

03062
14-A
2eje.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Unidad Académica de los Ciclos Profesional y Posgrado del CCH
Instituto de Fisiología Celular.

Caracterización de una mutante alterada en la regulación del
catabolismo de compuestos nitrogenados en *Saccharomyces*
cerevisiae.

Tesis que para obtener el grado de Maestra
en Investigación Biomédica Básica
PRESENTA

L en IBB Claudia A. Segal Kischinevzky

Bajo la asesoría de la
Dra. Alicia González Manjarrez

México, D.F., noviembre de 1994.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A la Doctora Blanca Jiménez
un verdadero ejemplo de humanidad
In memoriam

Parte de esta investigación fue financiada por la Dirección General de Asuntos
del Personal Académico, UNAM, Proyecto No. IN202293.
Este trabajo se realizó en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Mucha gente participó directa o indirectamente en la realización de esta Tesis.

En primerísimo lugar quiero agradecer a la Dra. Alicia González, por todos estos años de cientos de enseñanzas, a veces muy duras, generalmente muy gratas. Por permitirme aprender de ella tantas y tantas cosas académicas y de la vida cotidiana.

A la QFB Ma. Cristina Aranda por contar siempre con su gran apoyo técnico.

Al Dr. Terrance G. Cooper, por brindarme la posibilidad de pasar 4 meses en su laboratorio, aprendiendo todo lo que en él se hace, siendo una estudiante más, lo que me permitió estar presente en sus seminarios de grupo, discusiones de pasillo y clases académicas.

Agradezco a la Dra. Aurorita Brunner L. su ayuda alegre y entusiasta en la disección de tétradas.

A la M en C Giselle Rosas por el diseño y auxilio en la determinación de la actividad de la GAP, así como al Dr. Peña por el préstamo de laboratorio, equipo, reactivos y alumna.

A la Biol. Rosalinda Tapia, por su ayuda en la elaboración del banco genómico.

Al Dr. Rajendra Rai, de la UT-Memphis, por todo su apoyo, enseñanza y solidaridad durante mi estancia en el Laboratorio del Dr. Cooper.

A los Dres. He-Dong Park y Hassan El-Barry por lo mismo y más.

A mi Comité Tutorial: Dra. Alicia González, Dr. Antonio Peña y Dr. David Romero, por las muy enriquecedoras discusiones que siempre tuvimos en los tutoriales.

A los revisores de esta Tesis: Dra. González, Dr. Peña, Dra. Hernández, Dr. Coria y Dr. Zentella, por sus atinadas sugerencias.

A mis compañeros, pasados y presentes, del laboratorio González: Hiram, Cris, Lichi, Sandra, Lina, Lucía, Beti, Felipe y Simón y de todos los demás laboratorios (Miss-CIFN, Carmen Gómez-IIB y Roberto Hernández-IIB, Jorge Nieto y Alejandra Covarrubias-IBT).

Al Dr. Jorge Nieto, por su apoyo actual y futuro (espero).

A la DGAPA-UNAM, por la beca, y al CONACyT por el complemento.

A mis papás, a la Paula, a Elena, Humberto, Jaime y a los Rubengues, y a Esperanza y Ernesto, porque cómo ayudaron a que yo superara ciertas cosas y que esta Tesis y mi doctorado volvieran a ser parte de mis emociones.

A todos mis amigos, históricos y recientes con los que transito por la vida. Ah! y de todas maneras, a Emiliano y María.

Muy especialmente, a la familia Sánchez-Jiménez por todo su apoyo.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

Claudia

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
Importancia de la asimilación del nitrógeno	2
Reguladores generales del catabolismo de compuestos nitrogenados en <i>Neurospora crassa</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
Represión catabólica nitrogenada en <i>Neurospora crassa</i> y <i>Aspergillus nidulans</i>	4
El sistema <i>gln3-ure2</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
El regulador negativo DAL80 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
¿Es el producto de <i>gln3</i> el efector de la RCN en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ?	9
Control específico de la degradación de compuestos nitrogenados en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
Catabolismo de alantoína	11
Interconversión de amonio y glutamato	14
La permeasa general de aminoácidos	17
Otras vías catabólicas en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
ANTECEDENTES	19
OBJETIVO	21
MATERIAL Y METODOS	22
Cepas y plásmidos	22
Medios de crecimiento y condiciones de cultivo	23
Levaduras	23
Medio rico (YPD)	23
Medio mínimo (MM)	24
Medio sin nitrógeno (SN)	24
Condiciones de crecimiento	24
Medio de pre-esporulación y medio de esporulación	24
Cruza, esporulación y disección de tétradas	24
Bacterias	24
Medio rico Luria-Bertani (LB)	24
Medio mínimo (M9)	25
Condiciones de crecimiento	25
Transformación	25
Transformación de levaduras (protoplastos)	25
Transformación de levaduras (cloruro de litio)	25
Transformación de bacterias	26
Determinación de actividades enzimáticas	26

Preparación de extractos crudos	26
Determinación de proteína	26
Actividad específica de alantoinasa	26
Actividad específica de glutamato deshidrogenasa catabólica (GDH-NAD)	27
Actividad específica de glutamino sintetasa (GS)	27
Transporte de citrulina ¹⁴ C a través de la permeasa general de aminoácidos (GAP)	27
<i>Northern Blot</i>	27
Minipreparación de RNA total	27
Gel de RNA	28
Transferencia a filtro de <i>nylon</i>	28
Obtención de plásmidos y sondas	28
Maxipreparación de plásmidos	28
Digestiones con enzimas de restricción	28
Purificación de sondas	28
Marcaje de sondas por "marcaje al azar"	29
Cuantificación de la radiactividad incorporada	29
Columna de exclusión molecular	29
Hibridización	29
Exposición autorradiográfica	30
Reutilización de los filtros de <i>nylon</i>	30
Preparación de banco de DNA genómico	30
Extracción de DNA genómico por gradiente de CsCl	30
Digestión parcial	31
Electroelución	31
Defosfatación del vehículo	31
Ligación	31
Amplificación y obtención de plásmido a gran escala	31
RESULTADOS	33
La mutante AL50 presenta actividades enzimáticas que no disminuyen por la presencia de glutamina	33
1. Actividad específica de alantoinasa	33
2. Actividad específica de glutamino sintetasa	34
3. Actividad específica de glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD	35
4. Transporte de citrulina por la permeasa general de aminoácidos	35
La cepa AL50 tiene fenotipo dominante	36
Transformación con el DNA de la cepa AL50	38
Análisis de la expresión de <i>dal1</i> , <i>dal5</i> y <i>gap1</i> en las cepas S288C y AL50	42
DISCUSION Y PERSPECTIVAS	47
CONCLUSION	56
REFERENCIAS	57

RESUMEN

Saccharomyces cerevisiae es capaz de discriminar entre diversas fuentes de nitrógeno y utilizar selectivamente aquellas que puede asimilar con mayor eficiencia. A través de un mecanismo que aún no ha sido entendido, la capacidad de asimilar fuentes primarias de nitrógeno, como glutamina y asparagina, previene la expresión, a nivel de la transcripción, de las enzimas necesarias para el transporte y la asimilación de fuentes de nitrógeno secundarias, fenómeno denominado represión catabólica nitrogenada (RCN). En *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa*, los productos de los genes *areA* y *nit2*, respectivamente, modulan de manera positiva la RCN; mutantes en estos hongos alterados en esos genes son incapaces de utilizar una variedad de fuentes secundarias de nitrógeno.

En *S. cerevisiae*, se ha logrado obtener algunas mutantes regulatorias del circuito catabólico nitrogenado (*gln3, ure2, dal80 [uga43]*). Sin embargo, estas no parecen estar alteradas en RCN; de hecho, en levadura no se han podido aislar mutantes que afecten el catabolismo de una variedad de compuestos nitrogenados como los mencionados para *A. nidulans* y *N. crassa*. En nuestro laboratorio, hemos obtenido una mutante de *S. cerevisiae* cuyas actividades enzimáticas para catabolizar compuestos nitrogenados secundarios no son afectadas por la presencia de glutamina. El estudio fisiológico de esta mutante ha mostrado que la mutación afecta el catabolismo de, al menos, 15 diferentes compuestos nitrogenados. Hemos probado que en esta mutante, la glutamina y la asparagina no reprimen, a nivel de la transcripción, la expresión de algunos de los genes requeridos. A diferencia de lo que se ha encontrado para *areA, nit2, gln3, ure2* y *dal80(uga43)* el fenotipo de esta mutante es dominante sobre el de la cepa silvestre. ❁

INTRODUCCION

Todos los organismos, desde las bacterias hasta los humanos, deben de regular muy finamente los diferentes procesos celulares que ocurren a lo largo de su ciclo de vida. Gran parte de esta regulación ocurre a nivel de la transcripción; por ello, es de fundamental importancia entender cómo se transmite la señal de que un cierto gen debe ser transcrito en cierto momento del ciclo celular y cómo ocurre este proceso.

Los organismos procariotes y los microorganismos eucariotes constituyen modelos ideales para estudiar la regulación de la expresión genética: como todas las células al crecer y dividirse, incorporan las moléculas alimenticias del medio externo, transformándolas en los constituyentes celulares; en contraposición a los organismos multicelulares, los microorganismos tienen la ventaja de ser unicelulares y de crecer en un corto tiempo de duplicación en medios de cultivo sintéticos, en donde todas las variables pueden ser controladas; además, algunos microorganismos son susceptibles a la manipulación génica, que permite la selección de mutantes cuyo estudio ha permitido identificar circuitos regulatorios.

Importancia de la asimilación del nitrógeno.

Los microorganismos pueden utilizar una gran variedad de compuestos nitrogenados como únicas fuentes de nitrógeno celular. El catabolismo de este tipo de compuestos implica la síntesis y la activación de las enzimas necesarias para degradarlos hasta ácido glutámico y glutamina, que son los intermediarios metabólicos que distribuyen el nitrógeno para la síntesis de aminoácidos, aminoazúcares, vitaminas, purinas y pirimidinas, compuestos que a su vez participan en la síntesis de macromoléculas.

Así, la célula adquiere el nitrógeno de los compuestos orgánicos del medio externo y los puede utilizar en una de tres formas alternativas (Large, 1986):

i) Transportarlos al medio intracelular e incorporarlos sin ninguna modificación en componentes celulares, por ejemplo, incorporando aminoácidos en una proteína;

ii) Transportarlos al medio intracelular y catabolizarlos para utilizar el nitrógeno para sintetizar otros compuestos nitrogenados;

iii) Transportarlos al medio intracelular y utilizarlos como fuentes de carbono.

Cuando son proporcionados como única fuente de nitrógeno, la degradación de los compuestos nitrogenados conduce a la formación de dos compuestos claves para la célula: amonio y glutamato (Figura 1). Estos dos compuestos están interrelacionados por medio de tres sistemas enzimáticos: el de la glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP (GDH biosintética) que cataliza la síntesis de glutamato a partir de amonio, el de la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD (GDH catabólica) que cataliza la producción de amonio a partir de glutamato y el sistema de la glutamino sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT) que cataliza la obtención de 2 moléculas de glutamato a partir de α -cetoglutarato y glutamina.

La utilización de los compuestos nitrogenados implica un circuito regulatorio muy complejo, que comprende la existencia de vías catabólicas con reguladores generales y específicos, además de metabolitos mediadores inductores y represores. El estudio de diferentes mutantes en los genes que codifican para las enzimas que participan en la degradación de compuestos nitrogenados en los microorganismos, ha dado como resultado, por un lado, la identificación de varios de los genes cuyos productos actúan dentro de vías metabólicas particulares, y por el otro, la de los genes cuyos productos regulan sistemas generales del catabolismo.

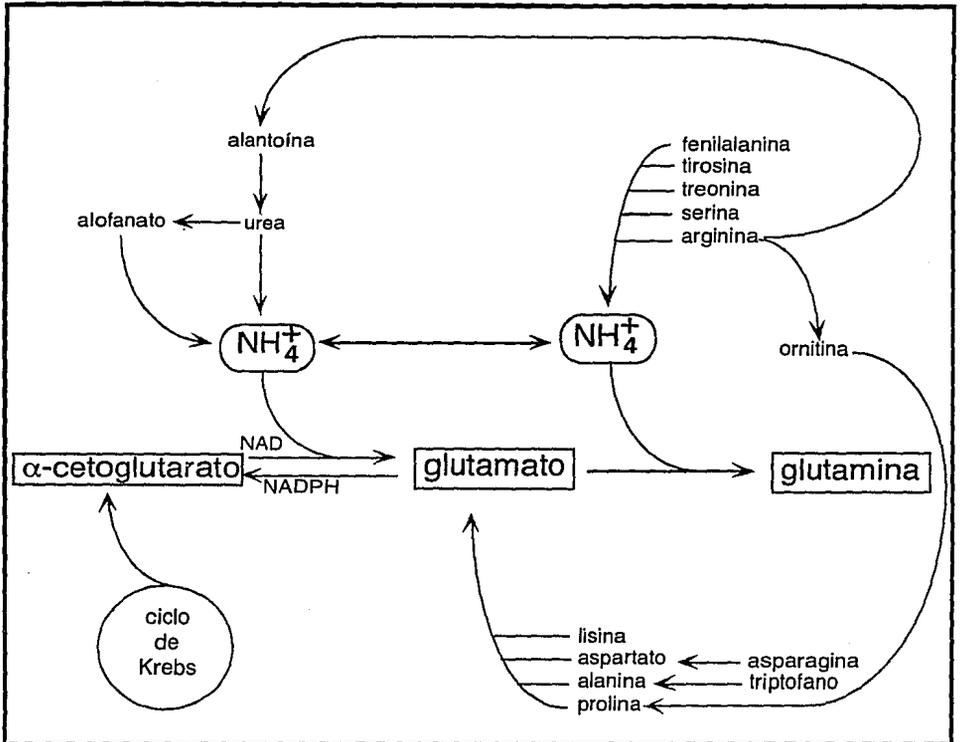


Figura 1. Productos catabólicos de los compuestos nitrogenados orgánicos.

