

16
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"PARTICIPACION DEL GEN GDH3 EN LA SINTESIS DE GLUTAMATO EN Saccharomyces cerevisiae"

T E S I S

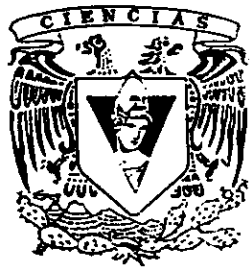
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

LUZ AMARANTA AVENDAÑO VAZQUEZ

DIRECTORA DE TESIS: DR. ANITA GONZALEZ MANJARREZ



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

259981



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 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 Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Participación del gen GDH3 en la síntesis de glutamato
en Saccharomyces cerevisiae".

realizado por Luz Amaranta Avendaño Vázquez

con número de cuenta 9025057-6 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. Alicia González Manjarrez. *Alicia*

Propietario M. en IBB Ma. de Lourdes Valenzuela Sánchez. *Calozul*

Propietario Dra. Luisa Alvarina Alba Lois. *Luisa*

Suplente M. en C. Arturo Carlos II Becerra Bracho.

Suplente Dr. José Ignacio Leguina Aranzamendi. *José*

FACULTAD DE CIENCIAS
D.E.A.M.
[Firma]
Consejo Departamental de Biología
M. en C. Alejandro Martínez Peña.

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

A Odette, Eréndira, Etelvina y Alberto
con mi amor.

A mis abuelos Luz y Gabriel, Ofelia y Alberto.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, a Etel por su ejemplo de voluntad, ternura y amor, de aquí a la Luna y de regreso mamá; a Alberto por su amor, el dibujo, y la música. Por las cosas grandes y chiquititas, gracias a los dos.

A mis dos hermanas Eréndira y Odette por ser mis amigas, por su amor y la compañía a lo largo de muchos días de juegos, las amo.

A mis abuelos Luz y Gabriel, gracias abuelita por las tardes después de la escuela y gracias abuelo por lo soñador y apapachador que eras conmigo y mis hermanas. Gracias tío Nef por ser tan cariñoso con nosotras y por los viajes cada noche a la secundaria por mí y Ere.

A la Dra. Alicia González Manjarrez por la confianza, el entusiasmo y su manera tan especial de vivir y disfrutar la ciencia.

A mis sinodales: Dra. Luisa Alba, Dra. Alicia González, M. IBB. Ma. de Lourdes Valenzuela, Dr. José Ignacio Leguina y al M. en C. Arturo Becerra Bracho por revisar y corregir mi tesis.

A Lourdes, Cristina, Lina, Simón, Hiram, Augusto, Mauricio y Alexander por hacer de cada día en el laboratorio una experiencia interesante y por enseñarme tantas cosas. Gracias por el buen humor, sus gorgoritos y la amistad. Los quiero mucho.

A Soledad Guevara por ser un ejemplo para todos nosotros y ser tan cariñosa conmigo.

A todos nuestros vecinos en el Ote., especialmente a los Coria, Pedro y a la Dra. Ongay, Marce y Lupita por su ayuda en la Unidad de Biol. Molecular.

A mis amigos en el laboratorio de Microbiología de la Fac. de Ciencias: Arturo, Josetxu, Julio, Sara, Claudia, Erwin, Javier, Ulises y Ana. Y con cariño a su bwana Toño;

A Mario y Ramón en Cuernavaca por las llamadas alentadoras y el buen humor.

A mis amigos a lo largo de la vida:

Gerardo Cárdenas, siempre te querré con todo mi corazón; Amalia Yahalit, nunca te olvidaré donde quiera que estés.

A Claudia, Hortensia, Jazmín, Gabriel, Luis y Carlos, gracias por los viernes de cine y pizza, por las matemáticas y los sueños.

A Erika, no importa amiga que estemos separadas, yo te quiero tanto que siempre estás conmigo. Gracias por quererme tú también.

A Mars por permanecer.

A Amanda, te quiero mucho, gracias por las letras, las palabras y la compañía. Gracias por la poesía.

A Adrián, Yaaye, Omar, Dorina y Froylan por rescatarme y bajarme de las nubes de vez en cuando. A Yaaye también por permitirme conocer Oaxaca y a las Tutys.

A Juancho y la Kass, Maira, Toño, Mauricio, Marco y a la Chofi.

Y muy especialmente a la persona que sin su intervención nunca nada de esto hubiera sido posible, al querido Carlos Castillo Pompeyo. Gracias Carlos por escucharme y pensar en mí. Te extrañamos.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Alicia González Manjarrez y la co-dirección de la M. IBB Lourdes Valenzuela, en el Instituto de Fisiología Celular de la U. N. A. M.

CREATIVIDAD

Como todo lo que viene de la parte oculta del mundo, la creatividad del hombre no se puede medir, contar o pesar y no puede entrar por ello en el ámbito de la ciencia. Es, sin embargo, al mismo tiempo condición previa de todo trabajo artístico importante. Lo cual significa lo siguiente: la ciencia descansa sobre una base que ella misma no puede explicar en modo alguno. Naturalmente, la cuestión de la creatividad está íntimamente ligada a la cuestión de la libertad humana, pues el hombre jamás es libre en los supuestos de su existencia, que son como un pasado que ha tomado cuerpo, sino sólo en lo que él saca creativamente de sí mismo y en lo que de esa manera configura su porvenir.

Michael Ende.

ÍNDICE

| | pag. |
|--|------|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | |
| La asimilación de amonio y biosíntesis de glutamato | 3 |
| La GDH1-NADP ⁺ y la GOGAT en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 4 |
| La duplicación génica en la evolución de las macromoléculas biológicas..... | 5 |
| Duplicaciones génicas en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 7 |
| ARTÍCULO | |
| <i>GDH3</i> Encodes a Glutamate Dehydrogenase Isozyme, a Previously Unrecognized route for Glutamate Biosynthesis in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 12 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 16 |
| DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES | 26 |
| PERSPECTIVAS | 30 |
| LITERATURA CONSULTADA | 31 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|---|
| DTT | D, L-ditiotreitol |
| EDTA | ácido etilendiaminotetraacético |
| GDH | glutamato deshidrogenasa |
| <i>gdh1</i> | mutantes en <i>GDH1</i> |
| <i>gdh3</i> | mutantes en <i>GDH3</i> |
| GOGAT | glutamina amida 2-oxoglutarato amidotransferasa / glutamato sintasa |
| <i>glt1</i> | mutantes en <i>GLT1</i> |
| GS | glutamino sintetasa |
| <i>leu2</i> | mutantes en <i>LEU2</i> auxotróficas de leucina |
| MM | medio mínimo para levadura |
| NAD ⁺ | adenina B-nicotinamida dinucleótido |
| NADP ⁺ | adenina B-nicotinamida dinucleótido 3'-fosfato |
| nm | nanómetro |
| nt | nucleótido |
| pb | par de bases nucleotídicas |
| PCR | Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la Polimerasa). |
| rpm | revoluciones por minuto |
| T _m | temperatura media de desnaturalización |
| <i>ura3</i> | mutantes en <i>URA3</i> auxotróficas de uracilo |

RESUMEN

El nitrógeno en la forma en la que se encuentra en la atmósfera terrestre (N_2) no es metabólicamente accesible a la mayoría de los seres vivos, sólo algunos procariontes (fijadores de nitrógeno) lo utilizan y lo reducen para formar amonio (NH_4^+). La asimilación del amonio y la biosíntesis del glutamato, precursor de todas las moléculas nitrogenadas de la célula, se lleva a cabo en gran cantidad de organismos a través de dos vías: una catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa dependiente de $NADP^+$ (GDH- $NADP^+$), y otra que consiste en un ciclo formado por las enzimas glutamino sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT). La levadura *Saccharomyces cerevisiae* posee ambas vías de asimilación de amonio y biosíntesis de glutamato. Como parte del presente trabajo se construyeron mutantes estructurales en los genes *GDH1* y *GLT1*, que codifican para la GDH1- $NADP^+$ biosintética y la GOGAT de *S. cerevisiae* respectivamente, esperando obtener un auxótrofo de glutamato. Sin embargo, la doble mutante (*gdh1, glt1*) resultó ser apta para crecer en amonio como única fuente de nitrógeno, con un tiempo de duplicación tres veces mayor que la cepa silvestre. El hecho de que esta doble mutante presentara una actividad residual de GDH- $NADPH$ sugería la existencia de otra enzima capaz de catalizar la misma reacción que el producto de *GDH1*. Al realizar una comparación de la secuencia nucleotídica de *GDH1* con el genoma completo de *S. cerevisiae*, se encontró un marco de lectura abierto, localizado en el brazo izquierdo del Cromosoma I, con un 75.9 % de identidad con *GDH1*, previamente denominado *GDH3*. Se realizó la interrupción génica de *GDH3* en la doble mutante (*gdh1, glt1*), lo cual resultó en la obtención del primer auxótrofo de glutamato en *S. cerevisiae*, cuyas mutaciones implican sólo a genes estructurales. Posiblemente como resultado de un evento de duplicación, *S. cerevisiae* posee dos genes muy conservados, *GDH1* y *GDH3*,

cuyos productos, según indican nuestros resultados, realizan la misma función, la asimilación del amonio y la biosíntesis del glutamato. Como parte del estudio del metabolismo nitrogenado de *S. cerevisiae* resultará de gran interés estudiar la regulación de *GDH1* y *GDH3*, así como las características cinéticas de sus productos, para saber si se expresan simultánea o diferencialmente en distintas condiciones ambientales: estrés osmótico o térmico, cambios en la fuente de carbono y nitrógeno, condiciones de ayuno de nutrientes, etc; o diferentes condiciones fisiológicas a lo largo del ciclo de vida de *S. cerevisiae*: crecimiento vegetativo, esporulación, etc.

INTRODUCCIÓN

La asimilación de amonio y biosíntesis de glutamato.

El nitrógeno en forma gaseosa (N_2), es el componente mayoritario de la atmósfera de la Tierra, constituyendo el 80 % de ésta. Para su utilización por la mayoría de los seres vivos, debe ser reducido formando amonio (NH_4^+). Esta reducción sólo pueden realizarla organismos procariotas, bacterias del suelo como *Klebsiella* y *Azotobacter*; cianobacterias como *Nostoc* y *Anabaena*; y bacterias simbióticas como *Rhizobium*. El NH_4^+ al ser asimilado por los organismos es incorporado inmediatamente en dos aminoácidos: el glutamato y la glutamina, que posteriormente cederán sus grupos amino o amido, respectivamente, para la síntesis de aminoácidos, nucleótidos, aminoazúcares y otros compuestos nitrogenados.

