis de glutámico.

Localización cromosomal del gen GDH-NADPH en *K. lactis*.

Obtener una fracción purificada de la enzima GOGAT de *K. lactis* para establecer su masa molecular y compararla con enzimas GOGAT de otros organismos (procariotes y eucariotes).

Análisis de RNA y DNA totales de *K. lactis* utilizando una sonda heteróloga del gen estructural de GOGAT (*GLT1*) de *S. cerevisiae*.

4 Materiales y Métodos:

Condiciones de crecimiento. La cepa silvestre *K. lactis* MD 2/1 (MAT α -argA lysA uraA) y la cepa carente de actividad de GDH-NADPH (JR1) se crecieron en medio mínimo (MM) que contiene sales, elementos traza y vitaminas según la fórmula de Base Nitrogenada de Levadura (Laboratorios Difco, Detroit, Mich.). Se utilizó glucosa al 2% (p/v) como única fuente de carbono y 38 mM de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ fue utilizado como única fuente de nitrógeno. Los aminoácidos requeridos por auxotrofia se adicionaron a un 0.01% (p/v).

El MM también se utilizó en los experimentos donde se varía la concentración de glucosa: 0.5%, 2%, 4% y 6%; y la concentración del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$: 5 mM y 76 mM; o bien la fuente de nitrógeno : glutamina 7.3 mM y glutámico 7.3 mM.

Las células se incubaron en agitación constante (250 rpm) y a 30°C. El crecimiento de *K. lactis* se midió leyendo la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro LKB cada dos horas.

Determinación de actividades enzimáticas de GS, GOGAT y GDH

Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo en extractos celulares que se obtuvieron por rompimiento celular, resuspendiendo las células en fosfato de potasio 0.1 M pH 7.5, 1 mM EDTA y usando perlas de vidrio y Vórtex (6 ciclos de 1 min).

La actividad de GOGAT se determinó por el método descrito por Roon y cols. (1974). La concentración de los sustratos en la mezcla de reacción son: 2-Oxoglutarato 5 mM, Glutamina 5 mM, NADH 0.16 mM disueltos en fosfato de potasio 0.1 M pH 7.0. Como control de actividad se utilizó Azaserina 5 mM que es un inhibidor competitivo de las amidotransferasas (Hummelt y Mora, 1980). La actividad específica se determinó como micromolas de NADH oxidado (340 nm) por minuto por miligramo de proteína.

La actividad de GS se determinó por el método de Ferguson y Sims (1974). La concentración de los sustratos es la siguiente: ADP 0.75 mM, Glutamina 35 mM, Hidroxilamina 8.75 mM, Arsenato de sodio 17.5 mM y Cloruro de Manganeso 2.25 mM disueltos en amortiguador tris-acetatos 50 mM, EDTA 0.5 mM pH 6.4. Esta reacción colorimétrica se midió a 500 nm.

La actividad de GDH-NADPH se determinó por el método de Doherty (1970). La concentración de los sustratos es: 2-oxoglutarato 3 mM, cloruro de amonio 50 mM, y NADPH 0.14 mM, disueltos en fosfato de potasio 0.1 M pH 7.8.

Por no contar con un inhibidor específico de esta enzima se utilizaron dos controles, uno de ellos sin 2-oxoglutarato y el otro sin cloruro de amonio. La actividad específica se determinó por las micromolas de NADPH oxidado (340 nm) por minuto por miligramo de proteína.

Purificación de GOGAT de *K. lactis*.

Se utilizaron 12 litros de MM de *K. lactis* MD 2/1. Las células se colectaron en 0.5 de D.O. ,leidas a 600 nm y se almacenaron a -70°C hasta usarse. Durante la purificación todos los pasos se llevaron a cabo a 4°C.

Paso 1 : Extracto crudo.- Las células se descongelaron y se resuspendieron en 1 ml de amortiguador A (0.1 M fosfato de potasio (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 50 µg/ml TLCK, y 100 µg/ml TPCK) por gramo de levadura. El extracto crudo se obtuvo después de la ruptura mecánica de las células utilizando un Bead-Beater (10 ciclos de 1 min) y centrifugación a 35,000 x g durante 30 min.

Paso 2 : Precipitación con sulfato de amonio.- El extracto crudo se precipitó con una solución saturada de sulfato de amonio (pH 7.5). Las proteínas que precipitaron al 30 % de saturación, se eliminaron y el sobrenadante se dializó exhaustivamente 4 veces (1 hora cada uno) contra dos litros de amortiguador A sin DTT y sin inhibidores de proteasas (amortiguador B).

Paso 3 : Cromatografía de afinidad.- La fracción dializada se aplicó directamente a una columna de Sefarosa Azul (23 x 2.8 cm) previamente equilibrada con amortiguador A que contiene 0.2 mM de 2-oxoglutarato y 5% de glicerol (Amortiguador C). Una vez aplicada la muestra, la columna se lavó con 20 volúmenes de columna con amortiguador C y la

actividad de GOGAT se eluyó con amortiguador C que contenía 0.1 mM de NADH. Las fracciones con actividad de GOGAT se colectaron y se dializaron dos veces con amortiguador A (30 minutos cada una). La proteína obtenida se concentró por ultrafiltración utilizando un filtro Amicon YM-30 y se almacenó a -70°C , en presencia de TLCK.

Paso 4 : Cromatografía de intercambio iónico.- La fracción concentrada se aplicó a una columna de DEAE-Sefarosa (13 x 1.2 cm) previamente equilibrada con amortiguador C . La columna se lavo con 10 volúmenes de amortiguador C y la actividad de GOGAT se eluyó con un gradiente de KCl (0.0 a 0.5 M) en amortiguador C. Las fracciones obtenidas se dializaron tres veces con amortiguador A (1 hora cada una). La proteína se concentró y se trató igual que en el paso anterior.

Determinación de la masa molecular. La masa molecular aparente de la subunidad, se determinó por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 6% (SDS-PAGE) (Schägger y cols., 1986) en presencia de estándares de masa molecular de Sigma Chemical Co.: miosina, 205 KDa; β -galactosidasa, 116 KDa; fosforilasa-B, 97.4 KDa; albúmina bovina, 66 KDa; albúmina de huevo, 45 KDa y anhidrasa carbónica, 29 KDa. Los geles se fijaron y se tiñeron con azul de Coomassie.

Inmunorrélicas tipo Western. Las proteínas se transfirieron de geles SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa y se llevó a acabo el análisis con anticuerpos como lo describieron González-Halphen y cols. (1988). El

anticuerpo contra la GOGAT de *S. cerevisiae* obtenido por Cogoni y cols. (1995) se diluyó 1:50,000. Para observar la inmunoreacción se utilizó un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo, que está conjugado con fosfatasa alcalina.

Análisis por Northern (RNA). El RNA de la levadura se preparó según el método de Struhl y Davis (1981) a partir de 50 ml de cultivo crecido durante toda la noche en MM. El análisis por Northern se llevó a cabo según como lo describieron González y cols. (1992). El fragmento EcoR1-EcoR1 de 4.3 Kb del gene de la GOGAT de *S. cerevisiae* obtenido por Cogoni y cols.(1995) se utilizó como sonda. Esta sonda se marcó radiactivamente con α CTP³². La prehibridación y la hibridación se llevaron a cabo a 65°C durante 45 min y 45°C por 24 hrs, respectivamente. Los filtros se lavaron dos veces con SSC 2x + SDS 0.1x a 45°C por 35 min.

Análisis por Southern (DNA). El análisis por Southern se llevó a cabo como lo describió Nasmyth y Reed (1980). El DNA total de la levadura se preparó partiendo de 50 ml de cultivo en MM, crecidos toda la noche. Para este análisis se uso la misma sonda (4.3 Kb) y las mismas condiciones de tratamiento que se describieron anteriormente para el análisis de RNA.

El fragmento, producto de PCR, de 390 pares de bases (pb) del gen de la GDH-NADPH de *K. lactis* se utilizó como sonda para poder observar la interrupción del mismo gen en la cepa mutante. Las condiciones de

tratamiento del filtro fueron para condiciones homólogas tal como lo describe González y cols.(1992).