REGULADORES GENERALES DEL CATABOLISMO DE COMPUESTOS NITROGENADOS EN *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Represión catabólica nitrogenada en *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans*:

La represión catabólica nitrogenada (RCN) se define como la capacidad que tiene la presencia de una fuente primaria de nitrógeno (amonio, glutamina, asparagina), de regular de manera negativa la síntesis de las enzimas

necesarias para la degradación de compuestos nitrogenados secundarios. Al ser reprimida la síntesis de estas enzimas, las ya existentes se diluyen conforme las células se duplican (se ha reportado que las unidades enzimáticas por célula permanecen constantes), por lo que se ha propuesto que la RCN es un mecanismo de adaptación que tienen estos organismos para responder, a nivel de la transcripción, a cambios estables en su medio ambiente. Se ha demostrado que la adición de una fuente primaria de nitrógeno a células creciendo en una fuente secundaria provoca cambios metabólicos inmediatos, como la exclusión del inductor, debida a que las permeasas son reprimidas por la presencia de la buena fuente, con lo que el metabolito inductor queda fuera de la célula, y la transinhibición, que implica que la presencia de un metabolito en el interior de la célula impide que éste se siga transportando desde el exterior (Cooper y Sumrada, 1983). En *Neurospora crassa* y en *Aspergillus nidulans*, se ha encontrado que el producto de un sólo gen, *nit-2* y *areA* respectivamente, regula la RCN. El fenotipo de mutantes en estos genes es muy variado. En *Aspergillus* se han identificado más de 100 mutantes alélicas diferentes (Stankovich, et al, 1993); para citar algunas clases de mutantes: *areA^r* resultan en la incapacidad de utilizar una o más fuentes de nitrógeno secundarias, pero pueden crecer en amonio o glutamina; se ha demostrado que el fenotipo de estas mutantes es debido a mutaciones sin sentido y translocaciones dentro del gen *areA*. Otras, *areA^d*, presentan derepresión de algunas actividades enzimáticas en condiciones de RCN, pero otras actividades continúan reprimidas e incluso algunas tienen actividades más bajas que la basal de una cepa silvestre. En *Neurospora* sólo se ha podido obtener mutantes *null*, que resultan en la completa pérdida de la capacidad de crecer en fuentes de nitrógeno diferentes a amonio o glutamina (Marzluf, et al, 1985).

La secuencia de aminoácidos de las proteínas NIT-2 y AREA de ambos microorganismos tiene una identidad del 98% en una región que contiene un dominio de "dedos de zinc" Cis2-Cis2 formando una horquilla de 17 aminoácidos inmediatamente adyacente a un dominio básico de unión al DNA, aunque la identidad total en la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas es sólo de un 22% (Marzluf, 1993). Se han complementado mutantes *areA^r* de *Aspergillus nidulans* con el gen *nit-2* de *Neurospora crassa*; el fenotipo de algunas de las mutantes transformadas es menos sensible a RCN que el de una

cepa silvestre de *Aspergillus nidulans* (Davis y Hynes, 1987), lo que condujo a analizar las diferencias estructurales entre ambas proteínas.

AREAp y NIT2p, como proteínas de regulación global, son responsables de la expresión de varios genes co-regulados dentro del circuito nitrogenado, donde cada gen individual debe ser expresado en diferentes niveles y con una cinética de activación propia. Las regiones promotoras de los genes regulados por estos activadores tienen secuencias nucleotídicas muy diferentes, pero todos ellos presentan secuencias AGATA, similares a las secuencias GATA de aves y mamíferos donde se unen los factores de transcripción GATA-1 (Fu y Marzluf, 1990, Stankovich, et al, 1993). Entre los genes co-regulados por NIT2p se encuentran nit3 (nitrato reductasa), alc (alantoicasa) y lao (oxidasa de L-aminoácidos) cuyas regiones promotoras sólo tienen en común la presencia de dos o más secuencias GATA; recientemente se demostró que NIT2p (Chiang y Marzluf, 1994) se une a estas regiones promotoras siempre que esté presente más de una caja GATA, separadas entre sí por al menos 3 y máximo 30pb, sin importar su orientación ni las secuencias que las flanquean. Por otro lado, se ha reportado que la delección del extremo C-terminal de AREAp, conservando el dominio central de dedos de zinc, resulta en la reducción de la represión de la expresión de algunos genes, mientras que otros continúan siendo reprimidos (Stankovich, et al, 1993). Esto sugiere que la región C-terminal de la proteína sería necesaria para la regulación de algunos de los genes coregulados por ella, y explicaría porqué varios de los genes regulados por RCN fueron expresados en las mutantes *areA*⁻ complementadas con el gen nit-2.

Aparentemente, la expresión de *areA* y *nit-2* también está regulada (Marzluf, 1993). Se han encontrado transcritos diferentes de ambos genes dependiendo del medio de cultivo: en condiciones en las que no hay represión se encuentra un transcrito, y en condiciones de RCN se observan dos transcritos diferentes. Además, hay dos sitios a los que se puede unir NIT2p, uno en un intrón y el otro en un exón del gen *nit-2*, lo que sugiere que podrían existir sitios de iniciación alternativos que podrían ser regulados de manera autógena. Hasta hace poco, se pensaba que la expresión de *nit-2* era regulada por el producto del gen *nmr1* (Tomsett, et al, 1981); sin embargo, la mutación *nmr*⁻ parece afectar el transporte de compuestos nitrogenados en *Neurospora* (Young, et al, 1990),

que sería el mismo efecto que tiene la mutación en el gen *meaB* de *Aspergillus* (Marzluf, 1993).

El modelo de acción propuesto para el producto de estos dos genes, implica que la glutamina podría actuar como un co-represor, inactivando a los productos de *areA* y *nit-2*. Al disminuir la concentración intracelular de glutamina, el producto de los genes activadores recupera su conformación activa, con lo que puede unirse a los sitios de reconocimiento en el DNA adyacentes a los genes estructurales que codifican para las enzimas bajo su control (Marzluf y Fu, 1988).

El sistema *gln3-ure2* en *Saccharomyces cerevisiae*:

En *Saccharomyces cerevisiae* parece existir un circuito regulatorio similar a los propuestos para *A. nidulans* y *N. crassa*, pero no se han descrito mutantes que tengan fenotipos como los de las mutantes de estos dos hongos filamentosos. Se han caracterizado algunos productos génicos activadores y represores que regulan al metabolismo nitrogenado; sin embargo, dentro del modelo propuesto que integra la regulación nitrogenada de la levadura, las evidencias indican que falta identificar al efector o efectores de la RCN (Daugherty, et al, 1993). A continuación se discutirá lo que se conoce sobre algunos genes regulatorios en *S. cerevisiae*:

El producto del gen *gln3*, GLN3p es un activador de la transcripción de los genes regulados por nitrógeno en *S. cerevisiae*. El gen *gln3* fue clonado y secuenciado (Minehart y Magasanik, 1991), y la secuencia de aminoácidos deducida contiene, en su zona central, un dominio de dedos de zinc similar a las zonas de unión a DNA de los activadores de la transcripción de los genes regulados por nitrógeno *nit-2* y *areA*. La activación dependiente de GLN3p de los genes regulados por nitrógeno se previene por la presencia de una concentración intracelular de glutamina alta, a menos que otro gen, *ure2* esté mutado o deletado: la actividad de la glutamino sintetasa (GS) es alta en una cepa silvestre crecida en glutamato como única fuente de nitrógeno y es igualmente alta en una mutante *ure2 null* crecida en glutamina. Sin embargo, la actividad de la deshidrogenasa de glutamato dependiente de NAD (GDH-

catabólica), que es alta en una cepa silvestre crecida en glutamato como única fuente de nitrógeno, es más de 3000 veces mayor en la mutante *ure2 null* crecida en glutamato o en glutamina. Esto indica que el producto de *gln3* es suficiente para la total activación de la GS, pero no para la de la GDH catabólica, ya que para obtener la mayor actividad es necesario interrumpir ("gene disruption") el gen *ure2* (Coshigano y Magasanik, 1991). URE2p no parece afectar directamente la expresión de *gln3*, sino que inactiva a GLN3p y a la GS en respuesta a un incremento en la concentración intracelular de glutamina. El gen *ure2* fue clonado y secuenciado y no presenta ningún dominio conocido de unión a DNA (Coshigano y Magasanik, 1991). Las mutantes *gln3⁻* presentan un fenotipo no inducible de la expresión de los genes que son corregulados, mientras que las mutantes *ure2⁻(gdhCR)* tienen fenotipo constitutivo; ambas mutaciones son recesivas. La doble mutante *ure2-gln3* presenta el fenotipo *gln3*.

El regulador negativo DAL80 de *Saccharomyces cerevisiae*:

El producto del gen *dal80* (*uga43*) es un regulador negativo de varios genes del metabolismo nitrogenado y responde a regulación por RCN (Cunningham y Cooper, 1991); el gen ha sido clonado y secuenciado (Coornaert, et al, 1992) y su producto presenta en la región central un dominio de unión a DNA de dedos de zinc tipo GATA-1 similar al de GLN3p y en la región C-terminal, un dominio tipo "zipper de leucina" (ZIP), que provoca dimerización. Si la región ZIP es eliminada, el represor pierde completamente su actividad; esto sugiere que la capacidad de dimerización de esta proteína podría tener un papel en el reconocimiento del sitio de unión a DNA, como se ha reportado para otras proteínas que presentan este tipo de regiones. Las mutantes en este locus son recesivas, sensibles a RCN y presentan actividades constitutivas de los genes inducibles del sistema *DAL* (degradación de alantoína), del sistema *DUR* (degradación de urea), del sistema *UGA* (degradación de ácido γ -aminobutírico, GABA) y del sistema *PUT* (degradación de prolina). Esto indica que el papel del producto del gen *dal80* es mantener apagada la expresión de estos genes en ausencia del inductor respectivo.

¿Es el producto de *gln3* el efector de la RCN en *Saccharomyces cerevisiae*?

Ahora bien, GLN3p presenta un dominio de unión a DNA del tipo GATA. Muchos de los genes regulados por nitrógeno tienen secuencias UAS_{NTR} (por las siglas en inglés *Upstream Activator Sequence*) en sus regiones promotoras que son secuencias GATAA. Por analogía, se pensaba que GLN3p se unía a las secuencias UAS del promotor de, por ejemplo, *gln1*. De hecho, anticuerpos contra GLN3p son capaces de precipitar fragmentos de DNA que resultaron ser fragmentos del gen *gln1* (Minehart y Magasanik, 1992). De esta manera, se pensaba que la RCN era ejercida por la acción de GLN3p.

Sin embargo, hay algunas observaciones que indican que la RCN y GLN3, URE2 son sistemas regulatorios diferentes: El promotor del gen *dal5* (permeasa de ácido alantoico) tiene en su región promotora varias secuencias UAS ; la expresión de este gen es altamente sensible a la RCN, a la vez que depende del producto funcional GLN3p, y no responde a la regulación por DAL80, ya que su expresión es independiente de inductor. El producto del gen *dal80* no tiene influencia sobre la RCN. El producto de *dal80* presenta un dominio tipo GATA prácticamente idéntico al de GLN3p. Si los productos de *dal80* y *gln3* se unen al mismo sitio en el DNA, ¿cómo explicar que la expresión de *dal5* no responde a DAL80?. Cooper y cols., tras buscar en bancos de datos los genes reportados cuyos promotores contenían secuencias del tipo UAS_{NTR} de *S. cerevisiae*, analizaron la sensibilidad a la RCN, el requerimiento del producto de *gln3* para su expresión y si se sobreexpresaban como respuesta a la disrupción de *dal80* (Daugherty, et al, 1993). En la figura 2, se muestra el modelo propuesto por Cooper y cols., en el que distinguen tres circuitos generales de regulación: GLN3, DAL80 y RCN.