El glutamato ocupa una posición central en el metabolismo nitrogenado de los organismos, en el caso de las bacterias entéricas y presumiblemente también en las levaduras, aproximadamente el 88 % de todo el nitrógeno celular proviene del grupo amino del glutamato y un 12 % del grupo amido de la glutamina (Reitzer y Magasanik, 1987).

La glutamina es sintetizada por la adición de amonio al glutamato, reacción dependiente de ATP que es catalizada por la glutamino sintetasa (GS), codificada por el gen *GLN1* en *Saccharomyces cerevisiae*. Mutantes de *S. cerevisiae* carentes de esta enzima sólo pueden crecer cuando el medio de cultivo es suplementado con glutamina (Mitchell y Magasanik, 1983; Mitchell, 1985) (Fig. 1).

Se han descrito dos vías para la asimilación de amonio y biosíntesis de glutamato en bacterias, hongos, algas y plantas superiores (Bastarrachea y cols., 1980; Hummelt y Mora, 1980; Marqués y cols., 1992; Senior, 1975; Tempest y cols., 1970). En la primera, la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) cataliza la

aminación reductiva del 2-oxoglutarato para formar glutamato (Holzer y Schneider, 1957). La segunda, cuya existencia demostraron Tempest y cols. en 1970, consiste en el ciclo GS-GOGAT, donde la GS, a partir de glutamato, produce glutamina, cuyo grupo amido toma la glutamato sintasa (GOGAT) para efectuar una transferencia reductiva a la posición dos del 2-oxoglutarato, resultando en la conversión neta de amonio y 2-oxoglutarato en glutamato (Fig.1).

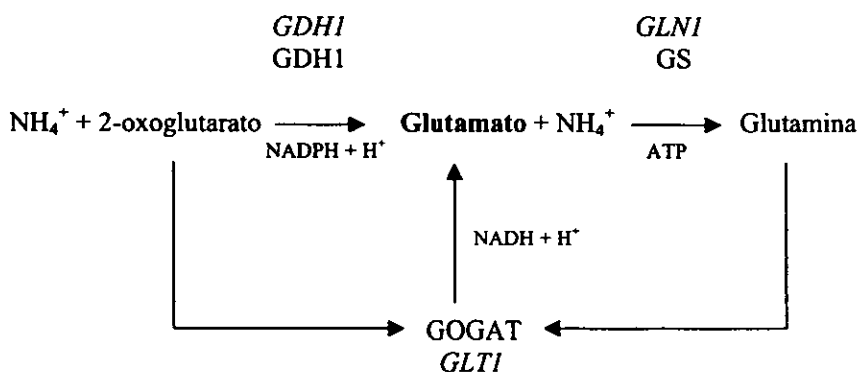


Fig. 1. Vías metabólicas para la asimilación de amonio y biosíntesis de glutamato en *Saccharomyces cerevisiae*.

La GDH1-NADPH y la GOGAT en *Saccharomyces cerevisiae*.

La levadura *S. cerevisiae* posee ambas vías de asimilación de amonio y biosíntesis de glutamato, GDH1-NADP⁺ y GOGAT (Grenson y cols., 1974) (Fig. 1). Roon y cols. (1974) detectaron por primera vez en *S. cerevisiae* la actividad de GOGAT. En 1995, Cogoni y cols. clonaron el gen *GLT1*, que codifica para la GOGAT en *S. cerevisiae*, y obtuvieron las primeras mutantes estructurales por interrupción génica; la enzima purificada y caracterizada por ellos, es similar a la de otros eucariotas. Drillien y Lacroute obtuvieron, en 1972, la primera mutante

estructural en la GDH1-NADP⁺, codificada por el gen *GDH1*, en *S. cerevisiae*. Esta cepa era capaz de crecer en medio mínimo con amonio como única fuente de nitrógeno, con un tiempo de duplicación mayor que el de una cepa silvestre. Se han aislado también mutantes carentes de ambas actividades enzimáticas (Folch y cols., 1989; Miller y Magasanik, 1990). Estas mutantes auxótrofas para glutamato son regulatorias. Hasta hoy no se había reportado el aislamiento y caracterización de una doble mutante estructural en los genes que codifican para GDH1-NADP⁺ y GOGAT, ni de un auxótrofo de glutamato, cuyas mutaciones impliquen únicamente genes estructurales de las vías conocidas.

La duplicación génica en la evolución de las macromoléculas biológicas.

El DNA es la molécula que contiene de la información necesaria para la existencia de la vida, mientras que las proteínas son las responsables de su "construcción", actuando como componentes estructurales, mensajeros, reguladores de la expresión génica y catalizadores de reacciones químicas dentro de la célula (Doolittle, 1985).

Existe la hipótesis de que los sistemas vivos en un principio eran relativamente simples y dependían sólo de un número pequeño de macromoléculas para sus actividades metabólicas. Los procesos evolutivos condujeron a la adquisición de nuevas macromoléculas y habilidades metabólicas, que eventualmente resultaron en la gran diversidad y complejidad bioquímica de las formas de vida de hoy. La evolución biológica ha creado a lo largo del tiempo maquinaria metabólica nueva, es decir, proteínas nuevas codificadas por nuevo DNA (Markert y cols., 1975).

Se ha propuesto que uno de los mecanismos de la evolución de las macromoléculas biológicas es la duplicación génica. Mediante este mecanismo las células adquieren copias de fragmentos génicos, de genes completos, o incluso de porciones considerables del genoma. En algunos casos una copia codificante es conservada para preservar la función original, de tal manera que el organismo no compromete su viabilidad por la falta de una proteína esencial y la copia redundante es, entonces, libre de mutar sin la limitación de la selección natural. Así, pueden ser creadas mejores versiones de la proteína original o una proteína con una función enteramente nueva (Doolittle, 1985). Alternativamente, Hughes (1994) propone que la generación de proteínas con funciones diferentes también podría ser consecuencia de un fenómeno previo a la duplicación génica. En este caso un gen produce una sola proteína que llevaba a cabo dos funciones distintas, al tener lugar la duplicación, las dos (o más) copias generadas se especializan cada una hacia una de las dos funciones ancestrales.

Markert y cols. (1975) han propuesto que el proceso de evolución de un gen es el resultado de dos eventos distintos:

1. Primero el gen original se duplica y la copia diverge de éste por la acumulación de mutaciones que alteran su estructura primaria y, por lo tanto, la estructura y función de su producto.
2. La segunda parte del proceso evolutivo implica cambios en la regulación del nuevo gen con respecto a la copia original, de tal manera que estos cambios, en la regulación de las dos copias, impliquen ventajas selectivas para la célula.

Duplicaciones génicas en *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *S. cerevisiae* es un microorganismo de gran importancia para la bioindustria y uno de los más favorecidos modelos para la investigación biológica por ser un organismo unicelular que puede ser cultivado en medio definido, lo que provee de un control experimental completo sobre su ambiente químico y físico.

S. cerevisiae posee un ciclo de vida ideal para los análisis de genética clásica y es, además, el primer eucarionte cuyo genoma completo ha sido secuenciado (Goffeau y cols., 1997). La secuencia del genoma, que reunió el esfuerzo por parte de más de 70 laboratorios en todo el mundo, fue completada en los primeros meses de 1996 y liberada en las bases de datos el 24 de abril del mismo año (Goffeau y cols., 1997). Esta secuencia (12052kb) representa el genoma nuclear completo de una cepa silvestre, S288C, de *S. cerevisiae*.

Con la secuencia del genoma de *S. cerevisiae* (y aún antes de que ésta estuviera completa) se han realizado diversos análisis. Entre los hallazgos acerca de la estructura general del genoma figura el que se han encontrado gran cantidad de genes duplicados (Melnick y Sherman, 1993; Kaback, 1995; Goffeau y cols., 1996; Mewes y cols., 1997).

Usando el programa de alineamiento de secuencias BLASTP, Wolfe y Shields (1997) han detectado 55 regiones duplicadas en el genoma completo de *S. cerevisiae*, que juntas abarcan el 50% del genoma. En estas regiones el 25 % de los genes (743 de 2905) están duplicados. Entre las posibles explicaciones para la generación de secuencias duplicadas, podemos considerar las dos siguientes: que las duplicaciones hayan tenido lugar de manera independiente (implicando genes, fragmentos de genes o hasta docenas de kilobases); o que tenga lugar una sola

duplicación del genoma entero (lo que produciría tetraploidía), seguida por translocaciones recíprocas entre los cromosomas, produciéndose un mosaico de bloques duplicados similar a los que se han detectado en *S. cerevisiae*. Un dato que apoya esta última hipótesis es que, en 50 de las 55 regiones duplicadas los bloques comprenden grandes zonas de genes homólogos, con el mismo orden y con la misma orientación transcripcional relativa sobre el cromosoma.

A pesar de que la mayoría de las duplicaciones implican un sólo gen, Ohno (1970) propuso que la duplicación de un genoma completo es un importante mecanismo evolutivo. Wolfe y Shields (1997) concluyen que el orden de los genes duplicados en *S. cerevisiae* concuerda con la hipótesis de Ohno y que dicha especie es un tetraploide degenerado, resultado de la duplicación de su genoma completo. Esta tetraploidía pudo generarse al tener lugar la fusión de dos células diploides de levadura, cada una conteniendo aproximadamente 5000 genes. Esta especie llegó a ser diploide y la mayoría (alrededor del 85%) de las copias duplicadas fueron deletadas, resultando la especie actual con un ciclo de vida haploide/diploide y 5800 genes, de los cuales cerca del 50 % están duplicados.

Una vez que el DNA se ha duplicado, éste puede perderse o silenciarse. Así la pérdida gradual de material genético parece caracterizar la evolución de los organismos después de que han ocurrido grandes incrementos en su cantidad de DNA. Este fenómeno se ha observado en el estudio de miembros de la familia Salmonidae y otros peces. El material genético duplicado puede perderse a causa de mutaciones deletéreas, por un entrecruzamiento desigual de los cromosomas o algún otro mecanismo, sin que esto afecte al organismo (Markert y cols., 1975).

Comparaciones de la secuencia genómica así como del orden de los genes, entre *S. cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis*, sugieren que estos dos linages divergieron antes de que ocurriera la propuesta duplicación en *S. cerevisiae*. Esto

haría suponer que *K. lactis* posee genes homólogos para los de *S. cerevisiae*, pero en copia única. El tamaño del genoma de *K. lactis* es de 12000 kb, apenas un poco menos que *S. cerevisiae*, distribuidas en sólo seis cromosomas en lugar de 16. Tomando en cuenta el tiempo estimado de especiación entre estas levaduras (1.5×10^8 años), la duplicación en *S. cerevisiae* debió ocurrir hace aproximadamente 10^8 años (Wolfe y Shields, 1997).