Construcción de oligonucleótidos y amplificación por PCR del DNA genómico de *K. lactis*. Dos pares de desoxiloligonucleótidos se diseñaron con base en la secuencia de aminoácidos de la GDH-NADPH de *S. cerevisiae* (Nagasu y Hall,1985) y el uso de codones de *K. lactis* (Lloyd y Sharp,1993).

El desoxiloligonucleótido F2: TT(G+A) GA(G+A) CA(A+G) AT(C+T) GT(C+T) AA(C+T) GA(G+A) TA(C+T) TC se diseñó a partir de la secuencia peptídica LEQIVNEYS localizada en la posición 277 a 285. El desoxiloligonucleótido R2: CAT (A+G)AT (T+C)CT (T+C)TT (C+T)AA (C+T)TC (T+C)TG (G+A)TC se diseñó a partir de la secuencia peptídica DQELKRIM localizada en la posición 400 a 407.

El DNA total de *K. lactis* se usó como templado para la amplificación mediante PCR. Esta se efectuó en un Coy TempCycler II con el siguiente programa: un ciclo desnaturalizante por 10 min a 94°C, seguido por 50 ciclos desnaturalizantes cada uno de 30 seg a 94°C , más 45 seg de alineamiento a 45°C y dos min de extensión a 72°C; y finalmente 10 min de extensión a 72°C. El producto de PCR de 390 pb que se obtuvo del primer F2-R2, fue purificado en gel y se ligó al vector pCRII™ (Invitrogene). Esta subclona se secuenció por extensión de primer utilizando el método de secuencia V.2 (USB).

Separación cromosomal: Los cromosomas de la cepa WM37 (NRRL Y-1140) se separaron por electroforesis de Campo Eléctrico Homogéneo Contour Clamped (CHEF) como lo describen Miranda y cols. (1995). Los cromosomas separados en el gel de agarosa se expusieron a longitudes de onda corta de luz ultravioleta por 5 min para romper el DNA, que se desnaturalizó, neutralizó y transfirió a membranas de nylon como lo describen Sambrook y cols. (1989). El fragmento producto de PCR se usó como sonda sobre los cromosomas transferidos. El fragmento se marcó radiactivamente con α dCTP³².

Determinación de proteínas. La cuantificación de proteínas se hizo por el método descrito por Lowry y cols. (1950).

Para cuantificar la proteína que se obtuvo en el último paso de purificación se utilizó el método de Bradford, M (1976).

En ambos casos se utilizó albúmina sérica bovina para obtener la curva patrón.

5 Resultados:

Debido a que en la literatura no existe ninguna descripción acerca de cómo la levadura *K. lactis* incorpora su nitrógeno consideramos interesante el saber si lo podría asimilar proporcionándole amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a distintas concentraciones (5 mM, 38 mM y 76 mM), con lo cual se buscaba encontrar la condición mínima y máxima de crecimiento. Por otro lado sabemos que esta levadura, a diferencia de *S. cerevisiae*, tiene un metabolismo estrictamente aerobio, por lo cual se adicionaron al medio mínimo de crecimiento, distintas concentraciones de la fuente de carbono (glucosa al 0.5%, 2%, 4% y 6%). Estas curvas de crecimiento se observan en la Fig. 2, y se comparan con el crecimiento máximo que tiene esta levadura en un medio rico (YPD).

Con estos resultados el siguiente paso fue determinar cuáles eran las vías involucradas en la asimilación de amonio en *K. lactis*. Como ya se mencionó anteriormente algunos hongos, plantas superiores y bacterias presentan dos rutas de asimilación de amonio y síntesis de glutámico: la vía GDH-NADPH y la vía GS-GOGAT, por lo cual se determinó si estas vías las presentaba dicha levadura; considerando los distintos cofactores que pudieran requerir las enzimas. Dichas actividades específicas se muestran en la Tabla I y se comparan con aquellas reportadas para *S. cerevisiae*.

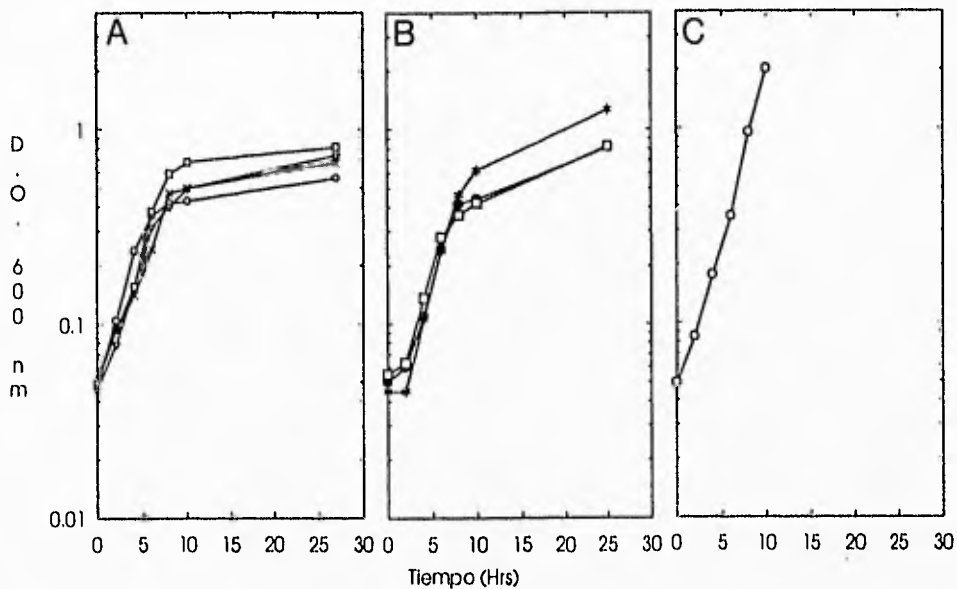


Fig 2.- Curvas de crecimiento de la cepa silvestre *K. lactis* MD 2/1. En el panel A se observa el crecimiento en MM + 38 mM de amonio, y con el porcentaje de glucosa indicado : (O) 0.5 %, (∇) 2 %, (□) 4 % y (X) 6 %. En el panel B se observa el crecimiento en MM + 2 % de glucosa y la concentración de amonio indicada: (●) 5 mM, (□) 38 mM y (*) 76 mM. En el panel C se observa el crecimiento de esta levadura en un medio rico (YPD).

Tabla 1.- Valores de actividad específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$), de las enzimas involucradas en asimilar amonio. Las cepas se crecieron en medio mínimo utilizando amonio como única fuente de nitrógeno. Se considero el distinto cofactor enzimático.

CEPA	GOGAT-NADH	GOGAT-NADPH	GDH-NADPH	GS
<i>S. cerevisiae</i>	0.022	0.0	0.80	0.10
<i>K. lactis</i>	0.025	0.0	0.14	0.09

Nuestros resultados mostraron que *K. lactis* presentaba las dos vías de asimilación de amonio y síntesis de glutámico, nos interesó estudiarlas y determinar su importancia. Para ello utilizamos dos estrategias, dada la experiencia en nuestro laboratorio; por un lado purificamos la GOGAT-NADH de *K. lactis* y por otro lado, obtuvimos mutantes totalmente carentes de actividad GDH-NADPH y las caracterizamos.

Purificación de la GOGAT-NADH de *K. lactis* MD 2/1 :

La GOGAT de *K. lactis* se purificó a partir de 13 gramos de células obtenidas a una D.O. de 0.5. Partiendo del extracto crudo con una actividad específica de 0.024 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, la cual se incrementó 80 veces (2 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) al salir de la cromatografía de afinidad, obteniendo una recuperación de la proteína del 5.7%. Sin embargo, como se muestra en la Fig. 3, obtuvimos una fracción semipura de GOGAT al aplicar el sobrenadante de la precipitación con sulfato de amonio a la columna de Sefarosa Azul. Dado este resultado la proteína concentrada fue aplicada a una columna de DEAE-Sefarosa en la cual la actividad específica de GOGAT se incrementó 316 veces (7.6 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína), teniendo una recuperación del 0.24% (Tabla II).