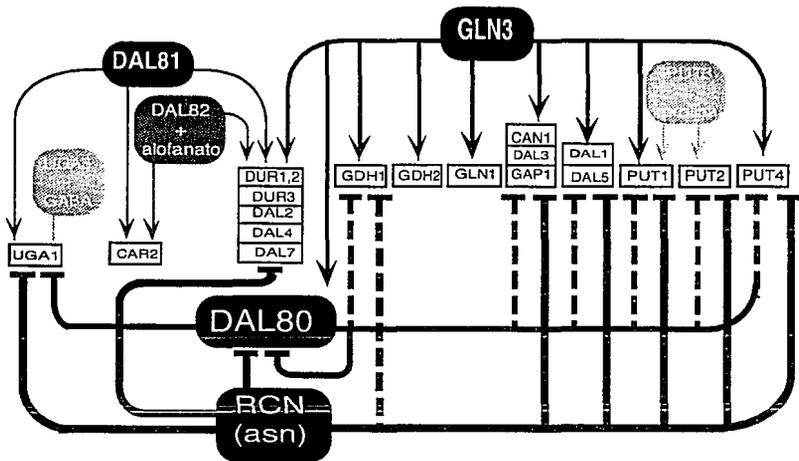


Figura 2. Circuitos regulatorios que involucran RCN y varios de los genes que participan en el metabolismo nitrogenado de *S. cerevisiae* (Tomado de la figura 12 de Daugherty, et al, 1993).

De este modo, la presencia de copias múltiples de secuencias homólogas a UAS_{NTR} en el promotor de un gen, correlaciona con su sensibilidad a RCN y su dependencia del producto del gen *gln3*, tal es el caso de *can1* (permeasa de arginina), *gap1* (permeasa general de aminoácidos), *put1* (prolina oxidasa), *put4* (permeasa de prolina), *dal4* (permeasa de alantoína), *dur3* (permeasa de urea, El Barry, et al, 1993), *dur1,2* (alofanato hidrolasa/urea carboxilasa), *dal2* (alantoicasa), *dal7*, *dal3* (hidrolasa de ureidoglicolato, Yoo y Cooper, 1991), *dal5* (permeasa de alantoato, Rai et al, 1987) y *dal1* (alantoinasa, Bucholz y Cooper, 1991). La expresión de *uga1* (transaminasa de GABA) y *put2* (deshidrogenasa de la Δ^1 -pirrolina-5-carboxilasa) son excepciones, ya que sus promotores contienen múltiples copias de las secuencias UAS y son sensibles a RCN, pero no dependen del producto de *gln3*. En cambio, la expresión de *gdh2* (GDH catabólica) y *gln1* (GS), presenta un requerimiento absoluto de $GLN3p$ y sin embargo no responden a RCN, mientras que la de *gdh1* (GDH biosintética) requiere $GLN3p$ pero es sólo parcialmente sensible a $DAL80$ y a RCN. Finalmente, la regulación negativa mediada por $DAL80$, cuya expresión en sí misma depende de $GLN3p$ y responde a RCN, correlaciona, en casi todos los casos, aunque en menor grado, con el requerimiento de $GLN3p$ y la sensibilidad a la RCN.

Todo esto sugiere que la represión catabólica nitrogenada es, al menos parcialmente, independiente de la función mediada por los productos de *GLN3* y *DAL80*, y que a su vez, los sitios de regulación sobre los que actúan estos dos mediadores, que se sabe tienen secuencias de unión a DNA muy semejantes, no son significativamente diferentes.

CONTROL ESPECIFICO DE LA DEGRADACION DE COMPUESTOS NITROGENADOS EN *Saccharomyces cerevisiae*.

Hemos discutido la regulación mediada por los productos de *areA*, *nit-2*, *gln3*, *ure2* y *dal80* en *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa* respectivamente, para los dos primeros genes y *Saccharomyces cerevisiae* para los últimos tres, que controlan la expresión de genes cuyos productos actúan dentro de vías catabólicas particulares. En general, la expresión de los genes que codifican para las enzimas de una vía catabólica nitrogenada en particular, requiere de la presencia de un metabolito inductor, que a su vez, en algunos casos, es mediado por reguladores generales de la vía específica, como *nit-4* para la inducción de la vía de degradación de nitrato en *Neurospora* y *ua-Y* para la inducción de la vía de degradación de purinas en *Aspergillus* (Marzluf, 1993). La regulación del metabolismo de los compuestos nitrogenados es muy semejante en los tres hongos, aunque también presenta importantes diferencias; por ejemplo, *N. crassa* y *A. nidulans* pueden utilizar nitratos y nitritos como fuentes de nitrógeno, en cambio la levadura no. A continuación revisaremos algunas vías específicas para la degradación de los compuestos nitrogenados en *S. cerevisiae*, de importancia en este trabajo.

Catabolismo de alantoína:

La alantoína es un producto de la degradación de las purinas que *Saccharomyces cerevisiae* puede utilizar como única fuente de nitrógeno (Cooper, 1982). El catabolismo de la alantoína se lleva a cabo a través de una compleja vía que incluye cinco enzimas y cuatro sistemas de transporte, siendo degradada hasta amonio y CO_2 (Figura 3). El mayor nivel de expresión de algunos de los genes *DAL* y *DUR* depende de la presencia del inductor nativo

de la vía, el alofanato, o bien de la presencia de un inductor gratuito, el oxalurato (Sumrada y Cooper, 1974). Estos genes cuya expresión depende de la inducción incluyen los que codifican para la alantoinasa (dal1) (Bucholz y Cooper, 1991), la alantoicasa (dal2), la permeasa de alantoína (dal4), el producto de dal7(Yoo, et al, 1985), la urea amidoliasa (dur1,2) (Genbauffe y Cooper, 1986), y la permeasa de urea (dur3,4) (El-Berry, et al, 1993). La expresión de otros genes, como el que codifica para la ureidoglicolato hidrolasa (dal3) y la permeasa de ácido alantoico (dal5), son independientes de inducción. El último intermediario de la vía, que es el inductor nativo, también se produce a partir de la urea generada en la vía de degradación de la arginina.

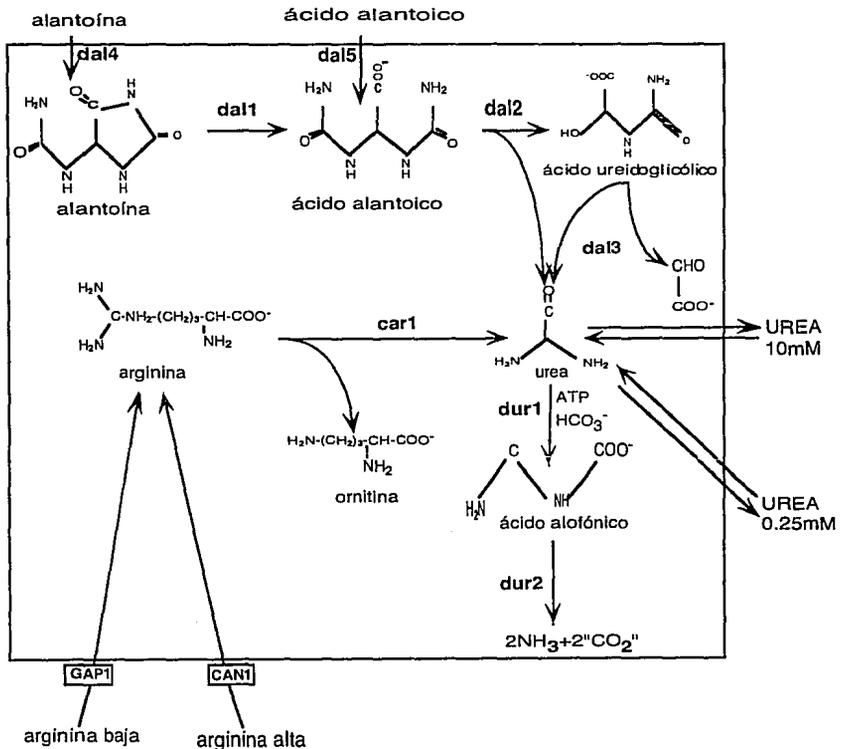


Figura 3. Sistemas de degradación de alantoína y arginina (Tomado de la figura 1 de Sumrada y Cooper, 1974).

La inducción de todos los genes inducibles ocurre a nivel de la transcripción. El hecho de que haya dos clases de genes, es decir, unos que responden a inducción y otros que no, condujo al grupo de Cooper a analizar la existencia de arreglos diferentes en las regiones promotoras de los dos tipos de expresión. De esta manera, realizando un análisis de delección en la región promotora del gen *dal5* (independiente de inducción), identificaron dos elementos iguales, que llamaron UAS_{NTR} , cuya ausencia impide la expresión de un gen reportero (Rai, et. al., 1989). Estos dos elementos contienen la secuencia 5'-GATAA-3'. Al realizar el mismo tipo de análisis con la región promotora del gen *dal7* (dependiente de inducción) encontraron varias secuencias homólogas a UAS_{NTR} pero también tres regiones, que denominaron *URS* (*Upstream Repression Sequence*), cuya ausencia produce la activación transcripcional independiente de inducción. Asimismo, se identificó un tercer elemento en el promotor de *dal7*, denominado *UIS* (*Upstream Induction Sequence*), que en presencia de los dos elementos anteriores, media la activación transcripcional dependiente de inducción (Yoo y Cooper, 1989).

La vía de degradación de la alantoína, comprende también la regulación mediada por factores que actúan en *trans*. Así, se han identificado productos de genes que regulan la inducción de manera positiva: además de *GLN3*, activador que ya discutimos, se han descrito los genes *dal81* y *dal82* cuyos productos se unen a las secuencias *UIS*, siendo su función incrementar la expresión mediada por *UAS* (Dorrington y Cooper, 1993), y *dal80*, cuyo producto como ya discutimos se une a las secuencias *URS*, provocando que la expresión de los genes *DAL* permanezca baja (nivel basal) cuando no hay inductor presente (Cunningham y Cooper, 1993).

El modelo propuesto para explicar la expresión genética del sistema *DAL* se resume en la Figura 4. Los genes cuya expresión es independiente de inducción, como *dal5*, tienen un tipo de elemento de control en *cis*, UAS_{NTR} , que media la sensibilidad a la represión catabólica nitrogenada y depende también del producto del gen *gln3*. Los genes cuya expresión depende del inductor, como *dal7*, tienen en su región promotora, además de secuencias UAS_{NTR} , otros dos elementos que actúan en *cis*: *UIS* y *URS*. El represor *URS*, requiere del producto del gen *dal80* para reprimir la operación de UAS_{NTR} en ausencia del

inductor. El elemento UIS parece mediar el incremento de la expresión genética, en presencia del producto regulador positivo DAL82 y del inductor (Daugherty, Tesis de PhD, 1992).

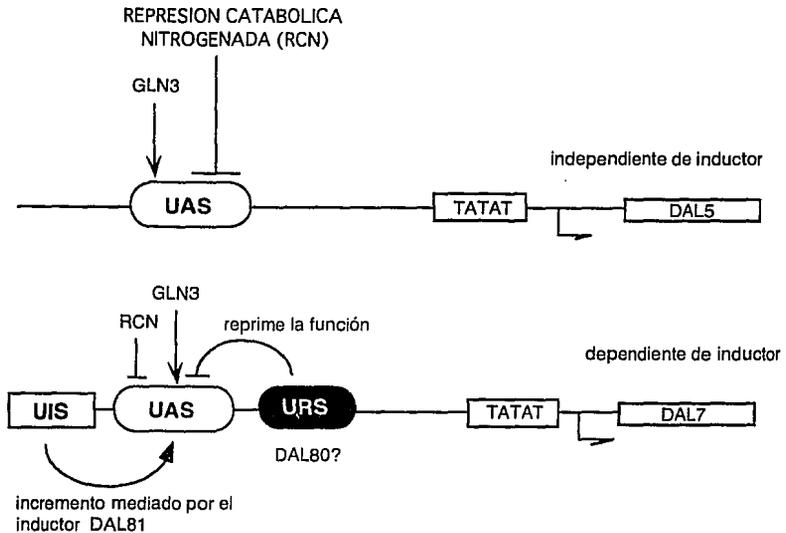


Figura 4. Modelo propuesto para el control de la expresión genética del sistema DAL (Tomado de la figura 9 de Yoo y Cooper, 1989).

Interconversión de amonio y glutamato.