Wolfe y Shields (1997), proponen que la fisiología de la levadura ancestral de *S. cerevisiae* puede haber sido muy diferente a la que es hoy, y quizás más parecida a la de *K. lactis*. La más grande diferencia fisiológica entre *S. cerevisiae* y otras levaduras es su habilidad para fermentar eficientemente los azúcares bajo condiciones de anaerobiosis, produciendo etanol. La duplicación propuesta pudo ser muy importante en la evolución adaptativa para el crecimiento anaerobio. Una evidencia que podría apoyar esta hipótesis es que, dentro de los genes duplicados que se han detectado, se incluyen muchos pares cuyos miembros son regulados diferencialmente en condiciones de aerobiosis o anaerobiosis (*CYC1* y *CYC7*; *COX5A* y *COX5B*), así como diversos genes que participan en el transporte de azúcares. En relación con lo anterior, resulta importante mencionar que el tiempo que se estima ha transcurrido desde que ocurrió la duplicación del genoma completo de *S. cerevisiae*, coincide con el origen y diversificación de las angiospermas, en el Cretácico inferior hace aproximadamente 1.3 a 0.9×10^8 años (Crane y cols., 1995), plantas cuyos frutos proveen a *S. cerevisiae* de azúcares en su hábitat natural.

El genoma de la levadura codifica para aproximadamente 5800 genes, de los que menos de la mitad (43.3%) se conoce su función metabólica y han sido genética y bioquímicamente caracterizados. A estos hay que sumar alrededor del 20 % de las proteínas para las que los datos experimentales son heterogéneos y nos proveen sólo de alguna indicación de su función *in vivo*. El restante 30 % muestra

similitudes con proteínas no caracterizadas, o no son parecidos a algo conocido (Mewes y cols., 1997). Esto significa que, para la mayoría de los 376 pares de genes duplicados en *S. cerevisiae*, la función de ambas copias es desconocida (Wolfe y Shields, 1997). La función de cada gen sólo puede ser demostrada definitivamente por medio de pruebas experimentales, sin estas evidencias los genes permanecen como “huérfanos”, los huérfanos se definen como aquellos genes sin función conocida o sin homólogos de función conocida. Se calcula que hay aproximadamente 2000 genes huérfanos en el genoma de *S. cerevisiae* (Dujon, 1996).

Como ya sucedió con el proyecto de secuenciación, el análisis funcional de los genes requerirá un esfuerzo mundial. En Europa una nueva red de investigación denominada EUROFAN (European Functional Analysis Network) ha sido establecida para el análisis de la función de las nuevas proteínas de la levadura. Actividades paralelas han comenzado en Alemania, Canadá, Estados Unidos y Japón. Evidentemente, la comunidad científica dedicada a la investigación en levadura, está experimentando una gran movilización para llevar a cabo la siguiente fase de la campaña en pro de entender cómo trabaja una de las células eucariontes más simples que se conocen (Goffeau y cols., 1996).

En el presente trabajo se demuestra que el gen *GDH3*, un gen cuya existencia y parecido con su copia dentro del genoma, *GDH1*, se hizo evidente durante la secuenciación del Cromosoma I de *S. cerevisiae*, es capaz de asimilar amonio y participar en la biosíntesis de glutamato. Hemos determinado que la actividad enzimática del producto de *GDH3* es responsable del crecimiento de una cepa que carece de las otras dos enzimas que biosintetizan glutamato en *S. cerevisiae*, la GOGAT y la GDH1-NADP⁺.

Los resultados obtenidos nos han permitido escribir un artículo que se anexa a continuación, dicho trabajo se publicó en el Journal of Bacteriology en septiembre de 1997.

Avendaño, L. A., DeLuna, A., Olivera, H., Valenzuela, L. y A. González. *GDH3* encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**: 5594-5597.

GDH3 Encodes a Glutamate Dehydrogenase Isozyme, a Previously Unrecognized Route for Glutamate Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*

AMARANTA AVENDAÑO, ALEXANDER DELUNA, HIRAM OLIVERA,
LOURDES VALENZUELA, AND ALICIA GONZALEZ*

Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México City, México

Received 9 June 1997/Accepted 27 June 1997

It has been considered that the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, like many other microorganisms, synthesizes glutamate through the action of NADP⁺-glutamate dehydrogenase (NADP⁺-GDH), encoded by *GDH1*, or through the combined action of glutamine synthetase and glutamate synthase (GOGAT), encoded by *GLN1* and *GLT1*, respectively. A double mutant of *S. cerevisiae* lacking NADP⁺-GDH and GOGAT activities was constructed. This strain was able to grow on ammonium as the sole nitrogen source and thus to synthesize glutamate through an alternative pathway. A computer search for similarities between the *GDH1* nucleotide sequence and the complete yeast genome was carried out. In addition to identifying its cognate sequence at chromosome XIV, the search found that *GDH1* showed high identity with a previously recognized open reading frame (*GDH3*) of chromosome I. Triple mutants impaired in *GDH1*, *GLT1*, and *GDH3* were obtained. These were strict glutamate auxotrophs. Our results indicate that *GDH3* plays a significant physiological role, providing glutamate when *GDH1* and *GLT1* are impaired. This is the first example of a microorganism possessing three pathways for glutamate biosynthesis.

Two pathways for ammonium assimilation and glutamate biosynthesis have been found in a variety of organisms. The first one, described by Holzer and Schneider in 1957 (12), is mediated by NADP⁺-glutamate dehydrogenase (NADP⁺-GDH; EC 1.4.1.4), which catalyzes the reductive amination of 2-oxoglutarate to form glutamate. In an alternative pathway demonstrated by Tempest et al. (25), glutamate is aminated to form glutamine by glutamine synthetase (GS; EC 6.3.1.2), the amide group of which is then transferred reductively to 2-oxoglutarate by glutamate synthase (GOGAT; EC 1.4.1.13), resulting in the net conversion of ammonium and 2-oxoglutarate to glutamate. The GS-GOGAT pathway has been found in several microorganisms (2, 13, 16, 23) and in higher plants (18).

In *Saccharomyces cerevisiae*, both pathways for glutamate biosynthesis are present (7, 19). Mutants altered in NADP⁺-GDH have been isolated (6); these show a higher doubling time than that of the wild type when both strains are grown on minimal medium supplemented with ammonia as the sole nitrogen source. Mutants impaired in GOGAT activity were selected from NADP⁺-GDH-less mutants as glutamate auxotrophs (7, 19). Genetic analysis of one of these mutants showed that the lack of GOGAT activity was due to the presence of two mutations (*gus1* and *gus2*), which suggested the existence of two GOGAT enzymes in *S. cerevisiae* (7). Cloning of the GOGAT structural gene (*GLT1*) and construction of null GOGAT mutants definitively established that this yeast possesses a single NADH-GOGAT enzyme (4) and that GOGAT-less mutants (7) which cannot be complemented with *GLT1* (unpublished results) are probably impaired in *GLT1* regula-

tion. In this paper we report the characterization of strains impaired in either *GDH1*, *GLT1*, or both. Our results show that there is a third pathway for glutamate biosynthesis, mediated by an NADP⁺-GDH encoded by *GDH3*.

Mutants impaired in *GDH1* or *GLT1* were derived from strains CLA1 (*ura3 leu2*), CLA2 (*ura3 LEU2*), and CLA3 (*URA3 leu2*) (Table 1). CLA4, a prototrophic derivative of CLA1, was used as a wild-type control (Table 1). Null *glt1Δ* mutants were obtained as previously described (4). Plasmids pLV1 and pLV2 harbored a 4.5-kb *GLT1* fragment and the *URA3* (pLV1) or *LEU2* (pLV2) yeast genes. Both plasmids were sequenced with the Sequenase V.2 kit (U.S. Biochemicals [USB]). Strains CLA2 and DAN1 were transformed according to the method described by Hinnen et al. (10) with *Bgl*II-linearized preparations of pLV1 and pLV2 yielding, respectively, strains CLA5 (*GDH1 GDH3 glt1Δ::URA3*) and DAN2 (*gdh1 GDH3 glt1Δ::LEU2*). Southern analysis was carried out as described by Sambrook et al. (22). The results indicated that plasmid insertion had occurred in the wild-type chromosomal *GLT1* gene. Isolation and characterization of an ethyl methanesulfonate (EMS)-derived *GDH1* mutant has been described previously (7). In order to obtain a null *GDH1* mutant, the following pair of deoxyoligonucleotides was prepared: A1, 5'-CAGAAATTTCAACAAGCTT3', from bp 961 to bp 978 and A2, 5'-ACCGATATCACCAGC3', from bp 1410 to bp 1392 of the *GDH1* gene (20, 21). PCR amplification of yeast genomic DNA was carried out in a thermocycler (PTC-100; MJ Research, Inc.). The 450-bp amplification product was gel purified and ligated into the *Bam*HI-*Sall* site of either YIp5 (24), harboring the *URA3* yeast gene, or YIp351 (9), harboring the *LEU3* yeast gene, generating plasmids pLV3 and pLV4. These subclones were sequenced by primer extension with the Sequenase V.2 kit (USB), confirming that we had specifically amplified a *GDH1* fragment. Plasmids pLV3 and pLV4 were linearized after *Bgl*II digestion and used to direct homologous recombination into the yeast genome, generating strain CLA6

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, 04510 México City, México. Phone: 525 6225631. Fax: 525 6225630. E-mail: amanjarr@ifscunam.ifscil.unam.mx.

TABLE I. *S. cerevisiae* strains

| Strain | Genotype | Source |
|---------|--|----------------------------|
| W303-1A | <i>MATα adel leu2 ura3 trp1 his3 can1-100</i> | Yeast Genetic Stock Center |
| p49 | <i>MATα lys2 gal2</i> | Yeast Genetic Stock Center |
| CN31 | <i>MATα his1 gdh1</i> | Yeast Genetic Stock Center |
| CLA1 | <i>MATα GDH1 GDH3 GLT1 ura3 leu2 (W303-1A \times p49)</i> | This study |
| CLA2 | <i>MATα GDH1 GDH3 GLT1 ura3 LEU2::Y1p351</i> | This study |
| CLA3 | <i>MATα GDH1 GDH3 GLT1 URA3::Y1p5 leu2</i> | This study |
| CLA4 | <i>MATα GDH1 GDH3 GLT1 URA3::Y1p5 LEU2::Y1p351</i> | This study |
| CLA5 | <i>MATα GDH1 GDH3 ghl1Δ::URA3 LEU2::Y1p351</i> | This study |
| CLA6 | <i>MATα gdh1Δ::URA3 GDH3 GLT1 LEU2::Y1p351</i> | This study |
| CLA7 | <i>MATα GDH1 gdh3Δ::LEU2 GLT1 URA3::Y1p5</i> | This study |
| CLA8 | <i>MATα gdh1Δ::LEU2 GDH3 ghl1Δ::URA3</i> | This study |
| CLA9 | <i>MATα GDH1 gdh3Δ::LEU2 ghl1Δ::URA3</i> | This study |
| CLA10 | <i>MATα gdh1Δ::URA3 gdh3Δ::LEU2 GLT1</i> | This study |
| DAN1 | <i>MATα GDH3 GLT1 ura3 leu2 (W303-1A \times CN31)</i> | This study |
| DAN2 | <i>MATα gdh1 GDH3 ghl1Δ::LEU2 ura3</i> | This study |
| DAN3 | <i>MATα gdh1 gdh3Δ::URA3 ghl1Δ::LEU2</i> | This study |

(*gdh1 Δ GDH3 GLT1*) from CLA2. Southern analysis was carried out with the 450-bp *GDH1* insert as a probe. The pattern of transformants clearly indicated that the insertion of the construct had occurred in the wild-type genomic sequence of *GDH1* (Fig. 1).