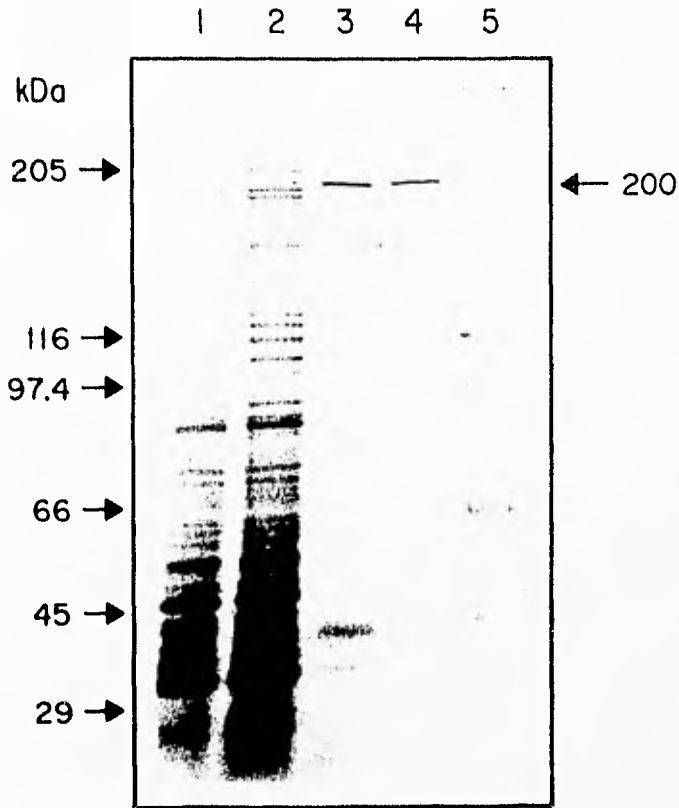


Fig 3.- SDS-PAGE 6% que muestra las fracciones obtenidas para la purificación de la GOGAT-NADH de *K. lactis*. Carril 1, extracta cruda (50 μ g); carril 2, sobrenadante de la precipitación con sulfata de amonio al 30% (50 μ g); carril 3, sefarosa azul (2.1 μ g); carril 4, DEAE-Sefarosa (0.8 μ g) y en el carril 5 estan los marcadores de peso molecular descritas en los materiales y métodos (estan indicadas por las flechas de la izquierda). La flecha de la derecha indican la banda de la GOGAT de *K. lactis*.

Tabla II.- Purificación de la enzima GOGAT-NADH de *K. lactis*, partiendo de 13 gramos de células crecidas en medio mínima (2 % de glucosa y 38 mM de sulfato de amonio) y que se obtuvieran a una D.O. de 0.5 a 600 nm.

Paso de Purificación	Proteína Total (mg)	Actividad Total ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Act. específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	Rendimiento (%)	Factor de Purificación
Extraclo crudo	374.7	9.01	0.024	100	1
Precipitación al 30% de sulfato de amonio.	298.2	4.92	0.016	54.6	0.69
Sefarosa Azul	0.27	0.52	2	5.74	80
DEAE-Sefarosa	0.003	0.022	7.6	0.24	316.25

Con esta última muestra de la GOGAT-NADH de *K. lactis* llevamos a cabo un análisis por inmunorrélicas tipo Western utilizando anticuerpos producidos contra la GOGAT de *S. cerevisiae*. Dichos anticuerpos reconocieron la enzima pura de *K. lactis* cuando lo diluímos 1:50 000 (Fig.4). Estos resultados demuestran que la GOGAT de *K. lactis* está formada por un único polipéptido de un peso molecular aparente de 200 KDa, estimado por SDS-PAGE utilizando los marcadores de peso molecular descritos en los Materiales y Métodos.

Dado que los resultados del Western sugerían similitud entre las enzimas GOGAT de *K. lactis* y *S. cerevisiae*, decidimos realizar un análisis tipo Southern y Northern utilizando como sonda un fragmento interno del gen de GOGAT de *S. cerevisiae* de aproximadamente 4.3 Kb con extremos Eco R1-Eco R1 (Cogoni y cols. 1995). Utilizando condiciones no-homólogas de hibridación y lavado del filtro observamos una señal de aproximadamente 4.3 Kb en DNA total de *K. lactis* digerido con Eco R1 (Fig.5). Con la misma sonda y las mismas condiciones no-homólogas también observamos el RNA-mensajero de la GOGAT de *K. lactis* entre 7-8 Kb, similar al de *S. cerevisiae* (Fig. 6). Estos resultados comprueban contundentemente los resultados obtenidos del Western que se trata de un solo polipéptido de alto peso molecular.



Fig 4.- Análisis de inmunorrélicas tipo Western usando el anticuerpo contra la enzima GOGAT-NADH de *S. cerevisiae*. En el carril 1 se observa la fracción purificada de la GOGAT de *K. lactis*, que corresponde a la DEAE-Sefarosa. En el carril 2 esta la GOGAT-NADH purificada a homogeneidad de *S. cerevisiae*. El anticuerpo reconoce solo una banda, que corresponde a 200 KDa.

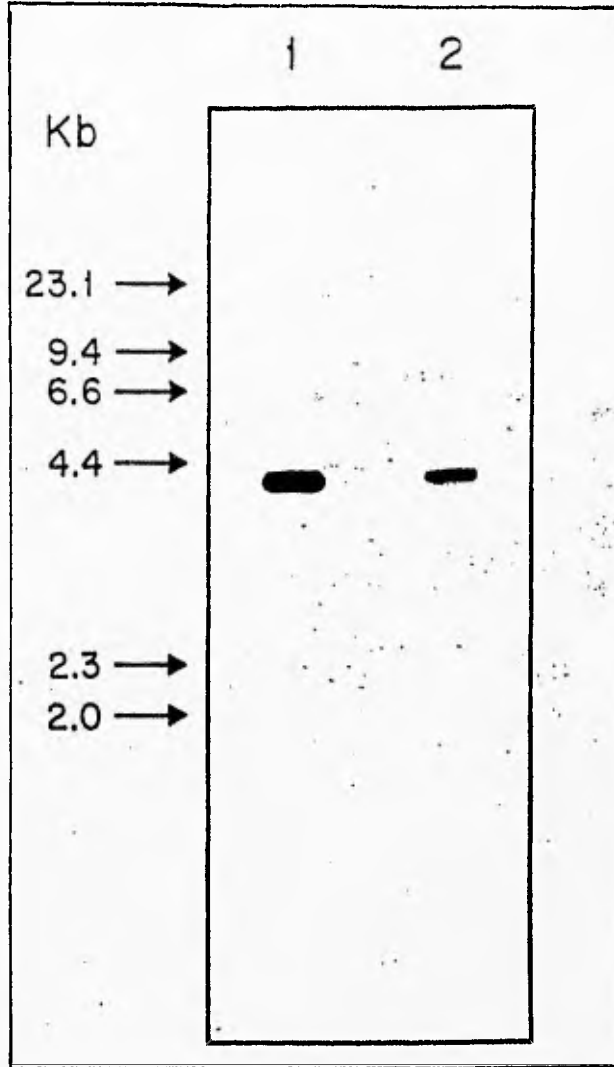


Fig 5.- DNA total de *S. cerevisiae* (carril 1) y de *K. lactis* (carril 2) digeridas con Eco RI. Como sonda se usa el fragmento de 4 Kb del gen *GLT1* (GOGAT) de *S. cerevisiae* marcada con α dCTP³². La actividad específica de la sonda fue de aproximadamente 10^9 cpm/mg de DNA.