La interconversión de amonio y glutamato constituye la interfase de la biosíntesis y la degradación de los compuestos nitrogenados. Ambos metabolitos funcionan como únicas fuentes de nitrógeno y participan, junto con la glutamina, como los principales donadores de nitrógeno en las reacciones biosintéticas. La interconversión de amonio y glutamato es catalizada por dos enzimas, una dependiente de NADP, la glutamato deshidrogenasa biosintética (GDH-NADP, codificada por *gdh1*) y una dependiente de NAD, la glutamato deshidrogenasa catabólica (GDH-NAD, codificada por *gdh2*). La GDH-NAD, que cataliza la reacción $\text{glutamato} + \text{NAD} \rightarrow \alpha\text{-cetoglutarato} + \text{NH}_4^+ + \text{NADH}$, es la única

forma que tiene la célula de obtener amonio a partir del glutamato. Cuando se cultiva a la levadura en glutamato, alanina o asparagina como únicas fuentes de nitrógeno, la GDH-NAD se encuentra altamente activa, cuando se cultiva en amonio o glutamina o glutamato + alguno de estos dos compuestos, los niveles de GDH-NAD son muy bajos. El grupo de Magasanik clonó *gdh2* utilizando anticuerpos policlonales contra la GDH-NAD purificada, en una biblioteca genómica de levadura en λ gt11 (Miller y Magasanik, 1990). Asimismo, obtuvieron una cepa por disrupción génica que carece completamente de la expresión de *gdh2*; esta mutante no es capaz de crecer en glutamato como única fuente de nitrógeno, pero crece bien en glutamina o amonio. Sin embargo, si agregan adenina o hipoxantina al medio de cultivo, la mutante *null* es capaz de crecer en glutamato. Aparentemente, el único papel fisiológico de la GDH-NAD es proporcionar amonio para la síntesis de glutamina, ya que el requerimiento de adenina es debido a la necesidad de suplir la carencia de un producto de la transamidación de la glutamina para la biosíntesis de nucleótidos. Sin embargo, el grupo de Magasanik (Coshigano, et.al., 1991) reporta que células crecidas en glutamina con carbono al 2% (mismas condiciones que utilizamos nosotros y el grupo de Cooper), tiene una baja actividad específica de GDH-NAD y no presenta transcrito de *gdh2*. Al utilizar glucosa a una menor concentración (0.1%) si lo encuentran, a la vez que se incrementa la actividad específica, por lo que proponen que la GDH-NAD responde incrementándose por limitación de carbono.

La expresión de *lacZ* fusionado al promotor de *gdh2* responde de la misma manera que la actividad enzimática de la GDH-NAD: alta en glutamato y baja en amonio y glutamina (Miller y Magasanik, 1991). En ambos casos la expresión es regulada positivamente por el producto del gen *gln3* y negativamente por el producto de *ure2* (Courchesne y Magasanik, 1988). De hecho, en la región promotora de *gdh2* se han encontrado seis elementos regulatorios en *cis*: UAS_G , que responde a glutamato, UAS_N que se reprime en presencia de glutamina y que requiere de los productos funcionales de *GLN3* y *URE2*, y cuatro elementos *URS*.

Por otro lado, la glutamino sintetasa (GS), codificada por el gen *gln1*, cataliza la reacción de síntesis de glutamina a partir de amonio y glutamato

(Mitchell, 1985). Su transcripción es regulada por tres sistemas independientes de control que responden a señales metabólicas diferentes, a nivel de la transcripción. (Benjamin et al, 1989). El primero de ellos es regulado por la concentración intracelular de glutamina y glutamato, con la acción de los productos de los reguladores GLN3 y URE2. La actividad de sintetasa es inactivada de manera reversible y rápida por la adición de glutamina al medio de cultivo (Mitchell y Magasanik, 1984). Asimismo se reprime la síntesis de la GS en cultivos creciendo en amonio o glutamina como única fuente de nitrógeno. Se requiere del producto funcional de GLN3 para la expresión de *gln1*, aunque no depende de su dosis génica, pero no se requiere para la inactivación. En mutantes *ure2*, se elimina la inactivación por glutamina, así como no se reprime la síntesis de la GS en cultivos crecidos en amonio o glutamina (Coshigano y Magasanik, 1991).

La transcripción de GS es regulada positivamente por un segundo sistema de control, la vía de control general de aminoácidos. Este sistema controla coordinadamente la expresión de varios genes cuyos productos están involucrados en la biosíntesis de aminoácidos: la privación de sólo uno de ciertos aminoácidos resulta en la derepresión de las enzimas controladas por esta vía.

El tercer sistema de control al que responde la síntesis de *gln1* es la limitación de purinas: una cepa auxótrofa de adenina incrementa diez veces su actividad en un cultivo limitado de este metabolito.

gln1 ya ha sido clonado y secuenciado (Minehart y Magasanik, 1992) y presenta tres elementos con la secuencia 5'-GATAA-3' en su región promotora. El marco abierto de lectura parece ser de 1110 nucleótidos, lo que codificaría para una proteína de 370 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 42 KDa.

La permeasa general de aminoácidos.

A través de la permeasa general de aminoácidos (GAP) se transporta una gran variedad de compuestos nitrogenados al interior de la célula. La GAP es un sistema de transporte membranal con muy poca especificidad: entre los sustratos de esta permeasa se encuentran todos los L- y la mayoría de los D- isómeros de los aminoácidos, L-aminoácidos no proteicos y varios análogos de aminoácidos tóxicos. Por ello, tanto la actividad como la síntesis de esta permeasa están altamente reguladas y dependen de la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo.

La transcripción de *gap1* (gen que codifica la GAP), es regulada por el sistema GLN3,URE2 en respuesta a la disponibilidad de glutamina. Asimismo, la transcripción se activa también independientemente de GLN3, por ausencia de amonio, glutamina o glutamato en el medio de cultivo. Si estos compuestos son añadidos al medio de cultivo, ocurre una rápida inactivación de GAP, acompañada de la represión de las enzimas catabólicas. Esta respuesta podría deberse a que la GAP, al ser inactivada por amonio, glutamina o glutamato, libera una señal intracelular para detener la expresión de *gap1*, de manera que al inactivarse la GAP, se bloquea la entrada a la célula de otros compuestos nitrogenados secundarios que inducirían a las enzimas requeridas para su catabolismo innecesariamente y al mismo tiempo, se bloquea la síntesis de la propia GAP (Magasanik, 1992).

Se han reportado dos genes cuyos productos intervienen en la inactivación de las permeasas, incluyendo la de GAP: *npi1* y *npi2* (por las siglas en inglés *nitrogen permease inactivator*). Se ha demostrado que estos inactivadores actúan aún en un medio no represivo, a menos que el producto de otro gen (*npr1*, *nitrogen permease reactivator*) esté presente (Grenson, 1983; Jauniaux y Grenson, 1990). La secuencia de la proteína *NPR1* es muy semejante a la del dominio catalítico de las cinasas, por lo que es probable que la regulación de la actividad de la permeasa involucre la fosforilación de proteínas. Las mutantes *npr1* (Grenson y Dubois, 1982) presentan dos efectos diferentes: por un lado, varias enzimas catabólicas son dereprimidas en presencia de amonio, glutamina y asparagina; por otro lado, la actividad de varias permeasas se reprime entre un

50 y un 100%, independientemente de la fuente de nitrógeno en la que se creció a la mutante. Los autores proponen que el efecto primario de la mutación de *npr1* es sobre las permeasas, y que la derepresión de las enzimas catabólicas es un efecto de la reducción de la actividad de transporte de los compuestos nitrogenados represores. Por otro lado, se ha reportado que al mutar un gen denominado *per1*, se previene la inactivación de la GAP por amonio, sin alterar la inactivación mediada por la glutamina o el glutamato (Courchesne y Magasanik, 1983).

gap1 ya ha sido clonado y secuenciado (Jauniaux y Grenson, 1990) y presenta cinco elementos con la secuencia 5'-GATAA-3' en su región promotora. No tiene intrones y el marco abierto de lectura parece ser de 1803 nucleótidos.

Otras vías catabólicas en *Saccharomyces cerevisiae*.

Finalmente, *Saccharomyces cerevisiae* posee varias otras vías catabólicas de compuestos nitrogenados que ya han sido muy bien estudiadas. En todas las enzimas de estas vías catabólicas cuya expresión es mediada por RCN, *GLN3* y *DAL80*, se ha observado que presentan dos o más secuencias tipo GATA en sus regiones promotoras, lo que indica que todas ellas son co-reguladas por el mismo tipo de productos moduladores del metabolismo. ✽

ANTECEDENTES

La glicina es uno de los aminoácidos que *Saccharomyces cerevisiae* no es capaz de utilizar como fuente de nitrógeno, ya que no la puede catabolizar (Cooper, 1982); sin embargo, se ha reportado que este compuesto altera la asimilación de amonio, a través de inhibir *in vitro* a la glutamino sintetasa (Kapoor y Bray, 1968, en *Neurospora crassa*). Asimismo, el glioxilato (cetoácido de la glicina) inhibe a la glutamato deshidrogenasa biosintética de *S. cerevisiae* (González, et.al. 1987).

En virtud de analizar más detenidamente el papel de la glicina en la producción y asimilación de amonio, en nuestro laboratorio encontramos que en la presencia simultánea de una fuente de nitrógeno y de glicina, la actividad específica de al menos dos enzimas catabólicas, la GDH-NAD y la alantoinasa, se encontraba disminuída, correlacionando con el tiempo de duplicación, que se veía incrementado en los medios de cultivo (glutamato + glicina y alantoina + glicina). Hicimos un análisis del crecimiento de la cepa S288C cultivada en la presencia simultánea de cada una de 23 diferentes fuentes de nitrógeno y glicina. Encontramos que el tiempo de duplicación de la levadura cultivada en 15 de estos compuestos nitrogenados incrementaba en la presencia de glicina desde una concentración de 500 μ M. A partir de la cepa silvestre S288C, aislamos mutantes capaces de crecer en la presencia simultánea de glicina, obteniendo diferentes fenotipos que agrupamos en tres clases: *i*) aquellas que crecían bien en glicina como única fuente de nitrógeno; *ii*) aquellas que no crecían en glicina como única fuente de nitrógeno, pero eran capaces de crecer con un alto tiempo de duplicación en algunos compuestos + glicina. Las mutantes pertenecientes a esta clase presentaban fenotipos diferentes ya que eran capaces de crecer sólo en los medios en las que fueron seleccionadas: glutamato + glicina, alantoina + glicina y arginina + glicina; y *iii*) aquellas que crecían mal en glicina (pero alcanzaban a duplicarse cuatro veces en 24 horas), y crecían con el mismo tiempo de duplicación en medios con o sin glicina. Sin embargo, las mutantes pertenecientes a esta clase aumentaban el tiempo de duplicación en algunos compuestos nitrogenados sin necesidad de agregar glicina.

Las mutantes de la clase *iii*) presentaban un fenotipo pleiotrópico; así, por ejemplo, crecían con la misma eficiencia en alantoína, arginina o GABA, independientemente de la presencia de glicina 20mM, que la cepa silvestre sin glicina, pero crecían más lentamente al cultivarlas en glutamato, prolina, fenilalanina, ornitina, treonina, tirosina o citrulina con o sin la presencia simultánea de glicina; además, crecían tan mal como la cepa silvestre en la presencia simultánea de glicina y aspartato, alanina o triptofano. Asimismo, la actividad de alantoinasa y de GDH-NAD era alta en las mutantes de esta clase independientemente de la presencia de glicina, pero no eran mutantes constitutivas ya que ambas actividades eran inhibidas por la presencia de amonio o glutamina en el medio de cultivo.

Resumiendo, en la cepa S288C de *Saccharomyces cerevisiae*, la adición de glicina a un medio de cultivo que contiene alguna de las fuentes de nitrógeno, desencadena un efecto de disminución de la actividad específica de algunas de las enzimas catabólicas. Sin embargo, la glicina es un compuesto nitrogenado que no es metabolizable. Se obtuvieron mutantes capaces de crecer con un alto tiempo de duplicación en un medio conteniendo simultáneamente alantoína como fuente de nitrógeno y glicina 20mM. Al determinar la actividad específica de las mutantes de esta clase de GS y alantoinasa en la presencia simultánea del metabolito inductor (glutamato y alantoína, respectivamente) y glutamina, encontramos que esta no ejercía efecto alguno sobre la actividad. Por ello, decidimos analizar más detenidamente a una de las mutantes de esta clase, a la que hemos denominado AL50 *.

OBJETIVO

Caracterizar fisiológicamente la respuesta de las cepas silvestre S288C y mutante AL50, determinada en la presencia simultánea de una fuente de nitrógeno secundaria y glutamina. Asimismo, determinar si la glutamina y la asparagina reprimen a nivel de la transcripción la expresión de las enzimas necesarias para el catabolismo de compuestos nitrogenados secundarios en las cepas silvestre y mutante. *

MATERIAL Y METODOS

CEPAS Y PLASMIDOS: En la Tabla 1 se muestran las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que se utilizaron en este trabajo. Las cepas de *Escherichia coli* fueron la ED8767 y la JM101 que son cepas silvestres que contenían los plásmidos que requeríamos, y utilizamos la cepa HB101 como receptora en nuestras transformaciones.

CEPA	PROPIEDADES	REFERENCIA
S288C	MAT α <i>mal1,gal2</i>	CSH Lab. Nueva York, E.U.
R757	MAT α <i>ura3-52, his, lys9</i>	Gaber, et al, 1988.
MC3	MAT α <i>ino 1-13, ino 2-8, gal2, can1</i>	Culbertson y Henry, 1975.
AL50	Alan-Glir, derivada de la S288C	Segal, C., 1991.
d50-8b	Diploide AL50/MC3, Alan-Glir.	Este trabajo.

Tabla 1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo.