The *gdh1 Δ* mutant strain CLA5 (*GDH1 GDH3 ghl1 Δ*) showed no growth phenotype, so it was indistinguishable from a wild-type strain grown on ammonium (Fig. 2A). In all cases, cells were grown on minimal medium containing the same salts, trace elements, and vitamins used in yeast nitrogen base medium (Difco Laboratories, Detroit, Mich.). Glucose (2%) was used as the carbon source. As had been found previously (6, 7),

GDH1-less mutants showed a twofold higher duplication time when grown on ammonium (Fig. 2A); on glutamate they grew as well as the wild-type strain (data not shown). A double null mutant devoid of *GDH1* and *GLT1* (CLA8; *gdh1 Δ GDH3 ghl1 Δ*) was prepared by successively transforming strain CLA1 (*GDH1 GLT1 GDH3 ura3 leu2*) with plasmids pLV1 and pLV4. Unexpectedly, the CLA8 double mutant was able to grow on ammonium with a duplication time of 7 h (Fig. 2B), thus indicating the existence of a third pathway for glutamate biosynthesis. Similar results were obtained with a double mutant strain (DAN2) carrying the *GDH1*-less EMS-derived mutation and the *ghl1 Δ* null mutation (Fig. 2B).

Chromosome 1 sequencing revealed the presence of a

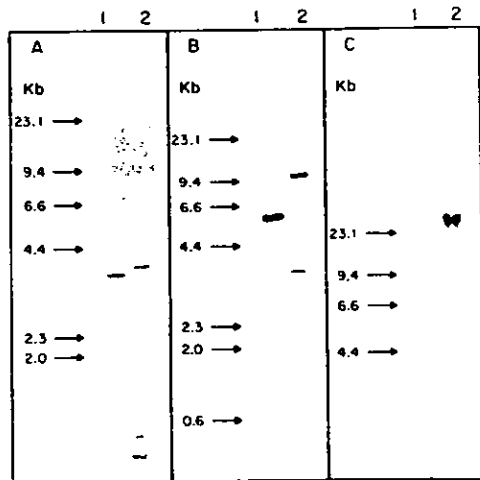


FIG. 1. Southern analysis of DNA. (A) Lanes: 1, wild-type strain (CLA4); 2, *gdh1 Δ* null mutant strain (CLA6) digested with *EcoRI-SalI*. (B) Lanes: 1, wild-type strain (CLA4); 2, *gdh3 Δ* null mutant strain (CLA7) digested with *HindIII*. (C) Lanes: 1, wild-type strain (CLA4); 2, *ghl1 Δ* null mutant (CLA5) digested with *AflII*. Samples in panel A were probed with a 450-bp PCR fragment internal to the *GDH1* gene, samples in panel B were probed with a 760-bp PCR fragment internal to the *GDH3* gene, and samples in panel C were probed with a 4.3-kb fragment internal to the *GLT1* gene.

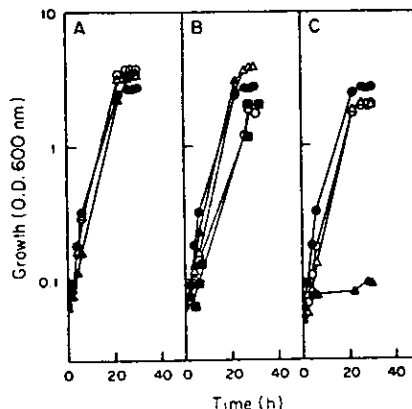


FIG. 2. (A) Growth of strains CLA4 (*GDH1 GDH3 GLT1*) (●), CLA5 (*GDH1 GDH3 ghl1 Δ*) (○), CLA6 (*gdh1 Δ GDH3 GLT1*) (▲), and CLA7 (*GDH1 gdh3 Δ GLT1*) (△). Cells were incubated on minimal medium with 40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. (B) Growth of strains CLA4 (*GDH1 GDH3 GLT1*) (●), CLA8 (*gdh1 Δ GDH3 ghl1 Δ*) (○), CLA9 (*GDH1 gdh3 Δ ghl1 Δ*) (▲), CLA10 (*gdh1 Δ gdh3 Δ GLT1*) (△), and DAN2 (*gdh1 GDH3 ghl1 Δ*) (■). Cells were incubated on minimal medium with 40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Cultures of strain DAN2 were supplemented with 0.2 mM uracil. (C) Growth of strains CLA4 (*GDH1 GDH3 GLT1*) (●) and DAN3 (*gdh1 gdh3 Δ ghl1 Δ*) (▲) on minimal medium with 40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and strains CLA4 (○) and DAN3 (△) on minimal medium with 5 mM glutamate as the sole nitrogen source. O.D., optical density.

1.37-kb open reading frame showing 75.9% nucleotide sequence identity to *GDH1*; it was termed *GDH3* (3). In order to determine whether *GDH3* was responsible for the growth observed when the double mutant strains *CLA8* and *DAN2* were grown on ammonium, two pairs of deoxyoligonucleotides based on the nucleotide sequence of the *GDH3* open reading frame (3) were prepared: G1, 5'TTCTGTGGAGGATCCAAA3', and G2, 5'CGGAAGCGATATCGTGA3', from positions 29029 to 29048 and 29791 to 29775 of chromosome I, respectively. PCR amplification of yeast genomic DNA was carried out in a PTC-100 thermocycler (MJ Research, Inc.). A 760-bp *GDH3* PCR product was gel purified and cloned into the *Bam*HI-*Sal*I site of either *YIp5* (24), harboring the *URA3* yeast gene, or *YIp351* (9), harboring the *LEU2* yeast gene, generating plasmids pLV5 and pLV6. Both subclones were sequenced by primer extension with the Sequenase V.2 kit (USB), confirming that we had specifically amplified a *GDH3* fragment. Plasmids pLV5 and pLV6 were linearized after *Bgl*II digestion and used to direct homologous recombination into the yeast genome. This allowed the construction of *gdh3Δ* null mutant strains *CLA7* (*GDH1 gdh3Δ GLT1*), *CLA9* (*GDH1 gdh3Δ ghl1Δ*), and *CLA10* (*gdh1Δ gdh3Δ GLT1*). The triple mutant strain *DAN3* (*gdh1 gdh3Δ ghl1Δ*) was constructed from strain *DAN2* by *GDH3* disruption due to pLV6 insertion; *DAN2* already carried the *gdh1* EMS point mutation and the *ghl1Δ* null allele (Table 1). Southern analysis was carried out with the 760-bp *GDH3* insert as a probe. The pattern of transformants clearly indicated that the insertion had occurred in the wild-type genomic sequence of *GDH3* (Fig. 1).

As can be seen in Fig. 2A and B, both the single *gdh3Δ* mutant and the double *ghl1Δ gdh3Δ* mutant showed no growth phenotype compared to the wild-type strain. The double null mutant strain *CLA10* (*gdh1Δ gdh3Δ*) had a 4.5-h duplication time, the same phenotype displayed by the single *gdh1* (EMS) (7) and *gdh1Δ* mutants (Fig. 2A and B). However, the triple *gdh1 gdh3Δ ghl1Δ* (*DAN3*) (Fig. 2C) mutant behaved as a full glutamate auxotroph, indicating that the growth observed when the double *gdh1Δ ghl1Δ* (*CLA 8*) and *gdh1 ghl1Δ* (*DAN2*) mutants were grown on ammonium was due to the presence of *GDH3*.

NADP⁺-*GDH* and *GOGAT* activities were determined as described previously (5, 7) in extracts obtained from strains harboring various combinations of the *gdh1*, *gdh1Δ*, *gdh3Δ*, and *ghl1Δ* mutations. Cells were allowed to grow to an optical density at 600 nm of 0.8 to 1.0 and collected by centrifugation. Soluble extracts were prepared by suspending whole cells in their corresponding extraction buffers (5, 7) and grinding them with glass beads in a Vortex mixer. It was found that both the EMS-derived *gdh1* strain and the *gdh1Δ* mutant showed residual *NADP*⁺-*GDH* activity, which increased 12- to 15-fold in the absence of *GOGAT* (Table 2). The double mutant carrying mutations on both *GDH1* and *GDH3* completely lacked *NADP*⁺-*GDH* activity (Table 2). Moreover, the *NADP*⁺-*GDH* activity detected in the wild-type strain was consistently higher than that found in a *GDH1 gdh3Δ* mutant. Thus, we have concluded that the residual *NADP*⁺-*GDH* activity observed in a *GDH1*-less mutant corresponds to a *NADP*⁺-*GDH* isoenzyme encoded by *GDH3* (*NADP*⁺-*GDH3*). The fact that the *NADP*⁺-*GDH* activity was higher in a double mutant impaired in both *GDH1* and *GLT1* than that found in a *gdh1 GLT1* mutant (Table 2) suggests that *GDH3* expression may be down regulated by glutamate. Two observations completely negate the possibility that the *NADP*⁺-*GDH* activity found in a *GDH1* mutant could be attributed to a leaky phenotype: first, null and EMS-derived *GDH1* mutations still show *NADP*⁺-

TABLE 2. *NADP*⁺-*GDH* and *GOGAT* specific activities^a

| Strain (relevant genotype) | Sp act | |
|--|--|---------------------------|
| | <i>NADP</i> ⁺ - <i>GDH</i> ^b | <i>GOGAT</i> ^c |
| <i>CLA4</i> (<i>GDH1 GDH3 GLT1</i>) | 300 (43) | 26 (9) |
| <i>CLA5</i> (<i>GDH1 GDH3 ghl1Δ</i>) | 420 (83) | ND ^d |
| <i>CLA6</i> (<i>gdh1Δ GDH3 GLT1</i>) | 1.6 (0.38) | 52 (18) |
| <i>CLA7</i> (<i>GDH1 gdh3Δ GLT1</i>) | 190 (28) | 25 (1.6) |
| <i>CLA8</i> (<i>gdh1Δ GDH3 ghl1Δ</i>) | 24 (6) | ND |
| <i>CLA9</i> (<i>GDH1 gdh3Δ ghl1Δ</i>) | 220 (30) | ND |
| <i>CLA10</i> (<i>gdh1Δ gdh3Δ GLT1</i>) | ND | 50 (16) |
| <i>CN31</i> (<i>gdh1 GDH3 GLT1</i>) | 2.0 (0.40) | 47 (17) |
| <i>DAN2</i> (<i>gdh1 GDH3 ghl1Δ</i>) | 25 (8) | ND |

^a Five measurements of *NADP*⁺-*GDH* and *GOGAT*; cells were grown to an optical density at 600 nm of 0.8 with 40 mM (NH₄)₂SO₄.