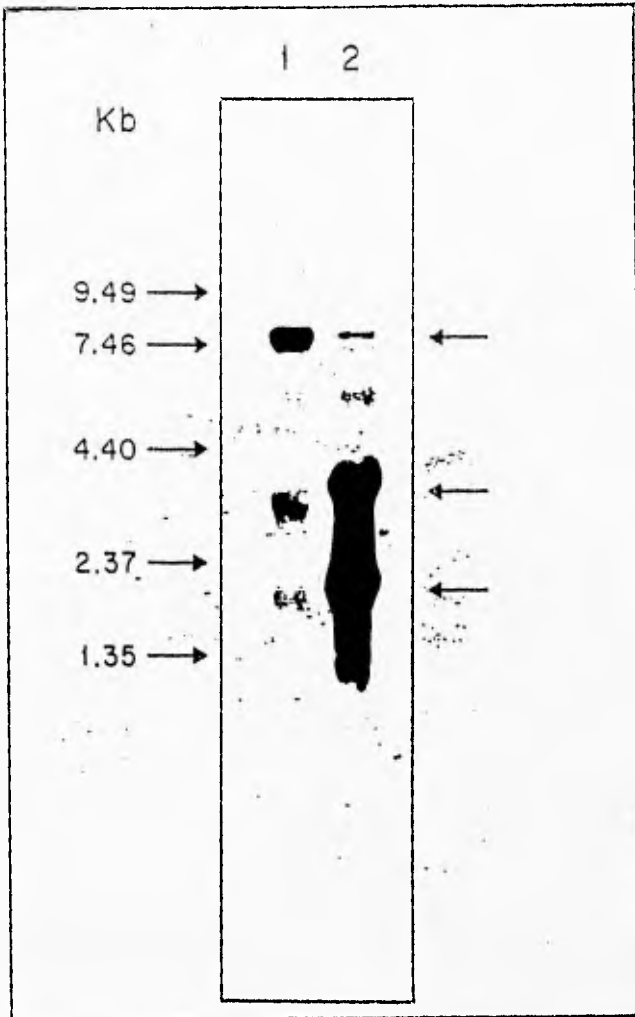


Fig 6.- RNA total de *S. cerevisiae* (carril 1) y de *K. lactis* (carril 2). Se colocaron 10 μ g de RNA en cada carril. Como sonda se usó el fragmento de 4 Kb del gen *GLT1* de *S. cerevisiae*, marcada con α dCTP³². Las flechas de la derecha indican la migración de los RNAs ribosomales 25S y 16S y el RNA-mensajero de la GOGAT. Las flechas de izquierda son los tamaños moleculares de una escalera de RNAs de 0.4 a 9.4 Kb (Gibco BRL).

Oblención de mutantes carentes de GDH-NADPH y su caracterización fisiológica.

De acuerdo con los resultados reportados en la Tabla I observamos una considerable disminución en la actividad de GDH-NADP de *K. lactis* si la comparamos con la actividad de la misma enzima reportada en *S. cerevisiae*; sin embargo, es conveniente hacer notar que ambas levaduras crecen en amonio con el mismo tiempo de duplicación (2 hrs), lo cual sugiere que en *K. lactis* el crecimiento sobre amonio no está limitado por la capacidad de la levadura para asimilarlo a través de GDH-NADPH y que la asimilación normal de amonio en *K. lactis* podría depender de la ruta GS-GOGAT. Para poder analizar este punto se aislaron mutantes carentes de actividad GDH-NADPH.

Considerando el alto grado de identidad de aminoácidos entre varias proteínas de *S. cerevisiae* y *K. lactis* (Hendriks, y cols. 1992) y el hecho de que el uso de codones es muy similar en estas dos levaduras (Lloyd y Sharp, 1993), se diseñaron dos pares de desoxinucleótidos como primers para amplificar un fragmento del gen de GDH-NADPH, sobre DNA total de *K. lactis*.

De acuerdo con la secuencia de GDH-NADPH de *S. cerevisiae* (Moye y cols., 1985; Nagasu y Hall, 1985), y usando los primers F2-R2 se esperaba amplificar un fragmento de 390 pb. Este fragmento de 390 pb se subclonó en un vector pCRII™ y se secuenció en su longitud total. Como se observa en la Fig. 7, la secuencia de aminoácidos muestra un alto

grado de similitud (75% de similitud, 67% de identidad) con la región correspondiente de la GDH-NADPH de *S. cerevisiae*.

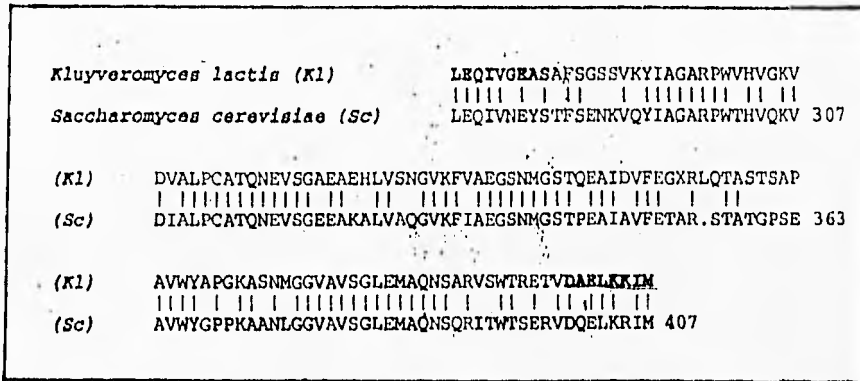


Fig 7.- Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del fragmento amplificado de PCR de GDH-NADPH de *K. lactis* comparado con la proteína GDH.NADPH de *S. cerevisiae*.

Para obtener las mutantes carentes de GDH-NADPH de *K. lactis* se construyó el plásmido pJR1 para clonar el fragmento de PCR de 390 pb en un vector integrativo Y1p 352, que tiene incorporado el marcador de levadura URA 3. El pJR1 se linearizó por digestión en un sitio único para *Cla*I en la posición 214 del fragmento del gen producto de PCR (Fig. 8).

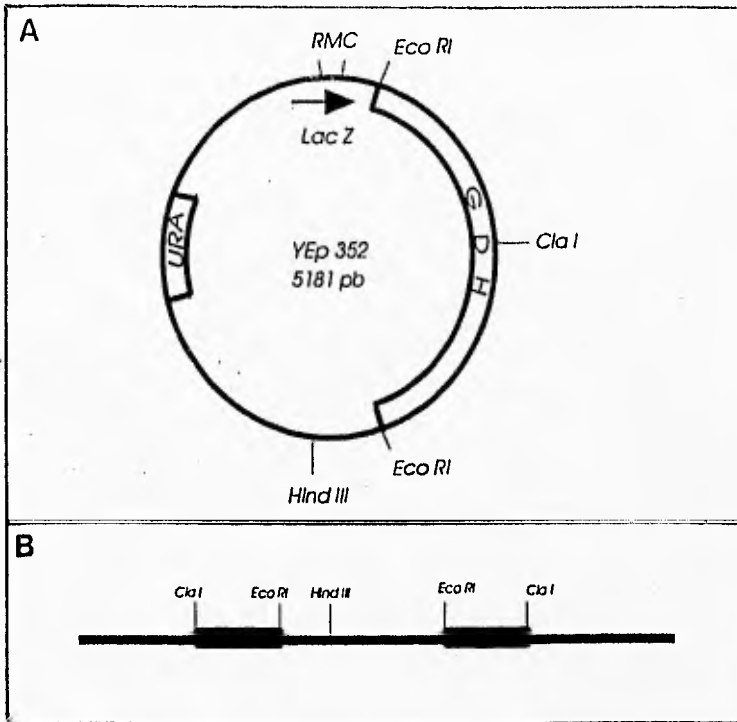
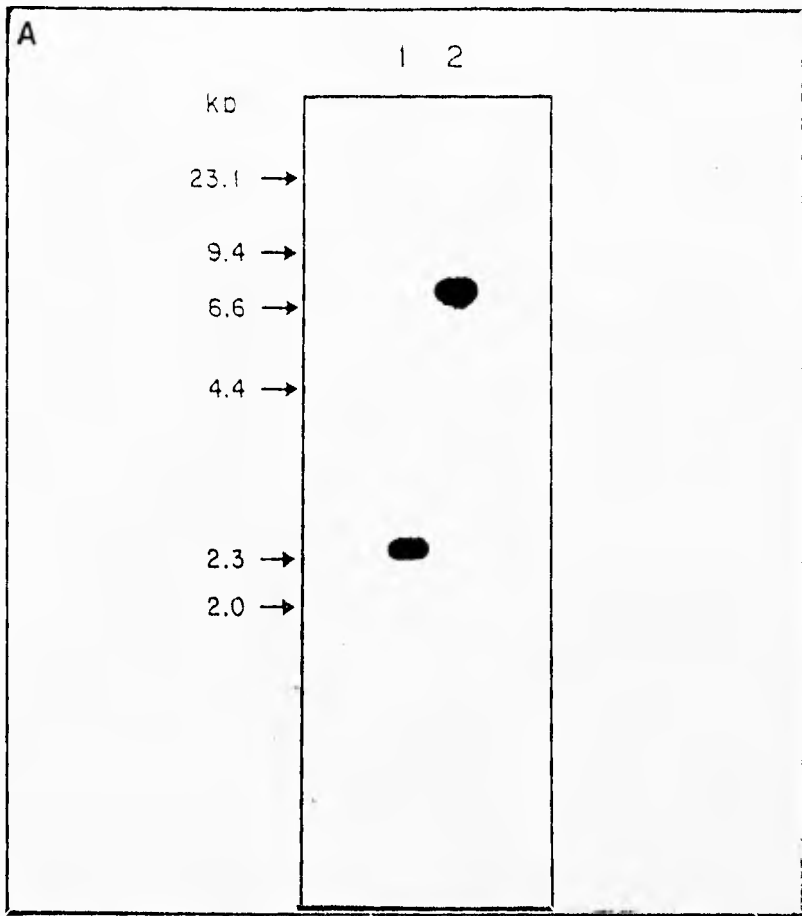


Fig 8.- (A) Plásmido usado en la construcción de la mutante en GDH-NADPH (JR1) de *K. lactis*. (B) Diagrama que muestra la inserción del plásmido pJR1 linearizado, en el gen cromosomal de GDH-NADPH de *K. lactis*.