El plásmido YCp50 fue usado como vector, por su característica de replicarse tanto en bacterias como levaduras, además de poseer los genes marcadores transcribibles *ura3* (biosíntesis de uracilo) y *bla* (resistencia a ampicilina). El plásmido pMRFW2 tiene interrumpido el gen *ura3* con una inserción Ty en la posición 3-52, este plásmido nos fue proporcionado por el Dr. Winston (Rose y Winston, 1984). El plásmido pYA102 contiene una parte del gen *tcm1* que codifica para actina en el fragmento de 1.5kb flanqueado por los sitios *BamHI* y *HindIII*; la sonda de actina se utilizó como control interno en los análisis de RNA mensajero. El plásmido pFG4 contiene una parte del gen *dal1* que codifica la alantoïnasa, en un fragmento de 700pb entre los sitios *HindIII* y *XbaI*; este plásmido nos fué proporcionado por el Dr. Cooper. El plásmido pRR20 contiene una parte del gen *dal5* que codifica para la permeasa de alantoato, en un fragmento de 900pb flanqueado por dos sitios *EcoRI*; este plásmido nos fué proporcionado por el Dr. Rai del grupo del Dr. Cooper. Y el plásmido pJCJ252 contiene al gen de 4.2Kb *gap1* que codifica para la permeasa general de aminoácidos flanqueado por dos sitios *XhoI*; este plásmido nos fue proporcionado por la M en C Giselle Rosas quien a su vez lo obtuvo del grupo de la Dra. Grenson (Jauniaux y Grenson, 1990). En la figura 5 se muestran las sondas utilizadas en este trabajo:

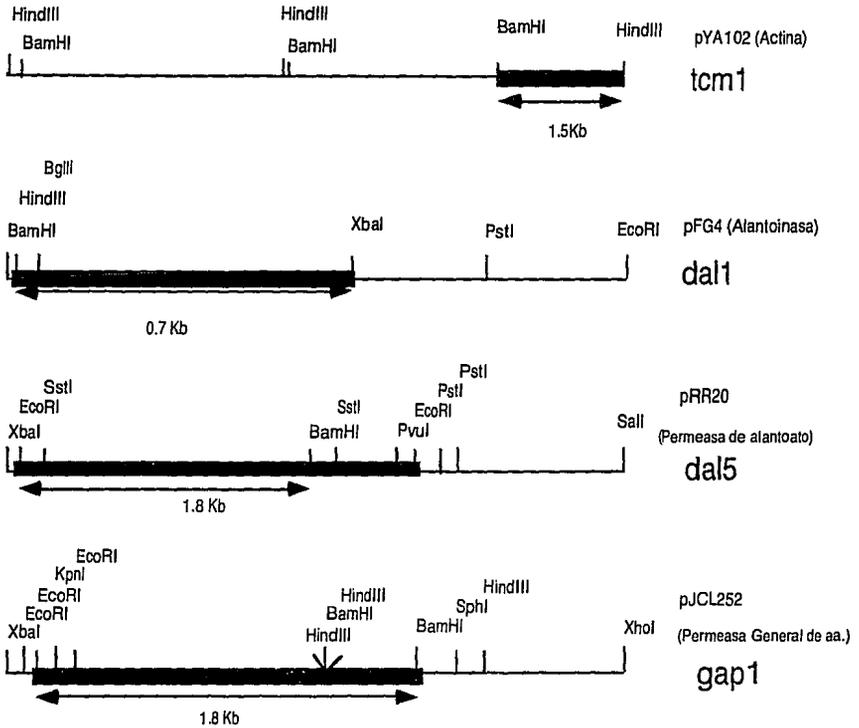


Figura 5. Sondas de DNA utilizadas en este trabajo.

MEDIOS DE CRECIMIENTO Y CONDICIONES DE CULTIVO.

LEVADURAS

MEDIO RICO (YPD): Se preparó según la fórmula de Difco Yeast Base con extracto de levadura al 1%, peptona de caseína al 2% y dextrosa al 2%. Para medio sólido se añadió agar al 2%. Se esterilizó en autoclave.

MEDIO MINIMO (MM): Se preparó con sales, vitaminas y elementos traza según la fórmula de Difco Yeast Base. Se utilizó dextrosa al 2% como fuente de carbono y sulfato de amonio 40mM como fuente de nitrógeno. Para medio sólido se añadió agar al 2%. Se esterilizó en autoclave. En caso de cepas auxótrofas, se añadieron los requerimientos, esterilizando por filtración.

MEDIO SIN NITROGENO (SN): Se preparó igual que el MM pero sin sulfato de amonio. Se esterilizó en autoclave y se suplementó la fuente de nitrógeno con el compuesto indicado como única fuente a una concentración de 1mg/ml, esterilizando por filtración. Los medios que simultáneamente contenían glutamina, la contenían también a 1mg/ml. Los medios que simultáneamente contenían glicina, la contenían a una concentración de 20mM. Los medios sólidos, contenían agarosa (para evitar contaminación con amonio) al 1.2%. Cuando la cepa tenía auxotrofías, se añadieron los requerimientos. Para las placas de transformación por el método de protoplastos se añadió sorbitol a una concentración 1M.

CONDICIONES DE CRECIMIENTO: Generalmente, se hicieron precultivos de 12hrs en YPD en agitación, se lavaron 3 veces las células con agua y se inocularon a $D.O_{600nm} = 0.03$ para curvas de crecimiento y $D.O_{600nm} = 0.05$ para otros cultivos. Las células se cultivaron a 30°C, a menos que se indique otra temperatura, en estufa o en agitación a 250rpm.

MEDIO DE PRE-ESPORULACION Y DE ESPORULACION: El medio de pre-esporulación se preparó con extracto de levadura al 0.8%, peptona de caseína al 0.8% , dextrosa al 10% y agar al 2%. El medio de esporulación se preparó con acetato de potasio al 1% y agar al 2%. Se esterilizaron en autoclave.

CRUZA, ESPORULACION Y DISECCION DE TETRADAS: Se mezclaron en parche, las dos cepas en placas de YPD. Se incubaron 24hrs. Se tomó del centro del parche y se estrió para colonias aisladas en MM. Se tomaron estas y se parcharon en MM y medio de pre-esporulación. Una vez verificados los diploides (en MM), se pasaron las colonias del medio de pre-esporulación a esporulación. Una vez observadas las tétradas, se digirió la pared con β -glucoronidasa 2mg/ml 10 minutos y se procedió a realizar su disección con microaguja y sembrarlas en YPD.

BACTERIAS

MEDIO RICO LURIA-BERTANI (LB): Se preparó con cloruro de sodio y extracto de levadura al 0.5% , para medio sólido se añadió agar al 2%. Se esterilizó en autoclave. Se añadió ampicilina cuando era necesario, esterilizando por filtración.

MEDIO MINIMO M9: Se preparó con sales M9 1X, MgSO₄ 1.2mM, tiamina al 0.25%, CaCl₂ al 0.001%, casaminoácidos al 2%, timina al 0.005%, dextrosa al 2% y ampicilina 2mg/ml. Las sales M9 se prepararon con Na₂HPO₄ al 7%, KH₂PO₄ al 3%, NaCl al 0.5% y NH₄Cl al 1%.

CONDICIONES DE CRECIMIENTO: Generalmente, se hicieron precultivos de 12hrs en 2ml de LB en agitación, y se inoculó directamente a D.O._{600nm}= 0.05. Las células se cultivaron a 37°C en estufa o en agitación a 250rpm.

TRANSFORMACION

TRANSFORMACION DE LEVADURAS (PROTOPLASTOS): Protocolo modificado de Hinnen, et al, 1978. Se creció un cultivo en 200ml de YPD hasta una concentración de 2×10^7 células/ml (D.O._{600nm}= 1.5 - 2.0). Se lavó una vez con agua, se resuspendió en 20ml de SED (sorbitol 1M, EDTA 25nM, pH 8.0, esterilizado en autoclave). Se incubó 10 minutos a 30°C. Se lavó con 20ml de sorbitol 1M estéril. Se resuspendió suavemente en 20ml de SCE (sorbitol 1M, citrato de sodio 100mM, EDTA 10mM, pH 5.8) + 3mg/ml de β-glucuronidasa de U, esterilizado por filtración, se incubó a 30°C por 30 minutos. Se verificaron los protoplastos en microscopio y se lavaron 2X con sorbitol 1M y 1X con STC (sorbitol 1M, tris 10mM y cloruro de calcio 10mM). Se resuspendió en 1ml de STC y se dividió en 10 tubos falcon estériles desechables con 100μl c/u. Se añadieron, en el centro de la gota, 2μg de DNA circular. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se añadió a cada tubo 1ml de PEG (polietilenglicol 20% en tris 10mM + cloruro de calcio 10mM, esterilizado por filtración). Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó y se resuspendió en 150μl de SOS (sorbitol 1M, YPD al 33.5% y cloruro de calcio 6.5mM). Se incubó 20 minutos a 30°C y se añadió a cada tubo 6ml de medio de cultivo sólido (agar blando) a 40°C. Se vació cada tubo en placas con el medio sólido adecuado, se dejó solidificar a temperatura ambiente y se incubó a 30°C por 8 días, monitoreando diariamente el crecimiento.

TRANSFORMACION DE LEVADURAS (CLORURO DE LITIO): Protocolo modificado de Ito, et al, 1983. Se creció un cultivo en 200ml de YPD hasta una concentración de $5-7 \times 10^6$ células/ml (D.O._{600nm}= 0.6). Se lavó con agua y se resuspendió en 1/200V de LiAc/TE (LiAc 100mM, Tris HCl 10mM y EDTA 1mM, pH 7.5). Se incubó a 30°C 60 minutos. En tubo de microfuga se puso 100μl de células, 40μg de DNA de timo de carnero sonificado y 5μg de DNA circular. Se incubó 30 minutos a 30°C. Se añadieron 700ml de PEG 4000 40% en LiAc/TE y se incubó nuevamente 30 minutos a 30°C. Se dió un choque calórico a 42°C por 5 minutos. Se lavó 2X con TE y se plateó en los medios sólidos adecuados. Se incubaron 8 días a 30°C, monitoreando diariamente el crecimiento.

TRANSFORMACION DE BACTERIAS: Se inoculó un precultivo de LB de 2ml. Se incubó 12hrs y se tomaron 700 μ l para inocular 60ml de LB. Se incubó a 37°C con agitación hasta D.O._{600nm}=0.55-0.63 (90 minutos aprox.). Se centrifugaron 25ml a 4000rpm a 4°C, 5 minutos. Se resuspendió en 25ml de MgSO₄ 10mM frío. Se incubó en hielo 30 minutos. Se centrifugó y se resuspendió en 12.5ml de CaCl₂ 50mM frío. Se incubó 15 minutos en hielo. Se centrifugó y se resuspendió en 2.5ml de CaCl₂ 50mM frío. Estas células competentes se pueden guardar hasta 30 días a -70°C. Se pusieron 200 μ l de células competentes, 1 μ g de DNA circular y 10 μ l de una solución de MgCl₂ 100mM/CaCl₂ 100mM en tubo falcon estéril desechable. Se enfrió 15 minutos en hielo y se dió un choque calórico a 42°C por 2 minutos. Se dejó 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 2.5 ml de LB y se incubó con agitación 90 minutos a 37°C. Se centrifugó a 4000rpm a 4°C 10 minutos, se resuspendió en 1ml de LB y se espatuló en placas de LB+antibiótico. Se incubó 24 hrs a 37°C.

DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

PREPARACION DE EXTRACTOS CRUDOS: Se creció precultivo en 50ml de YPD. Se inoculó a D.O._{600nm}=0.05 y se filtraron las células, en fase de crecimiento exponencial (en D.O._{600nm} = 0.3 - 0.9), por membrana *Millipore* de 1.2 μ M. Se recuperó la pastilla celular y se resuspendió en el buffer de extracción adecuado para cada enzima, siempre manteniendo en frío. Se rompió cada extracto con perlas de vidrio, con cinco pulsos de 1 minuto c/u en *Vortex*. Se centrifugó a 15000rpm durante 10 minutos y se recuperaron los sobrenadantes.

DETERMINACION DE PROTEINA: La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (Lowry, etal, 1951).

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE ALANTOINASA: Se basó en el método reportado por Lee y Roush (1964), con varias modificaciones. Se prepararon los extractos resuspendiendo en buffer de extracción (Tris 100mM, pH 8.0). Se incubó un tubo de ensaye conteniendo alantoína 4mM en buffer de extracción y 500 μ g/ml de proteína del extracto en un volumen total de 10ml, en un baño a 30°C y se tomaron 5 muestras de 2ml c/u cada cierto tiempo (un tiempo 0 y cuatro tiempos entre 5 y 40 minutos). Se agregó de inmediato 100 μ l de HCl concentrado para detener cada reacción. Una vez preparadas las cinco muestras, se agregó a cada una 200 μ l de fenilhidrazina HCl al 1%, se hirvieron a baño maría 2 minutos y se dejaron a temperatura ambiente 10 minutos. Se añadió a c/u 1.2ml de HCl concentrado y 200 μ l de ferricianuro de potasio al 5%. Se determinó la actividad por los cambios en densidad óptica a 524nm. Paralelamente, se hace una curva estándar usando ácido alantoico.