^b Expressed as nanomoles of *NADPH* oxidized per minute per milligram of protein (15). The reported values are the means of five experiments. Numbers in parentheses are standard deviations.

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

^d ND, not detected.

GDH residual activity; second, disruption of *GDH3* in a *gdh1* background completely abolishes *NADP*⁺-*GDH* activity.

The fact that only triple mutants impaired in *GDH1*, *GDH3*, and *GLT1* are glutamate auxotrophs shows that *S. cerevisiae* has three pathways for glutamate biosynthesis and that all of them must be abolished in order to attain full glutamate auxotrophy.

The presence of two pathways for glutamate biosynthesis in several microorganisms has stimulated discussion on the need for two routes for the biosynthesis of the same end product. The role of these two pathways has been clearly elucidated in *Klebsiella aerogenes* and *Neurospora crassa*. In *K. aerogenes*, the GS-*GOGAT* pathway functions to assimilate ammonium and synthesize glutamate when the ammonium concentration is low, while *GDH* plays this role when the cells are cultivated under ammonium excess (17, 25). In *N. crassa*, it has been shown that the main function of *GOGAT* is the recycling of some organic nitrogen from glutamine to glutamate and that both *GDH* and *GOGAT* are involved in glutamate synthesis either under excess or limiting amounts of ammonium (14). For *Escherichia coli*, it has been recently proposed that glutamate biosynthesis may proceed through *NADP*⁺-*GDH* when the cell is energy limited, while the GS-*GOGAT* pathway functions when the cell is not under energy limitation (8). The roles of *GDH* and the GS-*GOGAT* pathways have been studied in some yeasts. For *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*, and *Kluyveromyces fragilis*, evidence indicates that the GS-*GOGAT* pathway is the major pathway for ammonium assimilation (1, 11, 26). Regarding the role that *GDH1*, *GDH3*, and *GLT1* play in glutamate biosynthesis in *S. cerevisiae*, our results indicate that, in the presence of *GDH1*, the lack of either *GDH3* or *GLT1* does not result in partial glutamate auxotrophy, suggesting that *GDH1* constitutes the major pathway for glutamate biosynthesis. Simultaneous impairment of *GDH1* and *GLT1* does not result in full glutamate auxotrophy, and double mutants are able to grow on ammonium. Strains lacking *GDH1* and *GDH3* display the same phenotype as that found for single *GDH1* mutants, that is, they are both glutamate prototrophs. These results indicate that glutamate biosynthesis is mainly achieved through *NADP*⁺-*GDH1* and *GOGAT*.

The isolation of strains partially deleted in *GDH3* has been reported by Wilkinson et al. (27). Those authors concluded

that *GDH3* is not involved in glutamate biosynthesis; this finding was probably due to the fact that they used *GDH1 GLT1* strains to analyze the role of *GDH3*. By contrast, our results show that *GDH3* does play a physiologically significant role in glutamate biosynthesis, allowing considerable growth of the *gdh1 glt1* double mutant in ammonium. However, the individual contributions of NADP^+ -GDH1, NADP^+ -GDH3, and GOGAT in glutamate biosynthesis under different physiological conditions remain to be addressed. Finally, the use of the same cofactor and substrates by NADP^+ -GDH1 and NADP^+ -GDH3 and the high similarity index in their gene sequences argue in favor of divergent evolution of one from the other and perhaps of differences in expression as needed according to physiological cell conditions. We are currently purifying *GDH3* and characterizing its promoter in order to address this matter.

To our knowledge, *S. cerevisiae* is, so far, the only organism having three pathways for glutamate biosynthesis. Since a lack of either GDH or GOGAT does not result in glutamate auxotrophy in most microorganisms, selection of mutants affected in these two pathways has been done by using phenotypic traits supposedly associated with the lack of either GDH or GOGAT. This kind of selection may be biased and in some cases could have resulted, as in *S. cerevisiae*, in the isolation of regulatory mutants affecting more than one pathway for glutamate biosynthesis. Further analysis of the glutamate auxotrophs that have been obtained in other microorganisms may help uncover the existence of additional pathways for glutamate biosynthesis.

We are grateful to Cristina Aranda for skillful technical assistance, to Simon Guzmán and Lina Riego for helpful discussions, and to Guadalupe Espin, Gloria Soberón, and Fernando Bastarrachea for critical review of the manuscript.

This work was supported in part by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (IN204695), and CONACyT (400360-5-2549PN).

REFERENCES

- Barel, L., and D. W. MacDonald. 1993. Enzyme defects in glutamate-requiring strains of *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol. Lett.* 113:267-272.
- Bravo, A., and J. Mora. 1988. Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. *J. Bacteriol.* 170:980-984.
- Bessey, H., D. Kaback, W. Zhong, D. T. Vo, M. W. Clark, N. Fortin, J. Hall, B. F. Ouellette, T. Keng, A. B. Barton, Y. Su, C. J. Davies, and R. K. Storms. 1995. The nucleotide sequence of chromosome I from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3809-3813.
- Cogoni, C., J. Valenzuela, D. González-Halphen, H. Olivera, G. Macino, P. Ballarín, and A. González. 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). *Methods Enzymol.* 17:850-856.
- Driffler, R., and F. Lacroute. 1972. Ureidodisuccinic acid uptake in yeast and some aspects of its regulation. *J. Bacteriol.* 109:203-208.
- Folch, J. L., A. Antaramián, L. Rodríguez, A. Bravo, A. Brunner, and A. González. 1989. Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with impaired glutamate synthase activity. *J. Bacteriol.* 171:6776-6781.
- Helling, R. B. 1994. Why does *Escherichia coli* have two primary pathways for synthesis of glutamate? *J. Bacteriol.* 176:4664-4668.
- Hill, J. E., A. M. Myers, T. J. Koerner, and A. Tringoloff. 1986. Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* 2:163-167.
- Himeno, A., J. B. Hicks, and G. R. Flah. 1978. Transformation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929-1933.
- Holmes, A. R., A. Collings, K. J. F. Farnden, and M. G. Sheperd. 1989. Ammonium assimilation by *Candida albicans* and other yeasts: evidence for activity of glutamate synthase. *J. Gen. Microbiol.* 135:1423-1430.
- Holzer, H., and S. Schneider. 1957. Anreicherung und Trennung einer DPN-spezifischen und einer TPN-spezifischen Glutaminsäure Dehydrogenase aus Hefe. *Biochem. Z.* 329:361-367.
- Hummelt, G., and J. Mora. 1980. Regulation and function of glutamate synthase in *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96:1688-1694.
- Lomnitz, A., J. Calderón, G. Hernández, and J. Mora. 1987. Functional analysis of ammonium assimilation enzymes in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 133:2333-2340.
- 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.
- Marqués, S., F. J. Florêncio, and P. Candau. 1992. Purification and characterization of the ferredoxin-glutamate synthase from the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 6301. *Eur. J. Biochem.* 206:69-77.
- Meers, J. L., D. W. Tempest, and C. M. Brown. 1970. Glutamine (amide): 2-oxoglutarate aminotransferase oxidoreductase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 64:187-194.
- Mifflin, B. J., P. J. Lea, and R. M. Wallsgrove. 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, N.Y.
- Miller, S. M., and B. Magasanik. 1990. Role of NAD-linked glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 172:4927-4935.
- Moye, W. S., N. Amuru, J. K. M. Rao, and H. Zalkin. 1985. Nucleotide sequence of yeast *GDH1* encoding nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 260:8502-8508.
- Nagasu, T., and B. D. Hall. 1985. Nucleotide sequence of the *GDH1* gene coding for the NADP-specific glutamate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 37:247-253.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 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.
- Strubl, K., D. T. Silencheomb, S. Scherer, and R. W. Davis. 1979. High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1035-1039.
- Tempest, D. W., J. L. Meers, and C. M. Brown. 1970. Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. *Biochem. J.* 117:405-407.
- Valenzuela, L., S. Guzmán León, R. Coria, J. Ramírez, C. Aranda, and A. González. 1995. A NADP-glutamate dehydrogenase mutant of the pettinegative yeast *Kluyveromyces fragilis* uses the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway for glutamate biosynthesis. *Microbiology* 141:2443-2447.
- Wilkinson, B. M., C. M. James, and R. M. Walsley. 1996. Partial deletion of the *Saccharomyces cerevisiae GDH3* gene results in novel starvation phenotypes. *Microbiology* 142:1667-1673.

MATERIALES Y MÉTODOS.

I. Resumen de las cepas utilizadas en este estudio.

Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

| Cepa | Genotipo | Fuente |
|---------|--|----------------------------|
| W303-1A | <i>MATα adel leu2 ura3 trp1 his3 can1-100</i> | Yeast Genetic Stock Center |
| p49 | <i>MATα lys2 gal2</i> | Yeast Genetic Stock Center |
| CN31 | <i>MATα his1 gdh1</i> | Yeast Genetic Stock Center |
| CLA1 | <i>MATα GDH1 GDH3 GLT1 ura3 leu2 (W303-1A x p49)</i> | Este trabajo |
| CLA2 | <i>MATα GDH1GDH3 GLT1 ura3 LEU2::Yip351</i> | Este trabajo |
| CLA3 | <i>MATα GDH1 GDH3 GLT1URA3::Yip5 leu2</i> | Este trabajo |
| CLA4 | <i>MATα GDH1 GDH3 GLT1URA3::Yip5 LEU2::Yip351</i> | Este trabajo |
| CLA5 | <i>MATα GDH1GDH3 gtl1Δ::URA3 LEU2::Yip351</i> | Este trabajo |
| CLA6 | <i>MATα gdh1Δ::URA3 GDH3 GLT1 LEU2::Yip351</i> | Este trabajo |
| CLA7 | <i>MATα GDH1 gdh3 Δ::LEU2 GLT1 URA3::Yip5</i> | Este trabajo |
| CLA8 | <i>MATα gdh1 Δ::LEU2 GDH3 gtl1 Δ::URA3</i> | Este trabajo |
| CLA9 | <i>MATα GDH1 gdh3 Δ::LEU2 gtl1 Δ::URA3</i> | Este trabajo |
| CLA10 | <i>MATα gdh1 Δ::URA3 gdh3 Δ::LEU2 GLT1</i> | Este trabajo |
| DAN1 | <i>MATα gdh1GDH3 GLT1 ura3 leu2 (W303-1A x CN31)</i> | Este trabajo |
| DAN2 | <i>MATα gdh1 GDH3 gtl1 Δ::LEU2 ura3</i> | Este trabajo |
| DAN3 | <i>MATα gdh1 gdh3 Δ::URA3 gtl1Δ::LEU2</i> | Este trabajo |

Tabla 1. Muestra el genotipo de las cepas mutantes en *GLT1*, *GDH1* y *GDH3* generadas y utilizadas en este trabajo.