La cepa de *K. lactis* MD 2/1 (Mat α , lys A, arg A, ura A) se transformó con el plásmido pJR1 linearizado y se seleccionaron protótrofos de uracilo.

El análisis por Southern se llevó a cabo con el fragmento de 390 pb como sonda, sobre DNA total en la cepa silvestre y en la cepa transformada, digeridos ambos con Bgl II. El patrón de la mutante claramente indicó la inserción de la construcción en el gen estructural de GDH-NADPH (Fig. 9A); y por otro lado, la actividad enzimática de la GDH-NADPH en esta cepa no se detectó (Fig 9B y 11A).

La mutante obtenida con pérdida total de actividad GDH-NADPH puede crecer en amonio como única fuente de nitrógeno, con la misma velocidad de crecimiento que la cepa silvestre al menos durante las primeras horas. Después de ocho hrs detiene su crecimiento a diferencia de la cepa silvestre que sigue creciendo un poco más. Esta cepa mutante recuperó el fenotipo silvestre sólo cuando se adiciona al medio mínimo de crecimiento glutámico (7.3 mM) como única fuente de nitrógeno. Por otro lado con glutamina (7.3 mM) como única fuente de nitrógeno la mutante no tiene el mismo crecimiento que la cepa silvestre (Fig 10).



B

CEPA	GOGAT-NADH	GDH-NADPH
<i>K. lactis</i> MD 2/1	0.025	0.15
<i>K. lactis</i> JR1	0.031	0.0

Fig 9.- (A) DNA total de la cepa silvestre MD 2/1 (carril 1) y de la cepa mutante JR1 (carril 2) digeridos con Bgl II. Como sonda se uso el fragmento de 390 pb obtenido por PCR que corresponde al gen *GDH1* de esta levadura. (B) Actividades específicas ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) de la cepa silvestre MD 2/1 y de la cepa JR1 carente de actividad GDH-NADPH.

Ya con esta caracterización fenotípica parcial de la mutante en GDH-NADPH de *K. lactis* se procedió al análisis fisiológico, para lo cual se llevó a cabo la medición de la vía GS-GOGAT durante distintas fases del crecimiento en amonio como única fuente de nitrógeno y se comparó con la cepa silvestre, para poder así observar el efecto que le causa a la levadura el carecer de la vía GDH-NADPH en la biosíntesis de glutámico. Bajo las mismas condiciones de cultivo observamos que en la cepa silvestre la actividad específica de GS se incrementa ligeramente en la fase de crecimiento estacionaria, mientras que la actividad de GOGAT tiene valores más altos durante la fase de crecimiento exponencial y finalmente la GDH-NADPH también observa valores más altos en la fase exponencial y posteriormente decae en la fase estacionaria. Por otro lado la cepa carente de actividad GDH-NADPH presenta valores de actividad más altos en GOGAT y en GS, pero aún más notorios en la GS, llegando a ser de hasta 1.5 veces mayores, comparando con la actividad de la cepa silvestre, en la fase de crecimiento estacionaria (Fig 11).

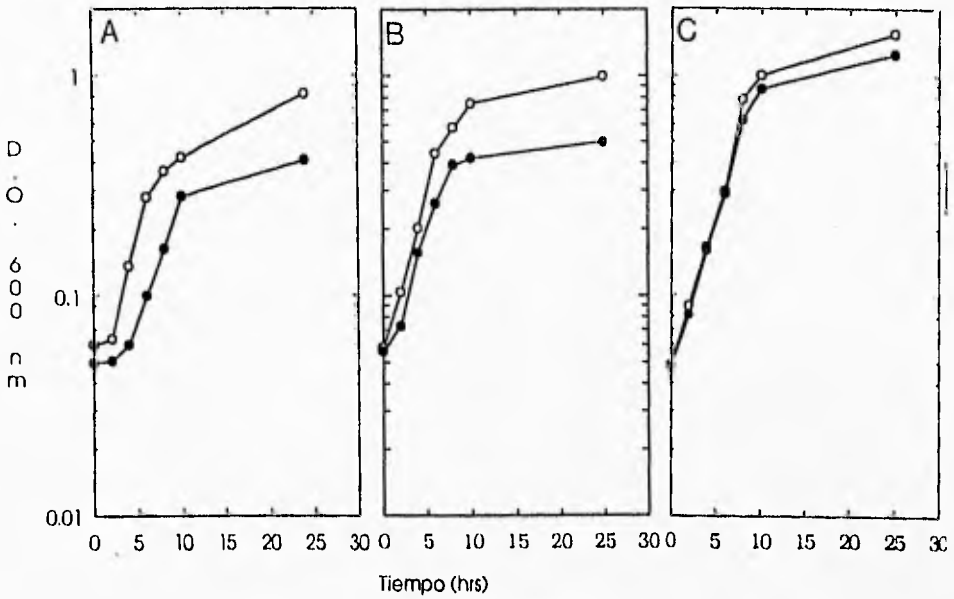


Fig 10.- Curvas de crecimiento en MM de la cepa silvestre *K. lactis* MD2/1 (O) y de la cepa JR1 carente de GDH-NADPH (●), a 600 nm. En el panel A se observa el crecimiento con amoníaco 38 mM como única fuente de nitrógeno, en B es el crecimiento en 7.3 mM de glutamina como única fuente de nitrógeno y en el panel C el crecimiento es en 7.3 mM de glutámico como única fuente de nitrógeno.

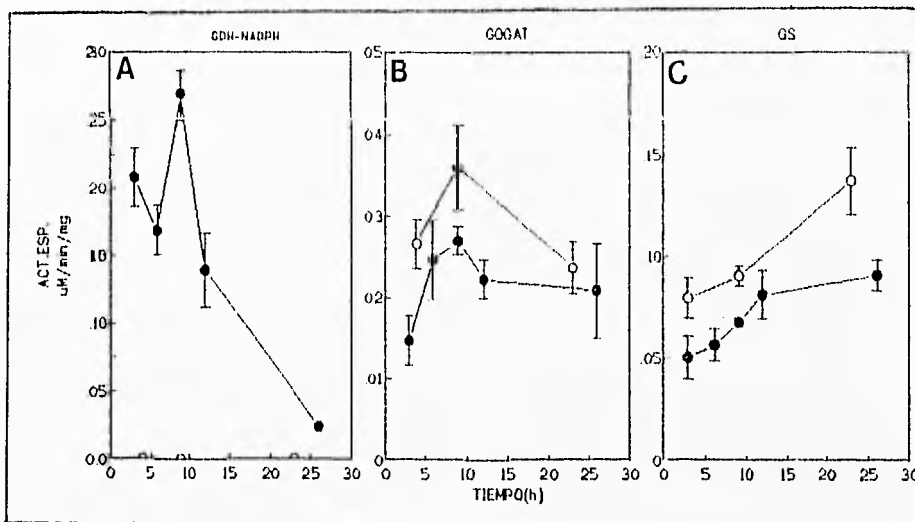


Fig 11.- Actividades específicas obtenidas de extractos de la cepa silvestre (●) y de la cepa JR1 (○) de *K. lactis*, crecidas en MM, usando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como única fuente de nitrógeno. (A) Actividad específica de GDH-NADPH, (B) actividad específica de GOGAT-NADH y (C) actividad específica de GS. Dichas actividades son el promedio de tres experimentos, con sus desviaciones estándar.