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE GLUTAMATO DESHIDROGENASA CATABOLICA (GDH-NAD): Se prepararon los extractos en buffer de extracción (K_2HPO_4 100mM, EDTA 1mM, y β -mercaptoetanol 2mM, pH 7.0). Se siguió el método reportado por Drillien, et al (1973). Se puso en celda de cuarzo 1ml de coctel (K_2HPO_4 125mM, pH 8.0, α -cetoglutarato 30mM, NADH 360mM, NH_4Cl 500mM) y se inició la reacción añadiendo 500 μ g/ml de proteína del extracto, midiendo la absorbancia a 340nm en un espectrofotómetro. Paralelamente se corrieron controles sin α -cetoglutarato y sin NH_4Cl .

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE GLUTAMINO SINTETASA (GS): Basado en el método de Ferguson y Sims (1974), con varias modificaciones. Se prepararon los extractos en buffer de extracción (K_2HPO_4 5mM, EDTA 5mM y K_2SO_4 50mM, pH 7.2). En baño a 30°C, se pusieron tubos conteniendo 2ml de coctel (ADP 75 μ M, Gln 3.5mM, hidroxilamina 875 μ M, arsenato de sodio 1.75mM y MnCl 225 μ M). Para arrancar la reacción, se añadió a cada tubo 500 μ g/ml de proteína del extracto. Se hizo una primera estimación añadiendo a uno de los tubos, después de 1 minuto de reacción, 1ml de reactivo de parar (TCA 2.5%, cloruro férrico 3.2% en HCl 0.5N). Dependiendo de la intensidad del color, se detuvieron las demás reacciones entre 0.5 y 4 minutos de tiempo de reacción. Se centrifugaron los tubos y se determinó la actividad por los cambios en la densidad óptica a 500nm.

TRANSPORTE DE CITRULINA ^{14}C A TRAVES DE LA PERMEASA GENERAL DE AMINOACIDOS (GAP): Se crecieron precultivos en YPD por 12hrs a 30°C a 250rpm. Se lavaron e inocularon 200ml de medio de cultivo a D.O._{600nm}=0.05. Se tomó 35ml de cultivo a las 7, 10 y 24 hrs de crecimiento. En tubo cónico se tenía 80 μ l de citrulina ^{14}C 10mM al que se añadieron 5 ml de cultivo, reservándose lo demás para cuantificar la proteína. Se filtró 1ml a los 0.5, 1, 2 y 4 minutos por *Millipore* de 0.45 μ M. Se lavaron los filtros con 10ml de citrulina 10mM y se depositaron en viales, se añadió a cada uno 5ml de líquido de centelleo. Se hizo un control de cuentas totales poniendo directamente en vial 100 μ l de la reacción y 5ml de líquido de centelleo, y se contaron las cuentas por minuto de ^{14}C en un contador de centelleo.

NORTHERN BLOT

MINIPREPARACION DE RNA TOTAL: Se modificó el método reportado por Carlson y Botstein (1982). Se precultivaron las cepas 24 horas en SN + fuente de nitrógeno. Se inocularon los medios con 8ml de precultivo 1500ml de los medios requeridos a D.O._{600nm}=0.05. Se lavó 1X con agua + DPC 1 μ l/ml (dietilpicrocarbonato) y se recuperó pastilla celular en tubos de microfuga. Se resuspendió en 470 μ l de buffer de lisis (NaOAc 100mM, MgCl₂ 5mM, agua con DPC, pH 5.2), se añadió rápidamente 25 μ l de SDS al 20% y 5 μ l de DPC. Se extrajo 3-4 veces con 500 μ l de PCI, agitando en *vortex* 1 minuto, incubando 5

minutos a 65°C, pasándose a baño de hielo seco-EtOH hasta congelarse, centrifugando 10 minutos en la microcentrífuga a 14 Krpm y recuperándose la fase acuosa. Tras la última extracción se pasó a un tubo de microfuga que contenía 5µl de MgCl₂ 100mM. Se extrajo una vez con cloroformo:isoamílico (25:1), se recuperó la fase acuosa y se añadió 1/10V de NaOAc 3M pH5.2 y 2.5X de EtOH absoluto. Se dejó precipitar una hora en baño de hielo seco-EtOH, se lavó con EtOH 80% se secó y se resuspendió en un volumen adecuado de agua con DPC. Se conservó a -70°C.

GEL DE RNA: Se limpió la cámara de electroforesis, el soporte y el peine con SDS al 1% y se enjuagó con agua + DPC. Se siguió el protocolo reportado por Sheiness y Sullivan (1986). Se preparó agarosa al 1% en buffer MAE (MOPS 20mM, NaOAc 5mM y EDTA 1mM, pH 7.0), se dejó enfriar y se añadió formaldehído al 2.2% final. Se dejó gelificar en el soporte para geles. Se prepararon las muestras con 50µg de RNA, 40µl de mezcla de corrida (formamida desionizada 2.2ml, formaldehído 37% 800µl, MAE 10X 500µl, Glicerol 80% 400µl y azul de bromofenol 2% 100µl) y 2µl de EtBr 0.1%. Se desnaturalizó a 56°C durante 15 minutos y se cargó el gel. Se corrió 4 horas a 150V. Se visualizó en luz UV, se tomó foto y se lavó 2X 20 minutos en SSC10X para eliminar el formaldehído.

TRANSFERENCIA A FILTRO DE NYLON: Modificado de Thomas (1980). Se colocó el gel en un puente de papel *Whatman 3MM* en contacto con SSC10X, se cubrió con filtro de *nylon Amersham*, y se pusieron 3.5 pulgadas de altura de papel absorbente, con un peso de 500gr en su parte superior. Se dejó 12 horas. Se retiró el filtro de *nylon*, se lavó con SSC1X, se secó a temperatura ambiente y se fijó durante 5 minutos con luz UV de baja intensidad. Se guardó en bolsa sellada a 4°C.

OBTENCION DE PLASMIDOS Y SONDAS

MAXIPREPARACION DE PLASMIDOS: Se utilizó el kit de *QIAGEN tip 500* como indica el fabricante.

DIGESTIONES CON ENZIMAS DE RESTRICCION: Se siguieron las instrucciones de los fabricantes. Se incubó el tiempo y a la temperatura indicada para cada enzima y se visualizó en minigel de agarosa 1%/TBE, corrido en cámara de electroforesis a 80V. Se estimó la concentración aproximada (de acuerdo a la visualización) y se conservó a -20°C.

PURIFICACION DE SONDAS: Se corrió en gel grande de agarosa 1%/TBE a 50-60V el plásmido ya digerido o la banda que se quería purificar. Una vez

separada la banda de elección, se cortó el gel en la parte inmediatamente abajo de ella y se relleno con agarosa de bajo punto de fusión al 0.6%, se dejó gelificar 30 minutos a 4°C y se volvió a correr a 50-60V hasta que la banda migró a la zona de la agarosa de bajo punto de fusión. Se cortó la banda y se incubó a 65°C hasta que se fundió la agarosa, y se añadió 1/10V de NaCl 5M. Se mezcló bien y se dejó a 65°C 5 minutos más y después se incubó 5 minutos a 37°C, durante los cuales se saturó fenol con NaCl 1M, se obtuvo la fase superior que se utilizó para extraer el DNA de la agarosa fundida. Se hizo otra extracción pero a temperatura ambiente y con PCI (fenol:cloroformo:isoamilico 25:24:1), se precipitó con 1V de isopropanol y 10µg de tRNA 2 horas a -20°C. Se lavó y se resuspendió en un volumen adecuado de agua o TE. Se visualizó en minigel de agarosa 1%/TBE, corrido en cámara de electroforesis a 80V. Se estimó la concentración aproximada (de acuerdo a la visualización) y se conservó a -20°C.

MARCAJE DE SONDAS POR "MARCADO AL AZAR": Se siguieron las instrucciones del fabricante con el kit de *random primed* de STRATAGENE.

CUANTIFICACION DE LA RADIOACTIVIDAD INCORPORADA: Se tomaron dos gotas de una dilución 1:100 de la sonda marcada, se pusieron en el centro de dos filtros *Whatman DE-81* que se dejaron secar a temperatura ambiente. Uno de ellos se apartó (cuentas totales) y con el otro (marca incorporada a nucleótidos) se hicieron los siguientes lavados: 3X 5 minutos en 25ml de Na₂HPO₄, 2X 1 minuto en 25ml de agua y 2X 1 minuto en EtOH absoluto. Se secó a temperatura ambiente, se pusieron los dos filtros en viales, se añadieron 5ml de líquido de centelleo y se contó el ³²P en un contador de centelleo. Se calculó la radioactividad incorporada con respecto a las cpm del filtro que no se lavó.

COLUMNA DE EXCLUSION MOLECULAR: Se empacó una jeringa de 1ml con *Sephadex G-25*, se aforó la sonda marcada a un volumen de 100µl y se añadieron a la jeringa. Se centrifugó y se recuperó la sonda marcada pero ya lavada. Se conservó a 4°C.

HIBRIDIZACION: Se prehibridizó la bolsa que contenía el filtro de *nylon* con mezcla de hibridización (formamida desionizada 2.5ml, NaCl 5M 250µl, Denhard 50X [ficoll 1g, polivinilpirridolina 1g, BSA 1g en 100ml de agua] 200µl, SDS 10% 500µl, NaH₂PO₄ 200mM 130µl, Na₂HPO₄ 200mM 360µl, DNA de esperma de salmón 5mg/ml previamente desnaturalizado por ebullición 20µl y agua + DPC cbp 5ml). Se incubó al menos 4 hrs a 42°C con agitación. Se añadieron los 100µl de sonda ya marcada y desnaturalizada con 10 minutos de ebullición y se incubó 12 horas a 42°C con agitación. Se guardó el líquido de hibridización con la sonda marcada para su posterior utilización y se hicieron los siguientes lavados al filtro de *nylon*: SSC 5X + SDS 0.1% 15 minutos a temperatura ambiente con agitación, SSC 2X + SDS 0.1% 15 minutos a temperatura ambiente con agitación, 2 veces SSC 2X + SDS 0.1%

15 minutos a 50°C con agitación, SSC 0.1X + SDS 0.1% 3 minutos a temperatura ambiente con agitación y SSC 0.1X a temperatura ambiente 10 segundos.

EXPOSICION AUTORADIOGRAFICA: Se forraron las pantallas de alta intensidad de un *cassette* para exposición autorradiográfica con plástico autoadherible, para no permitir que se secase el filtro. Se colocó el filtro, se quitaron las burbujas, se estimó la marca con un contador *Geiger* y se puso una película *Kodak X-OMAT AR* en cuarto oscuro. Se dejó exponer de acuerdo a la estimación entre 20 minutos y 4 días a -70°C. Se reveló.

REUTILIZACION DE LOS FILTROS DE NYLON: La reutilización de los filtros es necesaria para hibridizar posteriormente con una sonda que funcione como control interno (nosotros siempre usamos actina). Sin embargo, la experiencia nos indicó que los filtros se pueden reutilizar hasta 3 veces. Se puso el filtro marcado (nunca se debe dejar secar) en 250ml de SDS al 0.1% hirviendo. Se calentó 5 minutos en horno de microondas a la máxima potencia, se dejó enfriar y se volvió a lavar con SDS nuevo. Se verificó la ausencia de marca con el contador *Geiger* o en casos especiales, para asegurarse, exponiendo en película autorradiográfica. Una vez limpio de radioactividad, se secó y se guardó en bolsa sellada a 4°C.

PREPARACION DE BANCO DE DNA GENOMICO.

EXTRACCION DE DNA GENOMICO POR GRADIENTE DE CsCl: Se creció la cepa en 1000ml de YPD hasta $D.O_{600nm}=2.0$ ($4\text{-}5 \times 10^7$ células/ml), se centrifugó y se resuspendió la pastilla celular previamente pesada en 20ml de solución 1 (sorbitol 1M y fosfato de sodio 50mM, pH 7.5). Se añadió 20 μ l de β -mercaptoetanol y zimoliasa de 100 000U 5mg/g de células. Se incubó 60 minutos a 30°C. Se colectaron los protoplastos por centrifugación y se resuspendieron en 20 ml de solución 2 (Tris HCl 50mM pH 8.0, EDTA sal de sodio 50mM, N-lauril sarcosina al 1%). Se añadió 20 μ l de RNasaA 10mg/ml y se incubó 30 minutos a 37°C. Se añadió 500 μ l de proteinasa K 10mg/ml y se incubó 60 minutos a 65°C. Se dividió en 2 tubos *Corex* de vidrio xilenizados y a cada uno se le agregaron 10ml de Cl. Se centrifugó 10 minutos a 10 Krpm, y se pasó el sobrenadante a tubos *Corex* xilenizados. Se hicieron 2 extracciones más, pero con PCI y otra extracción con Cl. Se juntaron los dos sobrenadantes y se aforó a 32ml con TE. Se añadieron 31.2gr de CsCl y 2ml de EtBr 10mg/ml. Se centrifugó 10 minutos a 10Krpm y se pasó el sobrenadante, con pipeta *Pasteur* xilenizada a tubos de ultracentrifugación para rotor *VTi50*. Se ultracentrifugó a 45Krpm a 20°C 12 horas. Se extrajo con jeringa la banda fluorescente a luz UV. Se pasó a tubo para rotor *VTi65*, se llenó con TE y 31.2gr de CsCl y se ultracentrifugó a 45Krpm a 20°C 12 horas. Se extrajo con jeringa la banda fluorescente a luz UV y se lavó el EtBr con isopropanol 100%

saturado con CsCl, hasta que no fluoresció. Se añadió 1.4ml de agua y 4.2ml de EtOH absoluto y se dejó precipitar a -20°C 2 horas. Se lavó con EtOH 70%, se resuspendió en volumen adecuado de TE y se guardó a -20°C.