II. Construcción de cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*.

II.1. Interrupción del gen *GLT1* de *S. cerevisiae*.

A partir de la cepa CLA1, CLA2 y de la cepa DAN1 se construyeron todas las cepas analizadas en este trabajo. Se usó el método de transformación de esferoplastos descrito por Hinnen y cols. (1978).

Utilizando una librería genómica de *S. cerevisiae* se obtuvo el fragmento *EcoRI-EcoRI* de 4255 pb, del gen *GLT1* (Cogoni y cols., 1995). Este fragmento se subclonó en el sitio *EcoRI* de los plásmidos integrativos Yip5 y Yip 351 obteniéndose los plásmidos pLV1 y pLV2, que complementan la auxotrofia para uracilo (*URA3*) y leucina (*LEU2*), respectivamente (Fig. 1A). Los plásmidos pLV1 y pLV2 se digirieron con *Bgl*III, que tiene dos sitios de corte en la secuencia de *GLT1* contenida en los vectores, y con el ADN lineal se transformó a las cepas CLA2 y DAN1; se recuperaron las células protótrofas para uracilo o leucina, y se verificó la interrupción del gen *GLT1* sobre la copia cromosomal de *Saccharomyces* con un análisis de tipo Southern, descrito por Sambrook et al. (1989). Para este análisis el ADN genómico de las mutantes *glt1*: CLA5 y DAN2, y de la cepa silvestre CLA 4, se digirió con *Afl*III, y se hibridizó utilizando como sonda el fragmento de 4255 pb de *GLT1*. Así mismo, se midió la actividad enzimática de NADH-GOGAT en estas cepas.

A.

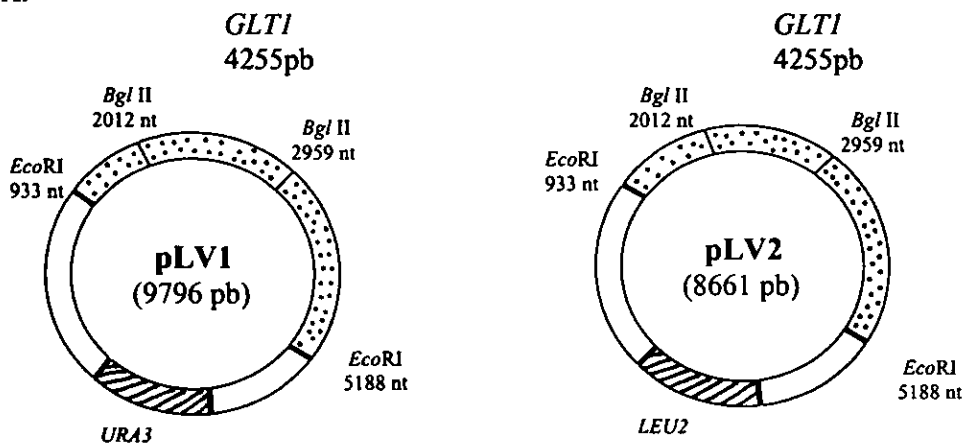


Fig. 1.A. Construcciones pLV1 y pLV2.

B.

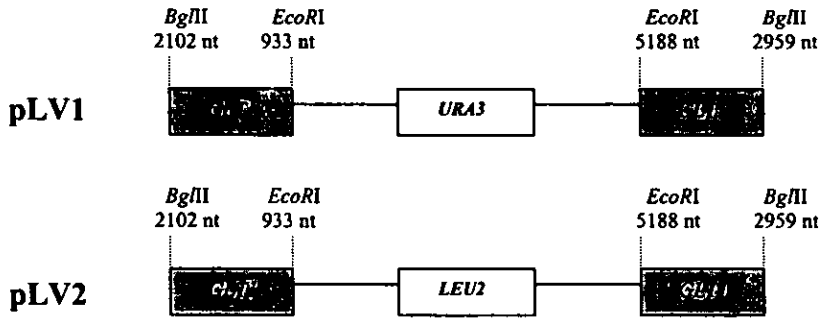


Fig. 1. B. Forma lineal de pLV1 y pLV2, obtenida digiriendo con *Bgl*III, que se utilizó para interrumpir *GLT1* en las cepas CLA2 y DAN1, generando las cepas CLA5 y DAN2.

II. 2. Interrupción del gen *GDH1*.

Con base en la secuencia previamente reportada por Moye y cols. (1985) y Nagasu y cols. (1985), se diseñaron los desoxioligonucleótidos correspondientes para la amplificación de un fragmento de 448 pb, con un sitio de corte interno para *Bgl*III, de *GDH1* (del nucleótido 11 al 459 del gen). La amplificación utilizando la técnica de PCR sobre ADN genómico de la cepa silvestre S288C de *S. cerevisiae*, se realizó en un aparato termociclador (PTC-100; MJ Research, Inc.) el programa que se utilizó se muestra en la Fig. 2. Los desoxioligonucleótidos fueron diseñados de manera que adicionan un sitio *Bam*HI y un sitio *Sal*I al fragmento de *GDH1* (Fig. 2) para facilitar la subclonación en los sitios *Bam*HI-*Sal*I de los vectores integrativos Yip5 y Yip351, generándose los plásmidos pLV3 y pLV4 respectivamente (Fig. 3A). Los plásmidos pLV3 y pLV4 se digirieron con *Bgl*III

(Fig. 3B) y el ADN lineal se usó para transformar a las cepas CLA1 (que previamente se transformó con el pLV1) y CLA2, para obtener las cepas CLA8 y CLA6. Se verificó la interrupción de la copia cromosomal del gen *GDH1* con un análisis tipo Southern, la hibridización se realizó sobre ADN total de cada cepa *gdh1* y la cepa silvestre, cortado con *EcoRI-SalI*, usando como sonda el fragmento de 448pb de *GDH1*. A estas cepas también se les midió actividad enzimática de GDH-NADP⁺.

DESOXIOLIGONUCLEÓTIDOS

SalI

5' CGCGCGGTCGACCAGAAATTTCAACAAGCTT 3'

T_{m1} : 55.0
T_{m2} : 74.7

BamHI

5' CGCGCGGGATCCAACACCGATATCACCAGC 3'

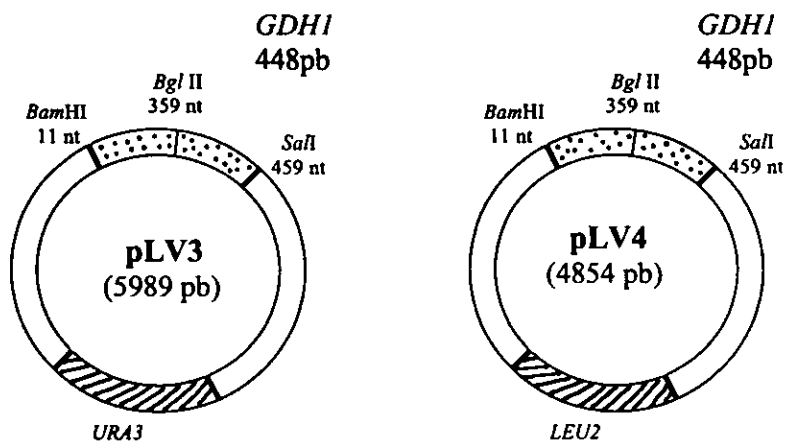
T_{m1} : 61.0
T_{m2} : 78.8

PROGRAMA PARA PCR

- | | | | |
|----|---------|-------|-------------|
| 1) | 3min. | 95 °C | |
| 2) | 1 min. | 95 °C | } 5 ciclos |
| 3) | 1 min. | 50 °C | |
| 4) | 2 min. | 72 °C | |
| 5) | 1 min. | 95 °C | } 40 ciclos |
| 6) | 1 min. | 65 °C | |
| 7) | 2 min. | 72 °C | |
| 8) | 5 min. | 72 °C | |
| 9) | 10 min. | 4 °C | |

Fig. 2. Desoxioligonucleótidos y programa de PCR utilizados para amplificar 448pb de *GDH1* sobre ADN de la cepa silvestre S288C, de *S. cerevisiae*.

A.



B.

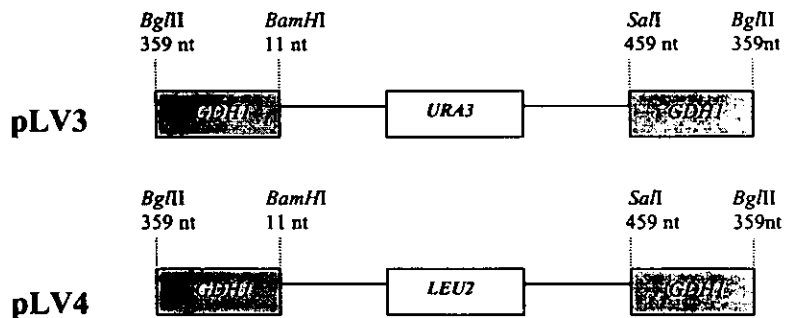


Fig. 3. A. Construcciones pLV3 y pLV4 conteniendo el producto amplificado de 448 pb del gen *GDH1*. B. Forma lineal de pLV3 y pLV4, obtenida digiriendo con *Bg*I II, que se utilizó para interrumpir *GDH1* en las cepas CLA1 y CLA2, generando la CLA6 y CLA8.

II. 3. Interrupción del gen *GDH3*.

Con base en la secuencia reportada en el banco de datos del genoma completo de *S. cerevisiae*, SGD, se diseñaron los desoxioligonucleótidos necesarios para la amplificación por PCR, sobre ADN genómico de la cepa silvestre S288C de *S. cerevisiae*, de un fragmento de 764pb de la región comprendida entre el nucleótido 47 y el 811 del gen *GDH3* (Fig.4A). El fragmento amplificado tiene un sitio de corte interno para *Bgl*II y en cada extremo se le adicionaron un sitio *Bam*HI y un sitio *Sal*I con el fin de facilitar su subclonación en los vectores Yip 5 y Yip 351, generando los plásmidos pLV5 y pLV6 (Fig. 4B). Las transformaciones se realizaron con las formas lineales del pLV5 o pLV6 cortados con *Bgl*II (Fig. 5). La interrupción de la copia cromosomal del gen *GDH3* se verificó con un análisis tipo Southern de la siguiente manera; el ADN genómico de cada cepa *gdh3* y de una cepa silvestre se digirió con *Hind*III, y se utilizó como sonda para la hibridización el producto de amplificación por PCR de *GDH3*. Se midió también la actividad enzimática de GDH-NADP⁺ en las cepas mutantes y silvestre.