Localización cromosomal del gen estructural de GDH-NADPH

Utilizando las condiciones CHEF descritas en los Materiales y Métodos, se separaron seis bandas que corresponden a los cromosomas de la cepa WM37 (MATa, hisA)(NRRL Y-1140) y que son semejantes a los reportados para la cepa CBS 2360 (Sor y Fukuhara,1989). Estos cromosomas numerados I al VI, se inmovilizaron sobre una membrana de nylon. El gen *GDH1* se localizó sobre el cromosoma VI usando el fragmento amplificado por PCR como sonda (Fig. 12).

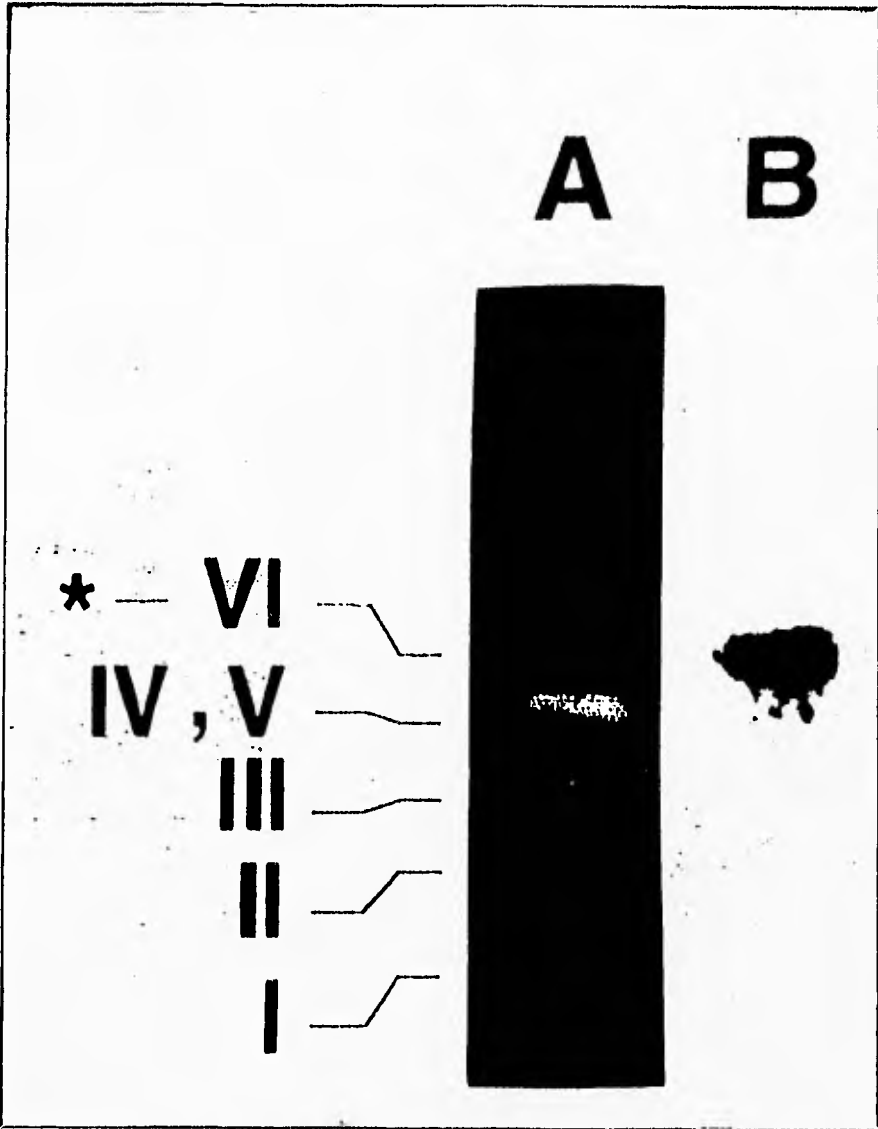


Fig 12.- (A) Patrón cromosomal de *K. lactis* de la cepa WM37 (silvestre) separado por electroforesis en campo eléctrico homogéneo Countour Clamped y teñidos con bromuro de etidio. (B) Autorradiogramas del filtro que muestra hibridación en el cromosoma VI, con la sonda de 390 pb marcada con P^{32} .

6 Discusión y Conclusiones:

Las curvas de crecimiento de la Fig. 2 demuestran que *K. lactis* asimila el amonio y dicha asimilación se debe a que presenta la vía de GDH-NADPH y la vía GS-GOGAT activas.

Las mismas gráficas definen la condición óptima en la cual esta levadura puede crecer y las condiciones de exceso tanto para la fuente de carbono como para la fuente de nitrógeno. El crecimiento donde se observa que el amonio está en exceso es en 76 mM; mientras que el de glucosa está en 4% y 6%. Por lo tanto la condición de crecimiento que consideramos óptima para *K. lactis* fue Medio Mínimo con 38 mM de amonio y 2% de glucosa ya que a pesar de obtener mayor producción celular en 76 mM de amonio y/o 4% de glucosa, esto resulta en una parcial inhibición de la actividad específica de la GS y de la GDH-NADPH respectivamente (datos no mostrados). En un medio rico (YPD) estas actividades también son intermedias.

En las condiciones de 38 mM de amonio y 2% de glucosa se llevaron a cabo todos los demás experimentos, con las actividades enzimáticas de las dos vías muy reproducibles.

El hecho de que las actividades específicas de GS-GOGAT de esta levadura sean semejantes a las reportadas para *S. cerevisiae*, aún cuando la actividad de GDH-NADPH es cinco veces menor a la reportada para *S. cerevisiae*, nos dice que la eficiencia para asimilar el amonio es la misma en ambas levaduras. Cuando se crecen en medio

mínimo, ambas levaduras tienen el mismo tiempo de duplicación de 120 min, por lo que se puede concluir que, esta menor actividad de GDH-NADPH en *K. lactis*, no es necesariamente un obstáculo en la asimilación del amonio.

Por otro lado es conveniente recordar que en *S. cerevisiae* y en bacterias, las actividades específicas de GOGAT y GDH son más altas cuando la fuente de nitrógeno es el amonio y bajas o intermedias cuando la fuente de nitrógeno es glutámico o glutamina; esta regulación de la actividad enzimática parece ser igual en *K. lactis*, como lo señalan datos preliminares que no se incluyen en el presente estudio.

El siguiente punto que nos interesó fue conocer la forma o constitución y masa molecular de las enzimas involucradas en esta asimilación de amonio y síntesis de glutámico, dado que la GDH-NADPH y la GS son proteínas que se han reportado muy conservadas como hexámero y dodecámero respectivamente, se decidió estudiar a la GOGAT de *K. lactis*.

El método inicial que se utilizó para purificar la enzima GOGAT de *K. lactis* fue el propuesto por Cogoni y cols.(1995), sin embargo siguiendo este protocolo, en cada paso se encontró que esta enzima se inactiva considerablemente incluso durante las precipitaciones con sulfato de amonio y aún más cuando se somete a una cromatografía en DEAE-Blotgel A. Por esta razón era preciso obtener la fracción pura de la GOGAT de *K. lactis* mediante un procedimiento rápido de purificación.

Para evitar en lo más posible su inactivación, se agregaron una mezcla de inhibidores de proteasas durante todos los pasos de purificación y eliminamos la precipitación con sulfato de amonio al 53%, y las cromatografías en DEAE Bio-gel A y Fenil Sefarosa.

El rendimiento de la fracción purificada de la GOGAT de *K. lactis* fue muy bajo lo cual quiere decir que en el último paso cuando se emplea DEAE-Sefarosa la enzima se inactivó y sólo se logró recuperar el 0.24% con una actividad específica de 7.6 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Es decir, se purificó alrededor de 316 veces y aún no se observa totalmente pura.

Esta inactivación también se observó en una columna de DEAE-BIOGEL A, lo cual quiere decir que en columnas de intercambio aniónico la GOGAT de *K. lactis* se inactiva.