DIGESTION PARCIAL: En un tubo de microfuga se pusieron 250µg de DNA genómico total (en este caso, 100µl), 606µl de agua y 80µl del buffer apropiado para la enzima con que se digerirá (para DNA de levadura se recomienda *Sau3A1*). Se incubó 20 minutos a 37°C. Se tomaron 80µl y se añadieron a tubo que contenía 400µl de PC y se dejó en hielo. Se agregaron las unidades necesarias para digerir los 720µl restantes de DNA genómico (en este caso, 14µl de *Sau3A1*) y se incubó a 37°C. Cada diez minutos, durante 90, se tomaron 40µl que fueron añadidos a los anteriores (con PC). Se centrifugó 10 minutos a 14Krpm, se agregó 1/10V de NaOAc y 2.5X de EtOH, se precipitó a -20°C 12 horas. Se lavó con EtOH 70%, se resuspendió en agua y se corrió en un gel de agarosa/TBE al 0.5% a 80V.

ELECTROELUCION: Se cortó el gel en la zona de bandas de alto peso molecular, esto es, entre 12 y 2 Kb, y se metió en una bolsa para diálisis. Se añadieron 800µl de buffer de electroelución, y se corrió a 150V durante 30 minutos o hasta que todo el EtBr estuviera fuera de la agarosa. Se tomaron los 800µl de buffer, se le hizo una extracción con PCI, se precipitó 12 horas con NaOAc y EtOH, se lavó con EtOH 70% y se resuspendió en el menor volumen posible de agua.

DEFOSFATACION DEL VEHICULO: Se hizo una "maxipreparación" del plásmido YCp50 con columnas de *QIAGEN* y se digirió con *BamHI*. En tubo de microfuga se pusieron 255µg de YCp50/*BamHI*, 30µl de buffer 2 (*BioLabs*), 10µl de CIP (fosfatasa alcalina intestinal de carnero) y 160µl de agua. Se incubó a 37°C durante 60 minutos. Se extrajo una vez con PCI, se precipitó con NaOAc y EtOH 100% 20 minutos a -70°C, se lavó con EtOH 70% y se resuspendió en el volumen mínimo posible de agua.

LIGACION: En tubo de microfuga se pusieron 10µl del vehículo defosfatado, 10µl de DNA genómico parcialmente digerido, 1µl de ligasa T4 (C, de 2x10⁶ U/ml, de *BioLabs*), 3µl de buffer 10X y se aforó a 30µl con agua. Se incubó 12 horas a 16°C. Se extrajo una vez con PCI, se precipitó con NaOAc y EtOH 100% 20 minutos a -70°C, se lavó con EtOH 70% y se resuspendió en el volumen mínimo posible de agua. Como control se religó únicamente el vehículo.

AMPLIFICACION Y PREPARACION DE PLASMIDO A GRAN ESCALA: Se transformaron células competentes de *Escherichia coli* con el DNA obtenido en la ligación. Se resuspendieron todas las placas de transformación con ayuda de M9 y se inocularon 1500ml de M9. Se incubó durante 4 horas a 37°C con agitación. Se añadieron 200mg/L de cloramfenicol

y se dejó incubando 12 horas más. Se centrifugó a 5Krpm durante 10 minutos, se dividió en dos, se lavó con 50ml de TE y se resuspendió en 8 ml de sacarosa/TE (sacarosa 8%, tris 10mM pH 8.0 y EDTA 50mM). Se añadieron 1mg/ml de zimoliasa en sacarosa/TE, se incubó 20 minutos a temperatura ambiente y 10 minutos en hielo. Se añadieron 10ml de STE (Tritón X-100 al 0.5%, tris 10mM pH 8.0 y EDTA 50mM), se agitó suavemente y se incubó otros 10 minutos en hielo. Se centrifugó a 15Krpm durante 90 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se añadieron 0.945gr de CsCl/ml. Se puso en tubos *Corex* xilenizados, se añadió 1ml de EtBr 10mg/ml, se mezcló y se centrifugó a 8 Krpm durante 10 minutos. Se recuperó sobrenadante con pipeta *Pasteur* xilenizada y se puso en tubos de polialómero (para ultracentrífuga). Se ultracentrifugó en rotor *Ti70.1* a 20°C a 35Krpm durante 72 horas. Se extrajo la banda de DNA fluorescente, se lavó el EtBr con isopropanol saturado con NaCl en buffer STET (sacarosa al 8%, tritón X-100 al 0.5%, tris 10mM pH 8.0 y EDTA 50mM) hasta que ya no fluoresció, se diluyó con 4X de agua, se añadieron 2.5X de EtOH absoluto y se dejó precipitar 12 horas a -20°C. Se lavó con EtOH 70%, se resuspendió en 500µl de TE, se hicieron dos extracciones con PCI, se precipitó con NaOAc y EtOH 100% 20 minutos a -70°C, se lavó con EtOH 70% y se resuspendió en 300µl de TE. *

RESULTADOS

La glutamina es un intermediario metabólico clave del metabolismo nitrogenado. Es un compuesto que tiene un papel metabólico dual: funciona como donador del nitrógeno requerido para la biosíntesis de la mayoría de los intermediarios metabólicos nitrogenados, a la vez que regula también el catabolismo de compuestos nitrogenados secundarios. Se ha demostrado que en *Aspergillus nidulans* y en *Neurospora crassa*, las proteínas AREA y NIT2, que activan la síntesis de enzimas catabólicas requeridas para la degradación de compuestos nitrogenados secundarios, no son funcionales en presencia de glutamina. En *Saccharomyces cerevisiae*, se ha reportado que al haber glutamina presente en el medio de cultivo, las actividades específicas de varias enzimas catabólicas, como la alantoinasa y la GDH-catabólica, disminuye ocurriendo también una represión, a nivel de la transcripción, de la síntesis de varias enzimas necesarias para la obtención de amonio a partir de compuestos nitrogenados secundarios.

LA MUTANTE AL50 PRESENTA ACTIVIDADES ENZIMATICAS QUE NO DISMINUYEN POR LA PRESENCIA DE GLUTAMINA.

Con el fin de estudiar el efecto de la glutamina cuando se agrega simultáneamente a un medio de crecimiento que contiene una fuente secundaria de nitrógeno, determinamos algunas actividades enzimáticas y el transporte de un metabolito a través de la GAP de las cepas S288C y AL50:

1. Actividad específica de alantoinasa.

Se determinó la actividad específica de alantoinasa de las cepas silvestre y mutante de extractos de células cultivadas en los medios que se indican como únicas fuentes de nitrógeno. Los resultados se muestran en la tabla 2:

Tabla 2. Actividades de alantoinasa^a de las cepas silvestre S288C y mutante AL50 en diferentes medios de cultivo.

CEPA	ALANTOINA	GLUTAMINA	ALANTOINA+GLUTAMINA
S288C	42.4 (±5.4)	6.6 (±1.8)	5.0 (±0.8)
AL50	45.8 (±9.1)	10.3 (±4.0)	36.0 (±10.6)

^aμmoles de alantoato/min/mg de proteína

n=5

Los resultados presentados en la tabla 2, muestran que la cepa silvestre S288C presenta una baja actividad específica de alantoinasa al ser cultivada en alantoína + glutamina como únicas fuentes de nitrógeno. En cambio la mutante presenta actividades altas de alantoinasa tanto en alantoína como en alantoína + glutamina. Ambas cepas presentan una baja actividad de la enzima al ser cultivadas en glutamina, lo que señala que ni la mutante ni la silvestre tienen una actividad constitutiva de alantoinasa.

2. Actividad específica de glutamino sintetasa.

Asimismo, se determinó la actividad de glutamino sintetasa (GS) de las cepas silvestre y mutante. Los resultados se muestran en la tabla 3:

Tabla 3. Actividades de GS^a de las cepas silvestre S288C y mutante AL50 en diferentes medios de cultivo.

CEPA	GLUTAMATO	GLUTAMINA	GLUTAMATO+GLUTAMINA
S288C	0.42 (±0.09)	0.09 (±0.04)	0.08 (±0.04)
AL50	0.42 (±0.05)	0.27 (±0.03)	0.43 (±0.03)

^aμmoles de γ-glutamil hidroxamato/min/mg de proteína

n=4

Los resultados mostrados en la tabla 3 indican que la actividad de GS de la mutante no disminuye debido a la presencia simultánea de glutamina y glutamato. La actividad específica cuando sólo se cultiva en glutamina como única fuente de nitrógeno es baja en ambas cepas porque no hay inductor presente en el medio de cultivo. Si bien la actividad en este medio de la AL50 es más alta que la de la cepa silvestre, no llega a ser una actividad constitutiva.

3. Actividad específica de glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD.

Se determinó la actividad de otra de las enzimas clave del metabolismo nitrogenado: la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD (GDH-catabólica). Los resultados se muestran en la tabla 4:

Tabla 4. Actividades de GDH-NAD^a de las cepas silvestre S288C y mutante en diferentes medios de cultivo.

CEPA	GLUTAMATO	GLUTAMINA	GLUTAMATO+GLUTAMINA
S288C	0.54 (±0.03)	0.10(±0.005)	0.01 (±0.005)
AL50	0.51 (±0.04)	0.05 (±0.02)	0.01 (±0.009)

^aµmoles de NAD_{oxidado}/min/mg de proteína

n=5

La cepa mutante tiene la actividad de GDH-NAD regulada de la misma manera que la cepa silvestre. Como veremos en la discusión, el producto del gen *GDH2*, la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD, no parece estar sujeto a regulación a nivel transcripcional por glutamina.

4. Transporte de citrulina por la permeasa general de aminoácidos.

Se determinó la actividad de transporte de citrulina ¹⁴C, metabolito que sólo puede ser transportado a través de la GAP, de las cepas silvestre y

mutante de células cultivadas en alantoina y alantoina + glutamina como únicas fuentes de nitrógeno. Los resultados se muestran en la tabla 5:

Tabla 5. Transporte de citrulina^a a través de la GAP de las cepas silvestre S288C y mutante AL50 en presencia y ausencia de glutamina.

CEPA	ALANTOINA	ALANTOINA+GLUTAMINA
S288C	3.65	0.023
AL50	5.44	0.010

^aμmoles de citrulina ¹⁴C/min/mg de proteína.

n=1

La actividad de transporte a través de la GAP de las dos cepas, disminuye por la presencia simultánea de la fuente de nitrógeno secundaria y la glutamina, con respecto a la actividad en ausencia de este último metabolito.

LA CEPA AL50 TIENE FENOTIPO DOMINANTE.

Con el fin de saber cómo segregaba la mutación presente en la cepa AL50 y establecer una relación de dominancia/recesividad contra el fenotipo de la cepa silvestre, se realizó una cruce entre la cepa mutante y la cepa MC3.

Se obtuvieron diploides cuyo fenotipo fue estudiado. Paralelamente, los diploides fueron forzados a esporular; sin embargo, no se logró obtener tétradas cuyos cuatro productos fueran viables, por lo que no se pudo realizar el análisis.

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos al determinar la actividad específica de alantoinasa de las cepas S288C, MC3, AL50 y d50-8b (el diploide obtenido de la cruce) en las fuentes de nitrógeno indicadas, más inositol, compuesto del cual la cepa MC3 es auxótrofa.

Tabla 6. Actividades de alantoinasa^a de las cepas S288C, MC3, AL50 y d50-8b en diferentes medios de cultivo.

CEPA	ALANTOINA	GLUTAMINA	ALANTOINA+GLUTAMINA
S288C	43.8	3.95	10.2
MC3	13.1	0.02	3.1
AL50	35.8	2.30	36.0
d50-8b	30.8	3.80	36.3

^aμmoles de alantoato/min/mg de proteína

n=1

Asimismo, en la tabla 7 se presentan los resultados obtenidos al determinar la actividad específica de GS de las mismas cepas, cultivadas esta vez en glutamato + inositol, glutamina + inositol y glutamato + glutamina + inositol como fuentes de nitrógeno:

Tabla 7. Actividades de GS^a de las cepas S288C, MC3, AL50 y d50-8b en diferentes medios de cultivo.

CEPA	GLUTAMATO	GLUTAMINA	GLUTAMATO+GLUTAMINA
S288C	0.41	0.10	0.10
MC3	0.15	0.02	0.01
AL50	0.46	0.28	0.43
d50-8b	0.41	0.21	0.40

^aμmoles de γ-glutamil hidroxamato/min/mg de proteína

n=2 (promedio).

Como se observa en las tablas 6 y 7, las actividades específicas de la cepa MC3 son menores a las de la cepa S288C. Las diferencias entre ellas

pueden deberse a que estas cepas no son isogénicas, sin embargo, las dos presentan la misma regulación en los diferentes medios de cultivo: alta actividad en el compuesto nitrogenado secundario y baja tanto en glutamina como en glutamina + el compuesto secundario. El diploide obtenido de la cruce de la AL50 con la MC3 presentó el fenotipo de la cepa mutante, es decir, la mutación es dominante.