II. Condiciones de crecimiento.

Cada una de las cepas mutantes y silvestre se crecieron en un volumen de 100 ml de medio mínimo (MM), en matraces con capacidad de 250 ml. El medio mínimo utilizado consiste en una mezcla de sales, elementos traza y vitaminas según la fórmula de la base nitrogenada para levadura (Laboratorios Difco, Detroit. Michigan) como fuente de carbonó se utilizó glucosa al 2 % (p/v) y como fuente de nitrógeno sulfato de amonio 40 mM, excepto en el caso de la triple mutante DAN3, cuya fuente de nitrógeno fue glutamato 5 mM. Se adicionó uracilo 0.2 mM, leucina 0.2 mM y glutamato 5 mM, para cubrir los requerimientos auxotróficos de las cepas. Los cultivos fueron inoculados a una densidad óptica de

A.
DESOXIOLIGONUCLEÓTIDOS

*Bam*HI
 5' CGCGCGGATCCCTTCTGTGGAGGATTC CAAAA 3'

Tm₁ : 61.0

Tm₂ : 75.85

*Sal*I
 5' CGCGCGGTCGACGGAAGCGATATCGTGA 3'

Tm₁ : 62.0

Tm₂ : 78.0

PROGRAMA PARA PCR

- | | | | |
|----|---------|-------|-------------|
| 1) | 3 min. | 95 °C | |
| 2) | 3 min. | 95 °C | } 5 ciclos |
| 3) | 1 min. | 55 °C | |
| 4) | 2 min. | 72 °C | |
| 5) | 1 min. | 95 °C | } 40 ciclos |
| 6) | 1 min. | 69 °C | |
| 7) | 2 min. | 72 °C | |
| 8) | 5 min. | 72 °C | |
| 9) | 10 min. | 4 °C | |

B.

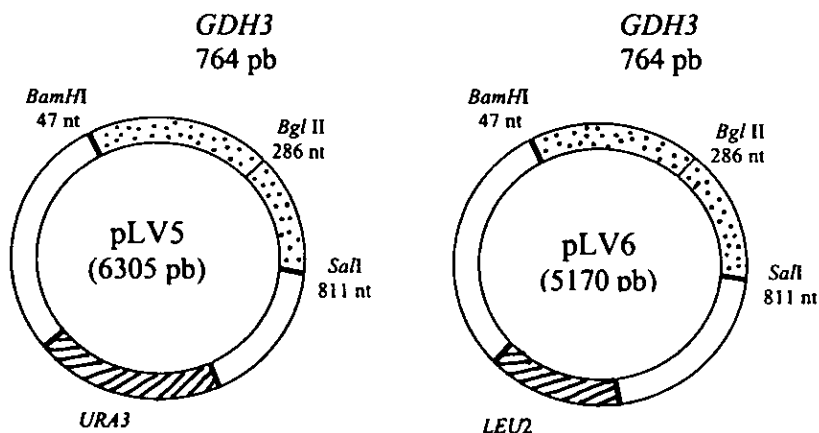


Fig.4. A. Desoxioligonucleótidos y programa de PCR utilizados para amplificar 764pb de *GDH3* sobre ADN de *S. cerevisiae*, cepa S288C. B. Construcciones pLV5 y pLV6 que contienen el fragmento de 764 pb de *GDH3*.

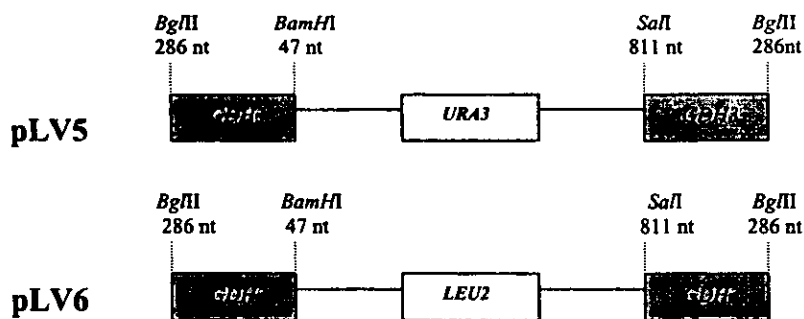


Fig. 5. Forma lineal de pLV5 y pLV6, digiriendo con *Bgl*II, que se usó para interrumpir *GDH3*, generando las cepas CLA7, CLA9, CLA10 y DAN3.

0.05 a 600 nm, e incubados a 30 °C con una agitación de 250 rpm siguiendo su crecimiento midiendo la turbidez del medio (leyendo su absorbencia a 600 nm) cada dos horas. Las células se colectaron a una absorbencia de 0.8, centrifugando a 2500 rpm durante 5 minutos a 4 °C, y se lavaron dos veces con H₂O bidestilada y una vez con amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M pH7.5, EDTA 1mM (Amortiguador A). Los botones celulares se almacenaron a -20 °C por un máximo de 48 hrs.

III. Determinación de la actividad enzimática de GOGAT-NAD⁺ y GDH-NADP⁺.

Para realizar los ensayos enzimáticos se prepararon extractos celulares de cada una de las cepas mutantes y silvestre. Trabajando siempre a 4°C, los extractos se obtuvieron descongelando y resuspendiendo las células en amortiguador A y rompiéndolas mecánicamente con perlas de vidrio, dando 4 ciclos de vortex de 1

minuto de duración, con 1.5 minutos de intervalo entre cada pulso. Las suspensiones celulares así obtenidas se centrifugaron 20 minutos a 14 000 rpm a 4°C, recuperando el sobrenadante, con el que finalmente se realizaron los ensayos de actividad enzimática.

La actividad enzimática de GOGAT-NAD⁺ se determinó por el método descrito por Roon y cols. (1974). La concentración de los sustratos en la mezcla de reacción fue : 2-oxoglutarato 5 mM, glutamina 5 mM, NADH 0.16 mM, disueltos en amortiguador A. Para contar con un testigo negativo de actividad enzimática se adicionó a la mezcla de reacción 100 µl de de azaserina 5 mM , que es un inhibidor no competitivo de amidotransferasas. La actividad específica se determinó como nanomolas de NADH oxidadas por minuto por miligramo de proteína, a una absorbencia de 340 nm.

La actividad de GDH- NADP⁺ se determinó por el método de Doherty (1970). La concentración de los sustratos en la reacción fue: 2- oxoglutarato 3 mM, cloruro de amonio 50 mM y NADPH 0.14 mM, disueltos en amortiguador A. Ya que no existe un inhibidor específico de la actividad de esta enzima fue necesario utilizar como testigos negativos de la actividad enzimática dos mezclas de reacción: una sin 2-oxoglutarato y otra sin cloruro de amonio; las pendientes de estas determinaciones se le restaron a la que generaba el consumo de NADPH en una reacción con todos los sustratos presentes. La actividad específica se determinó como las nanomolas de NADPH oxidadas, a una absorbencia de 340 nm, por minuto por miligramo de proteína.

IV. Determinación del contenido protéico de los extractos celulares.

La cantidad de proteína presente en los extractos celulares de cada cepa mutante analizada se determinó por el método reportado por Lowry en 1951. Se usó como estándar albúmina de suero bovino.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

La secuenciación sistemática del Cromosoma I de *S. cerevisiae* (Bussey y cols., 1995) reveló la presencia de 89 marcos de lectura abiertos, sobre este cromosoma, que es el más pequeño que posee la levadura. Entre los candidatos a genes se encontró el que se denominó *GDH3*, debido a su alta similitud de un 75.9 % a nivel de la secuencia nucleotídica con el gen ya conocido como *GDH1*.

En el presente trabajo se demuestra que *GDH3* codifica para una glutamato deshidrogenasa que participa en la síntesis de glutamato en *S. cerevisiae*. La enzima producto de *GDH3*, en ausencia de los productos de *GLT1* y *GDH1*, es capaz de mantener el crecimiento de las células de levadura con amonio como única fuente de nitrógeno.

La evidencia más importante que apoya la aseveración anterior es que generando mutantes en los genes *GLT1*, *GDH1* y *GDH3* se ha logrado la obtención del primer auxótrofo de glutamato en *S. cerevisiae*, cuyas mutaciones no implican genes reguladores; y que la cepa doble mutante en *GDH1* y *GDH3* pierde por completo la actividad de glutamato deshidrogenasa.

S. cerevisiae es el primer microorganismo, hasta hoy reportado, que cuenta con tres enzimas, los productos de *GLT1*, *GDH1* y *GDH3*, que realizan la biosíntesis del mismo aminoácido, el glutamato.

Este parece ser un caso de redundancia génica tal y como Nowak y cols. (1997) la definen. La redundancia génica es un proceso en el que dos o más genes realizan la misma función, y donde la inactivación de uno de esos genes tiene un

efecto pequeño o nulo sobre el fenotipo biológico del organismo. Así, observamos que en *S. cerevisiae* la ausencia de *GLT1*, *GDH1* o *GDH3* por sí solos no causan la auxotrofia esperada para glutamato, si sólo hubiera un mecanismo dedicado a su biosíntesis. Cuando los productos de *GLT1* y *GDH3* no se encuentran, por la interrupción en cada gen, tampoco se observa un fenotipo diferente al silvestre, en los cultivos en presencia de amonio como única fuente de nitrógeno. Sin embargo, cuando falta *GDH1* el tiempo de duplicación de la cepa mutante en este gen aumenta, por lo que sugerimos que la enzima producto de este gen soporta la mayor parte de la síntesis glutamato y asimilación de amonio en cultivos de *S. cerevisiae* en MM, con amonio como única fuente de nitrógeno.

Mediante un análisis de la secuencia nucleotídica de *GLT1* no parece haber una relación con las secuencias de *GHD1* y *GDH3*. Cooke y cols. (1997) mencionan que éste es un tipo muy importante e interesante de redundancia, en el que se observa la aparente convergencia de secuencias no relacionadas, a nivel de estructura primaria, pero funcionalmente similares.