Los valores de purificación de la GOGAT de *K. lactis* son muy semejantes a los obtenidos para la GOGAT de *S. cerevisiae* purificada por Cogoni y cols.(1995), al menos en lo que se refiere al factor de purificación y en la actividad específica considerando que aún no está totalmente pura, y sin embargo nos permitió establecer que la GOGAT de *K. lactis* es un polipéptido de 200 KDa (estimado por SDS-PAGE).

La fracción que se obtuvo de la DEAE-Sefarosa mostrará una banda de 200 KDa y una banda de 160 KDa, ver Fig 3. Para definir cual de las dos bandas corresponde a la GOGAT se efectuó un análisis con los anticuerpos hechos contra la GOGAT de *S. cerevisiae*. Sólo la banda de alto peso molecular (200 KDa) fue reconocida por dichos anticuerpos lo

cual demuestra claramente que la GOGAT-NADH de *K. lactis* al igual que en *S. cerevisiae*, *N. crassa* y plantas superiores es un único péptido de alto peso molecular, luego entonces, totalmente diferente a las GOGATs de procariontes constituida por una subunidad chica y una subunidad grande como se menciona en la Introducción.

Otra conclusión inmediata que surge es que las GOGATs de *K. lactis* y *S. cerevisiae* tienen epitopes antigénicos similares.

Otra manera por la cual se comprobó que en realidad se esta hablando de un péptido de alto peso molecular era obtener el RNA mensajero. Utilizando como sonda un fragmento del gen de *S. cerevisiae* y bajo condiciones no homólogas de hibridación sobre RNA total de *K. lactis*, se obtuvo la señal de un mensajero de 7-8 Kb semejante al de *S. cerevisiae*. Por lo tanto este RNA mensajero de alto peso molecular ratifica los resultados obtenidos en el Western.

La cepa mutante (JR1) de *K. lactis* carece totalmente de actividad GDH-NADPH.

La cepa pJR1 carente de actividad GDH-NADPH, es capaz de crecer en amonio como única fuente de nitrógeno incluso con el mismo tiempo de duplicación que la cepa silvestre (Fig 10 A) y sin embargo detiene antes su crecimiento, lo cual quiere decir que en el medio de cultivo se acaba algún nutriente o bien que intracelularmente exista un desequilibrio en la relación $NADP^+/NADPH$ que finalmente repercute en el crecimiento de

cual demuestra claramente que la GOGAT-NADH de *K. lactis* al igual que en *S. cerevisiae*, *N. crassa* y plantas superiores es un único péptido de alto peso molecular, luego entonces, totalmente diferente a las GOGATs de procariontes constituida por una subunidad chica y una subunidad grande como se menciona en la Introducción.

Otra conclusión inmediata que surge es que las GOGATs de *K. lactis* y *S. cerevisiae* tienen epitopes antigénicos similares.

Otra manera por la cual se comprobó que en realidad se esta hablando de un péptido de alto peso molecular era obtener el RNA mensajero. Utilizando como sonda un fragmento del gen de *S. cerevisiae* y bajo condiciones no hómologas de hibridación sobre RNA total de *K. lactis*, se obtuvo la señal de un mensajero de 7-8 Kb semejante al de *S. cerevisiae*. Por lo tanto este RNA mensajero de alto peso molecular ratifica los resultados obtenidos en el Western.

La cepa mutante (JR1) de *K. lactis* carece totalmente de actividad GDH-NADPH.

La cepa pJR1 carente de actividad GDH-NADPH, es capaz de crecer en amoníaco como única fuente de nitrógeno incluso con el mismo tiempo de duplicación que la cepa silvestre (Fig 10 A) y sin embargo detiene antes su crecimiento, lo cual quiere decir que en el medio de cultivo se acaba algún nutriente o bien que intracelularmente exista un desequilibrio en la relación $NADP^+/NADPH$ que finalmente repercute en el crecimiento de

las células. Entonces la falta de GDH-NADPH en *K. lactis* repercute en la biomasa obtenida partiendo de una misma cantidad de nutrientes, sin embargo ésta carencia no representa una vía crítica o esencial para *K. lactis*, recordando además la baja actividad específica de esta enzima aún en la cepa silvestre.

El crecimiento en MM usando glutamina (7.3 mM) como única fuente de nitrógeno en la cepa JR1 y la cepa silvestre de *K. lactis* es muy parecido al crecimiento en amonio a pesar de que se obtiene una mayor biomasa (Fig 10 B). Esto quiere decir que la glutamina no representa tan buena fuente de nitrógeno para *K. lactis*, como lo es para *S. cerevisiae*. Datos preliminares no presentados aquí nos indican que las actividades enzimáticas de GS y de GOGAT, de ambas cepas JR1 y silvestre bajo esta condición, son relativamente bajas al compararlas con las observadas en amonio. Estos datos siendo aún preliminares y a los que sería muy interesante hacer un estudio más cuidadoso (cultivos continuos), nos dirían que la GS está siendo regulada de alguna forma por la presencia de glutamina; por otro lado lo que resulta interesante es que la actividad de GOGAT sea también baja pues esperaríamos encontrarla más activa degradando glutamina, lo cual nos lleva a pensar que en el medio hay alguna deficiencia, tal que repercute en el crecimiento, principalmente en la cepa JR1. Esto tal vez se pueda estudiar adicionando al MM doble cantidad de sales, o elementos traza (hierro, azufre), o vitaminas.

El crecimiento en glutámico como única fuente de nitrógeno de estas mismas cepas de *K. lactis* (Fig 10 C) resultó ser el mejor pues es en esta condición donde se observa mayor crecimiento y es donde la JR1 recupera el crecimiento silvestre. Las actividades enzimáticas de GS y GOGAT en esta condición son bajas, comparando con las actividades en amonio, en ambas cepas (datos preliminares). Esto sugiere que el glutámico está siendo utilizado tanto como fuente de nitrógeno, como fuente de carbono.

Para poder saber porqué en amonio como única fuente de nitrógeno la cepa pJR1 crece con el mismo tiempo de duplicación que la cepa silvestre analizamos cómo cambian las actividades específicas de la GOGAT y GS durante el crecimiento de ésta en dicha condición. Así, la cepa JR1 observó un aumento de actividad específica en GS que incluso es de casi dos veces durante las fases de crecimiento exponencial y estacionario (ver Fig.11), mientras que la actividad de GOGAT aumenta solo un poco, pero se mantiene durante todo el crecimiento.

Las desviaciones estándar calculadas de 3 experimentos confirman tal diferencia entre la cepa JR1 y la cepa silvestre de *K. lactis*. Por lo tanto la carencia de GDH-NADPH causa un incremento en las actividades de la vía GS-GOGAT como un mecanismo compensatorio; razón por la cual se concluye que para el metabolismo de *K. lactis* la vía GS-GOGAT tiene una mayor importancia y que la vía GDH-NADPH representa solo una vía compensatoria en la asimilación del amonio y síntesis de glutámico.

Referencias :

- Anderson,M.P.,Vance,C.P.,Heichel,G.H. y Miller,S.S.(1989). Purification and characterization of NADH-glutamate synthase from alfalfa root nodules. *Plant Physiol.* 90:351-358.
- Barel,I. y MacDonold,D.W.(1993). Enzyme defects in glutamate-requiring strains of *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol.Lett.* 113: 267-272.
- Benachenhou,N.,Forterre,P. y Labedan,B.(1993). Evolution of glutamate dehydrogenase genes: Evidence for two paralogous protein families and unusual branching patterns of the Archaeobacteria in the universal tree of life. *J.Mol.Evol.* 36:335-346.
- Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72:248-254.
- Bravo,A. y Mora,J.(1988). Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. *J. Bacteriol.* 170:980-984.
- Castano,I.,Flores,N.,Valle,F.,Covarrubias,A.A. y Bolívar,F. (1992). *gltF*, a member of the *gltBDF* operon of *Escherichia coli*, is involved in nitrogen-regulated gene expression. *6:2733- 2774*.
- Chen,F.L. y Cullimore,J.V.(1988). Two isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* 88:1411-1417.
- Cogoni,C.,Valenzuela,L.,González-Halphen,D.,Olivera,H., Macino,G.,Ballario,P. y González,A. (1995). *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high-molecular-weight polypeptide. *J.Bacteriol.* 177:792-798.
- Doherty,D.(1970). L-Glutamate dehydrogenases (yeast). *Meth.Enzimol.* 17:850-856.
- Ferguson,A.R. y Sims,A.P.(1974). The regulation of glutamine metabolism in *Candida utilis*: the role of glutamine synthetase. *J.Gen.Microbiol.* 80:159-171.
- Folch,J.L.,Antaramián,A.,Rodríguez,L.,Bravo,A.,Brunner,A. y González,A.(1989). Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with impaired glutamate synthase activity. *J.Bacteriol.* 171:6776-6781.
- González,A.,Membrillo-Hernández,J., Olivera,H., Aranda,C., Mocino,G., y Ballario,P.(1985). Cloning of a yeast gene coding for the glutamate synthase small subunit (*GUS2*) by complementation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* glutamate auxotrophs. *Mol. Microbiol.* 36:123-129.

González-Halphen,D.,Lindorfer,M.A. y Capaldi,R.A.(1988). Subunit arrangement in beef heart complex III. *Biochem.* 27:7021-7031.

Hayakawa,T.,Yamaya,T.,Kamashi,K.(1992). Purification, characterization and immunological properties of NADH-dependent glutamate synthase from rice cell cultures. *Plant Physiol.* 98:1317-1322.

Helling,R.B.(1994). Why does *Escherichia coli* have two primary pathways for synthesis of glutamate. *J.Bacteriol.* 176:4664-4668.

Hendriks,L.,Goris,A.,VandePeer,Y.,Neefs,Y.M.,Vancanneyt,M.,Kerstens,K.,Berny,J.F., Hennebert,G.L. y De Waechter,R. (1992). Phylogenetic relationships among ascomycetes and ascomycetes-like yeast as deduced from small ribosomal subunit RNA sequences. *Sistemaf.Applied Microbiol.* 15:98-104.

Holmes,A.R.,Collings,A.,Farnen,K.J.F. y Sheperd,M.G. (1989). Ammonium assimilation by *Candida albicans* and other yeast: evidence for activity of glutamate synthase. *J.Gen.Microbiol.* 135:1423-1430.

Holzer,H. & Schneider,S. (1957). Anreicherung und Trennung einer DPN-spezifischen und einer TPN-spezifischen Glutaminsäure Dehydrogenase aus Hefe. *Biochemische Zeitschrift.* 329:361-367.

Hummelt,G. y Mora,J.(1980). Regulation and function of glutamate synthase in *Neurospora crassa*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 96:1688-1694.

Kim,K.H. y Rhee,S.G. (1988). Sequence of peptides from *Saccharomyces cerevisiae* glutamine synthetase. *J.Biol.Chem.* 263:833.

Lea,P.J.,Robinson,S.A., y Steward,G.R. (1990). The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine, pp 121-159. In Millin,B.J. y P.J.Lea (eds.), *The biochemistry of plants, Intermediary Nitrogen Metabolism*, Vol. 16. San Diego Academic Press.

Lloyd,A.T. y Sharp,P.M.(1993). Synonymous codon usage in *Kluyveromyces fragilis*. *Yeast* 9:1219-1228.

Laminitz,A.,Calderón,J.Hernandez,G. y Mora,J.(1987). Functional analysis of ammonium assimilation enzymes in *Neurospora crassa*. *J.Gen. Microbiol.* 133:2333-2340.

Lowry,O.H.,Rosebraugh,N.J.,Farr,A.L. y Randall,R.J.(1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193:265-275.

Magasanik,B.(1992). The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Gene Expression. Vol. II. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 283-318.

Mäntsälä,P.,Zalkin,H.(1976). Active Subunits of *Escherichia coli* Glutamate synthase. J.Biol.Chem. 251:3300-3305.

Marquès,S.,Florencio,F.J.y Candau,P.(1992). Purification and characterization the ferredoxin-glutamate synthase from the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 6201. Eur.J.Biochem. 206:69-77.

Masters,D.S. y Meister,A.(1982). Inhibition by homocysteine sulfonamide of glutamate synthase purified from *Saccharomyces cerevisiae*. J.Bacteriol. 257:8751-8715.

Meers,J.L.,Tempest,D.W. y Brown,C.M.(1970). Glutamine (amide): 2-oxoglutarate amino transferase oxidoreductase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. J.Gen.Microbiol. 64:187-194.

Mifflin,B.J.,Lea,P.J. y Wallsgrove,R.M.(1980). The role of glutamine in ammonium assimilation and reassimilation in plants. p. 213-234. in Mora,J. y Palacios,R.(eds.), Glutamine: metabolism, enzymology and regulation. Academic Press,New York.

Miller,R.E. y Stadman,E.R.(1972). Glutamate synthase from *Escherichia coli*. An iron-sulfide flavoprotein. J.Biol.Chem. 247:7407-7419.

Miller,S.M. y Magasanik,B.(1990). Role of NAD-linked glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. J.Bacteriol. 172:4927-4935.

Miranda,M., Ramírez,J., Guevara,S.,Ongay,L.,Peña,A. y Coria,R.(1995). Nucleotide sequences and chromosomal localization of the gene encoding the old yellow enzyme from *Kluyveromyces lactis*. Yeast 11:459-465.

Moye,W.S.,Amuro,N.,Rao,J.K.M. y Zalkin,H.(1985). Nucleotide sequence of yeast GDH1 encoding nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenase. J.Biol.Chem. 260:8502-8508.

Nagasu,T. y Hall,B.(1985). Nucleotide sequence of the GDH gene coding for the NADP-specific glutamate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. 37:247-253.

Nagatani,H., Shimizu,M., Valentine,R.C. (1971). Arch. Microbiol. 79:164-175.

Nasmyth,K.A. y Reed,S.I. (1980). Isolation of genes by complementation in yeast; molecular cloning of a cell-cycle gene. Proceed.Nat.Acad.Sci.USA. 77:2119-2123.

Reitzer,L.J. y Magasanik,B.(1987). Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology(ed. F.C.Neidhard et.al.),p.302. American Society for Microbiology, Washington,D.C.

Roon,R.J., Even,H.L. y Lorimore,F. (1974). Glutamato sintasa: propiedades de la reducida nicotinamida adenina dinucleotido-dependiente enzima de *Saccharomyces cerevisiae*. J.Bacteriol. 118:89-95.

Sokokibora,H.,Watanabe,M.,Hase,T. y Sugiyama,T.(1991). Molecular cloning and characterization of complementary DNA encoding for ferredoxin-dependent glutamate sintasa in maize leaf. J.Biol.Chem. 266:2028-2035.

Sambrook,J.,Fritsch,E.F. y Maniatis, T.(1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor, New York.

Schögger,H.,Link,T.A.,Engel,W.D. y Von Jagow,G. (1986). Isolation of the eleven protein subunits of the bc₁ complex from beef heart. Meth.Enzymol. 126:224-237.

Senior,P.J.(1975). Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* y *Klebsiella aerogenes*: studies with the continuous culture technique. J.Bacteriol. 123:407-418.

Sor,F. y Fukuhoro,H.(1989). Analysis of chromosomal DNA patterns of the genus *Kluyveromyces*. Yeast 5:1-10.

Struhl,K. y Davis,R.W.(1981) Transcription of the *his3* gene region in *Saccharomyces cerevisiae*. J.Mol.Biol. 152:535-552.

Suzuki,A. y Gadol,P.(1984). Glutamato sintasa : physicochemical and functional properties of different forms in higher plants and other organisms. Physiol.Veg. 22:471-486.

Tempest,D.W.,Meers,J.L. y Brown,C.M.(1970). Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. Biochem.J. 117:405-407.

Trotta,P.P.,Plotzer,K.E.B.,Hoschemeyer,R.H. y Meister,A. (1974). Glutamine-binding subunit of glutamate sintasa and partial reactions catalyzed by this glutamide amidotransferasa. Proceed.Nat.Acad.Sci.USA 71:4607-4611.

Tyler,B.(1978). Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. Ann.Rev.Biochem. 47:1127-1162.

Wesołowski-Louvel,M., Breunig,D.K. y Fukuhara,H. *Kluyveromyces lactis*. To appear in "Genetics, Biochemistry, and Molecular Biology of Non-Conventional Yeasts, edited by K.Wolf, Springer Verlag.