GDH1 y *GDH3* muy probablemente son producto de la duplicación del genoma completo que Wolfe y Shields (1997) postulan experimentó *S. cerevisiae* hace aproximadamente 10^8 años. Estos genes parecen ser funcionalmente redundantes con *GLT1*, por lo que la biosíntesis de glutamato en *S. cerevisiae* resulta especialmente interesante. ¿Para qué o en qué condiciones son necesarios tres genes cuyos productos realizan la misma función, esto es, la síntesis del mismo aminoácido?. Cooke (1997) menciona que no se debe caer en la tentación de decir que las funciones importantes deben ser respaldadas por más de un gen y que ésta es la única razón para que la redundancia se mantenga a lo largo de la evolución. Además del papel de respaldo que un gen podría asumir cuando el otro falla hay una ganancia en eficiencia, que puede ser en algunos casos sutil, pero aún así, conferir importantes ventajas evolutivas, en términos de adaptación. Thomas

(1993) menciona, que esta mayor eficiencia metabólica aumenta la fidelidad de un proceso cuando los genes trabajan juntos en alguna condición emergente, que se puede presentar sólo en determinados ambientes. Quizás la presencia de *GLT1*, *GDH1* y *GDH3* estén de alguna manera eficientizando el proceso de asimilación de amonio y síntesis de glutamato.

En el caso de los metazoarios se ha propuesto que el mecanismo principal para la retención de genes ancestralmente duplicados es, que las copias redundantes adquieran sitios de expresión diferentes (distintos tejidos) al de la copia ancestral (Cooke y cols., 1997). Aunque ahora sabemos que *GDH3* participa activamente en la síntesis de glutamato en *S. cerevisiae*, este gen podría tener alguna otra función.

Entre estos genes y *GLT1*, no puede haber una separación tejido específico, pero sería interesante saber si presenta una expresión diferencial dependiente de su localización dentro de la célula. En relación a lo anterior Hentze menciona (1994) que existen enzimas con funciones catalíticas y reguladoras y que incluso se conocen deshidrogenasas capaces de unir mRNA, este es un dato interesante dado que Camardella y cols. (1976) han encontrado actividad de GDH-NADP⁺ en fracciones nucleares de *S. cerevisiae*, lo que podría ser un indicio de que alguna de las GDH de *S. cerevisiae* actúa como un elemento regulatorio, además de sintetizar glutamato.

Anteriormente se ha sugerido que la falta de *GDH3* produce células incapaces de esporular normalmente, con colonias negras y arrugadas que contienen células pseudohifales (Wilkinson y cols., 1995), sin embargo, nosotros no tenemos hasta ahora ninguna evidencia de este fenotipo en la mutante en *GDH3*.

Wolfe y Shields (1995) proponen que después de la gran duplicación del genoma de la levadura, las copias de los genes redundantes, entre los cuales

podrían encontrarse *GDH1* y *GDH3*, deben su permanencia a lo largo del tiempo a la adaptación al metabolismo anaerobio que *S. cerevisiae* posee a diferencia de otras levaduras.

Existen entonces varias alternativas interesantes acerca de lo que el producto de *GDH3* podría estar haciendo en *S. cerevisiae* además de participar en la biosíntesis del glutamato, en amonio como fuente de nitrógeno. Quizás esta enzima intervenga en procesos de diferenciación celular, regulación de la expresión génica o en adaptación a cambios en el ambiente, como la anaerobiosis; junto o de manera independiente con el producto de su copia *GDH1*.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

PERSPECTIVAS

- 1) Clonación del gen *GDH3* y complementación de una mutante *gdh3* y de la triple mutante *gdh1 gdh3 glt1*.
- 2) Estudio de la regulación génica de *GDH3*:
 - a) delimitación de la región promotora del gen *GDH3*.
 - b) identificación de los elementos en *cis* y *trans* que participan.
 - c) expresión del promotor de *GDH3* (en fusiones con el gen reportero B-galactosidasa) en diferentes condiciones fisiológicas de cultivo.

LITERATURA CONSULTADA

1. **Bastarrachea, F., S. Brom, A. A. Covarrubias, A. V. Osorio y F. Bolivar.** 1980. Genetic characterization of mutations affecting glutamine biosynthesis and its regulation in *Escherichia coli* K12. In Mora J. y R. Palacios. (eds.), *Glutamine Metabolism, Enzymology and Regulation*. Academic Press, New York, pp 213-234.
2. **Bussey, H., D. Kaback, W. Zhong, D. T. Vo, M. W. Clark, N. Fortin, J. Hall, B. F. F. Oullette, T. Keng, A. B. Barton, Y. Su, C. J. Davies, y R. K. Storms.** 1995. The nucleotide sequence of chromosome I from *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **92**: 3809-3813.
3. **Camardella, L., G. Di Prisco, F. Garofano y A.M. Guerrini.** 1976. Purification and properties of NADP-dependent glutamate dehydrogenase from yeast nuclear fractions. Biochem. Biophys. Acta. **429**: 324-330.
4. **Cogoni, C., L. Valenzuela, D. González-Halphen, H. Olivera, G. Macino, P. Ballario y A. González.** 1995. *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high-molecular-weight polypeptide. J. Bacteriol. **177**: 792-798.
5. **Cooke, J., M. A. Nowak, M. Boerlijst, J. Maynard-Smith.** 1997. Evolutionary origins and maintenance of redundant gene expression during metazoan development. TIG. **13** : 360-364.
6. **Crane, P. R., E. M. Friis y K. R. Pedersen.** 1995. The origin and early diversification of angiosperms. Nature. **374**: 27-33.
7. **Doherty, D.** 1970. L-Glutamate dehydrogenases (yeast). Methods Enzymol. **17**: 850- 856.
8. **Doolittle, R. F.** 1985. Proteins. Sci. Am. **253**: 74-83.
9. **Drillien, R., y F. Lacroute.** 1972. Ureidosuccinic acid uptake in yeast and

some aspects of its regulation. *J. Bacteriol.* **109**: 203-208.

10. **Dujon, B.** 1996. The yeast genome project: what did we learn?. *Trends Gen.* **12**: 263-270.
11. **Folch, J. L., A. Antaramián, L. Rodríguez, A. Bravo, A. Brunner y A. González.** 1989. Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with impaired glutamate synthase activity. *J. Bacteriol.* **171**: 6776-6781.
12. **Grenson, M., E. Dubois y 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.
13. **Goffeau, A., B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin y S. G. Oliver.** 1996. Life with 6000 genes. *Science.* **274**: 546-567.
14. **Goffeau, A. y cols.** 1997. The Yeast Genome Directory. *Nature. Supp.* **387**: 5-105.
15. **Hentze, M. W.** 1994. Enzymes as RNA-binding proteins: a role for (di)nucleotide-binding domains?. *TIBS.* **19**: 101-103.
16. **Hinnen, A., J. B. Hicks y G. R. Fink.** 1978. Transformation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**: 1929-1933.
17. **Holmes, A. R., A. Collings, K. J. F. Farnden y M. G. Sherperd.** 1989. Ammonium assimilation by *Candida albicans* and other yeast: evidence for activity of glutamate synthase. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 1423-1430.
18. **Holzer, H. y S. Schneider.** 1975. Anreicherung und Trennung einer DPN-spezifischen und einer TPN-spezifischen Glutaminsäure Dehydrogenase aus Hefe. *Bioche. Z.* **329**: 361-367.
19. **Hughes, A. L.** 1994. The evolution of functionally novel proteins after gene duplication. *Proc. R. Soc. B.* **256** : 119-124.
20. **Hummelt, G. y J. Mora.** 1980. Regulation and function of glutamate

synthase in *Neurospora crassa*. J. Gen. Microbiol. 133: 2333-2340.

21. **Kaback, D. B.** 1995. Yeast genome structure. *In the Yeast*. Vol. 6 (eds. Wheals, A. E., Rose, A. H. y Harrison, J. S.) 179-222 (Academic, London).
22. **Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**: 265-275.
23. **Markert, C. L., J. B. Shaklee, G. S. Whitt.** 1975. Evolution of a gene. Science. **189**: 102- 114.
24. **Marqués, S., F. J. Florencio, and P. Candau.** 1992. Purification and characterization of the ferredoxin-glutamate synthase from the unicellular cyanobacterium. *Synechococcus* sp. PCC 6301. Eur. J. Biochem. **206**: 69-77.
25. **Melnick, L. y F. Sherman.** 1993. The gene clusters ARC and COR on chromosomes 5 and 10, respectively, of *Saccharomyces cerevisiae* share a common ancestry. J. Mol. Biol. **3**: 372-388.
26. **Meers, J. L., D. W. Tempest, and C. M. Brown.** 1970. Glutamine (amide): 2-oxoglutarate aminotransferase oxidoreductase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. J. Gen. Microbiol. **64**: 187-194.
27. **Mewes, H. W., K. Albermann, M. Bähr, D. Frishman, A. Gleissner, J. Hani, K. Heumann, K. Kleine, A. Maierl, S. G. Oliver, F. Pfeiffer y A. Zollner.** 1997. Overview of the yeast genome. Nature. **387**: 7-8.
28. **Miller, S. M., and B. Magasanik.** 1990. Role of NAD-linked glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. **172**: 4927-4935.
29. **Mitchell, A. P. y B. Magasanik.** 1983. Purification and properties of glutamine synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **258**:119.
30. **Mitchell, A.P.** (1985). The *GLN1* locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes glutamine synthetase. Genetics. **111**: 243.

31. **Moye, W. S., N. Amuro, J. K. M. Rao y H. Zalkin.** 1985. Nucleotide sequence of yeast *GDH1* encoding nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **260**: 8502-8508.
32. **Nagasu, T., and B. D. Hall.** 1985. Nucleotide sequence of the *GDH1* gene coding for the NADP-specific glutamate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* **37**: 247-253.
33. **Nowak, M. A., M. C. Boerlijst, J. Cooke y J. M. Smith.** 1997. Evolution of genetic redundancy. *Nature.* **388**: 167-171.
34. **Ohno, S.** 1970. Evolution by gene duplication (George Allen and Unwin, London).
35. **Reirzer, L. J. y B. Magasanik.** 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 (F. C. Neidhart y cols.), p. 302. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
36. **Roon, R., H. L. Even y F. Larimore.** 1974. Glutamate synthase: properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **118**: 89-95.
37. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbord, N.Y.
38. **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.
39. **Struhl, K., D. T. Stinchomb, S. Scherer, and R. W. Davis.** 1979. High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 1035-1039.

40. **Tempest, D. W., J. L. Meers, and C. M. Brown.** 1970. Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. *Biochem. J.* **117**: 405-407.
41. **Thomas, J. H.** 1993. Thinking about genetic redundancy. *Trends. Genet.* **9**: 393-399.
42. **Wilkinson, B. M., C. M. James, and R. M. Walmsley.** 1996. Partial deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* *GDH3* gene results in novel starvation phenotypes. *Microbiology.* **142**: 1667-1673.
43. **Wolfe, K. H. y D. C. Shields.** 1997. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature.* **387**: 708-713.