TRANSFORMACION CON EL DNA DE LA CEPA AL50.

Debido a que los resultados presentados en el inciso anterior ponen de manifiesto que la mutante AL50 tiene un fenotipo dominante, con el fin de clonar el gen alterado que confiere que algunas actividades enzimáticas no disminuyan por la presencia de glutamina en el medio de cultivo, decidimos elaborar un banco de DNA genómico de la cepa AL50. Se obtuvo DNA genómico de la cepa AL50 por gradiente de cloruro de cesio, obteniéndose alrededor de 450µg. Paralelamente, se aisló DNA del plásmido "lanzadera" (*shuttle vector*) YCp50, con el fin de utilizarlo como vehículo. Se obtuvieron 250µg.

Con este material se inició el trabajo en colaboración con el Dr. Terrance G. Cooper en el Departamento de Microbiología en la *University of Tennessee* en Memphis, Tn. Durante mi estancia en su laboratorio, se preparó el banco de DNA genómico, se amplificó y se obtuvieron finalmente 800µl de banco genómico de la mutante AL50 a una concentración de 2.4µg/µl.

Antes de preparar el banco, se hizo un estudio fenotípico con el fin de determinar si teníamos un medio de selección adecuado para efectuar la complementación. Para esto, se obtuvieron protoplastos de la cepa silvestre y se mezclaron con pequeñas cantidades de protoplastos de la cepa AL50, con el fin de ver si podíamos distinguir una cepa de la otra al sembrar en medio sólido conteniendo alantoina o prolina como única fuente de nitrógeno + 20mM de glicina, obteniéndose el resultado esperado: sobre un césped de levaduras, se apreciaban colonias aisladas, se analizó el fenotipo de algunas por curva de crecimiento que correspondieron al de la cepa AL50.

La cepa silvestre S288C no tiene marcadores apropiados para seguir un fenotipo tras la transformación, y por esto se intentó obtener una cepa auxótrofa de uracilo derivada de la cepa S288C. Intentamos tres estrategias diferentes:

i) Búsqueda de mutantes espontáneas capaces de crecer en la presencia de un compuesto que es tóxico para una cepa silvestre. Se utilizó ácido 5-fluororótico (5-FOA) que es tóxico para una célula que no sea auxótrofa de uracilo (Boeke, et.al., 1987). Se espatularon grandes cantidades de células en placas que contenían ácido 5-fluororótico como agente tóxico selectivo para la detección de mutantes *ura3⁻* espontáneas.

ii) Transformación de la cepa silvestre S288C con DNA del plásmido pMRFW2 (Rose y Winston, 1984), buscando reemplazar el gen *URA3* silvestre por recombinación con el gen mutado del plásmido, *ura3-52*, que tiene una inserción Ty en esa zona y seleccionando células transformadas en un medio que contenía 5-FOA.

iii) Transformación con DNA de pMRFW2, enriqueciendo con un agente químico (polifungina) que es tóxico para células creciendo activamente (Polaina y Conde, 1981). Así, se transformó, se crecieron las células en medio no permisivo (sin uracilo), agregando después de 6 hrs el agente N-glicosil-polifungina, que mata a las células capaces de reproducirse. Se pasó el cultivo a un medio permisivo (con uracilo), en donde las células auxótrofas de uracilo son capaces de crecer, dejándolas recuperarse por 12 hrs y se repitió el tratamiento. Se buscó seleccionar otra vez en placas conteniendo 5-FOA y tampoco se consiguió.

Esto sugiere que para la cepa S288C de *Saccharomyces cerevisiae*, el ácido 5-fluororótico no es un medio conveniente para la selección de mutantes *ura3-52*, tal vez debido a su toxicidad.

Dado que no pudimos obtener una cepa auxótrofa de uracilo derivada de la S288C, decidimos utilizar otra cepa de *Saccharomyces cerevisiae* auxótrofa de uracilo, la R757, cuyo fenotipo de alto tiempo de duplicación en un medio

líquido que contiene alantoína como única fuente de nitrógeno y glicina en una concentración 20mM era semejante al de la cepa S288C. En la figura 6 se muestran las curvas de crecimiento de las cepas S288C, R757 y AL50 crecidas en alantoína y alantoína + 20mM de glicina + los requerimientos de la cepa R757. Como se aprecia en la figura, el efecto de la glicina sobre las cepas S288C y R757 es similar:

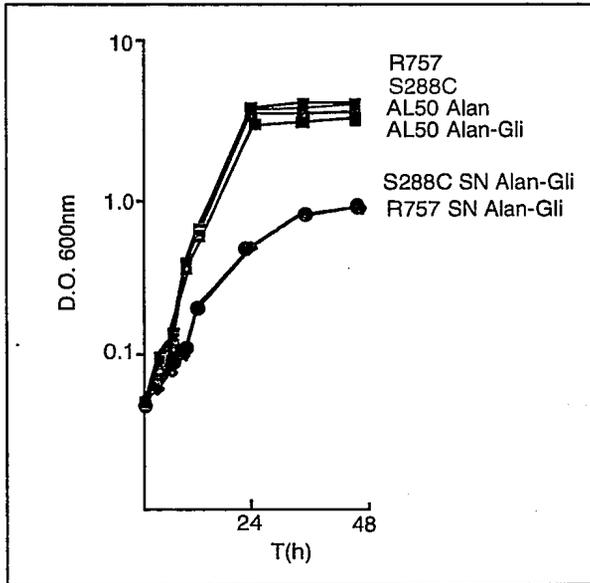


Figura 6. Curva de crecimiento de las cepas R757, S288C y AL50 en alantoína y en alantoína + glicina 20mM + Ura + His + Lis.

Así, con el fin de clonar el gen mutado, se buscó complementar el fenotipo de no crecimiento de la R757 con el banco de DNA de la cepa AL50.

Sin embargo, el poco crecimiento que logra tener la cepa R757 en alantoína + glicina 20mM impidió poder distinguir en un medio sólido a una transformante capaz de crecer con un menor tiempo de duplicación. Intentamos dos métodos de transformación y ninguno de los dos funcionó. Por esta razón, decidimos

utilizar como medio de selección de transformantes, un medio sin fuente de nitrógeno y glicina 20mM + los complementos que requiere la R757. En la figura 7 se muestra la curva de crecimiento de las cepas R757 y AL50 en este medio de cultivo.

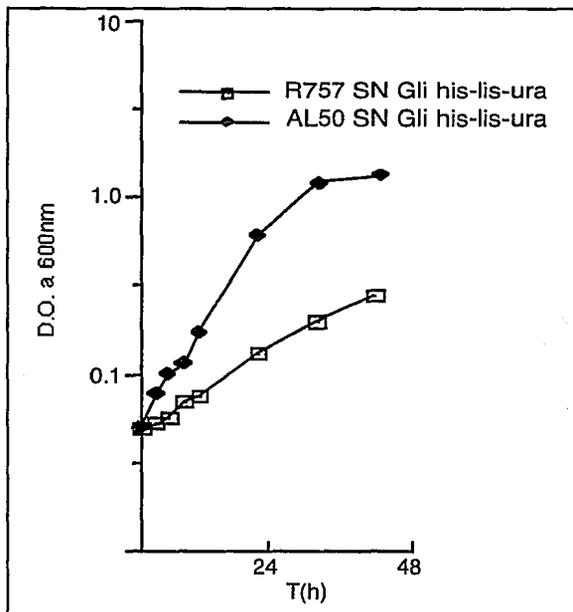


Figura 7. Curva de crecimiento de las cepas R757 y AL50 cultivadas sin fuente de nitrógeno, en presencia de glicina a una concentración de 20mM + Ura + His + Lis.

Los resultados de la curva de crecimiento en SN glicina, indicaban que la mutante AL50 era capaz de crecer lentamente en este medio, mientras que la cepa R757 no. Sin embargo, aún con este fenotipo, en las placas de transformación nunca alcanzamos a distinguir alguna colonia transformante que creciera aunque fuera ligeramente más rápido que el crecimiento basal de células sensibles a glicina. En la tabla 8 se presentan los resultados obtenidos en estas transformaciones:

Tabla 8. Transformación de la cepa R757 con el banco de DNA genómico de la mutante AL50, con el protocolo de protoplastos.

DNA	MEDIO DE SELECCION	COLONIAS POR μg DE DNA (PROMEDIO)
-	NH ₄ His Lis	0
-	SN Gli His Lis	0
YCp50	NH ₄ His Lis	5223
YCp50	SN Gli His Lis	3324
BANCO AL50	NH ₄ His Lis	5584
BANCO AL50	SN Gli His Lis	2968

Como se aprecia en la tabla 8, el número de células transformadas por microgramo de DNA es el mismo en el medio selectivo (glicina 20mM + His + Lis) sea usando el vector vacío YCp50 o el banco de DNA genómico de la AL50, por lo tanto, no fue posible distinguir entre el fenotipo silvestre y el de las colonias complementadas con la capacidad de crecer en glicina como única fuente de nitrógeno.

ANALISIS DE LA EXPRESION DE *DAL1*, *DAL5* y *GAP1* EN LAS CEPAS S288C Y AL50.

Por las actividades enzimáticas, sabíamos que la mutante AL50 presentaba actividades específicas altas al ser cultivada en presencia del metabolito inductor de la enzima, hubiera o no glutamina en el medio de

crecimiento, por lo menos en las actividades de alantoinasa y GS, no así para la de GDH-NAD y de transporte a través de la GAP.

Con el fin de analizar si la alta actividad específica de algunas enzimas en la mutante AL50 era debida a que la síntesis de éstas enzimas catabólicas no era reprimida a nivel de la expresión genética por la glutamina, decidimos realizar análisis de tipo *Northern Blot*. Se obtuvo RNA total de las cepas S288C y AL50 cultivadas utilizando alantoina o alantoina + glutamina como únicas fuentes de nitrógeno. Decidimos utilizar como sondas tres genes que ya habían sido clonados y que se sabía que su expresión es reprimida por la glutamina: *dal1*, que codifica para la enzima alantoinasa, cuya expresión depende de la presencia del inductor y cuya actividad enzimática en la cepa mutante no disminuye por la presencia simultánea del inductor y glutamina (tabla 2), *dal5*, que codifica para la permeasa del ácido alantoico, cuya expresión no depende de la presencia del inductor, pero se reprime por glutamina y *gap1*, que codifica para la permeasa general de aminoácidos, cuya actividad se reprime por la presencia de una fuente de nitrógeno primaria tanto a nivel transcripcional como a nivel de inactivación postranscripcional. En la figura 8 se muestran los resultados de los análisis de los transcritos:

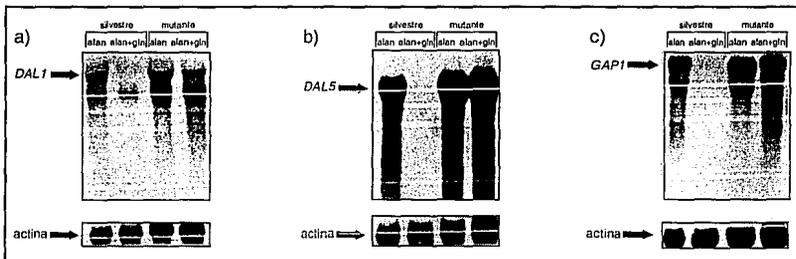


Figura 8. Efecto de la glutamina sobre la expresión de a) *dal1*, b) *dal5* y c) *gap1* en las cepas silvestre S288C y mutante AL50. La actina se usó como control interno.

Los resultados presentados en la figura 8, indican que en los tres casos la expresión en la cepa silvestre es reprimida por la presencia simultánea de glutamina y el compuesto nitrogenado secundario; en cambio, el RNA obtenido de la mutante AL50 presenta transcrito de los genes aún en la presencia de glutamina. En el caso del pánel a), se observa una banda menor, de 1.2kb, que no es regulada por glutamina. Corresponde a una secuencia (de 594 pb) con un marco abierto de lectura que está unido al fragmento del gen *dal1* y cuyo producto no ha sido identificado (Bucholz y Cooper, 1991). Con el análisis del RNA mensajero de la figura 8, demostramos que la expresión de estos genes en la cepa mutante AL50 resiste a la represión mediada por la glutamina a nivel de la transcripción.

Debido a que la glutamina tiene un papel dual en el metabolismo nitrogenado, al funcionar tanto como donadora del nitrógeno para la biosíntesis de otros compuestos, así como moduladora del catabolismo, decidimos analizar la expresión de los mismos genes en las cepas silvestre y mutante al ser cultivadas en otra fuente primaria de nitrógeno, la asparagina, cuyo único papel conocido es la modulación de la degradación de compuestos nitrogenados. Para ello, se preparó RNA total de las cepas S288C y AL50 cultivadas utilizando prolina (fuente de nitrógeno secundaria) o asparagina (fuente de nitrógeno primaria) como únicas fuentes de nitrógeno y se hibridizó contra las sondas a) *dal1*, b) *dal5* y c) *gap1* marcadas radiactivamente. Se expusieron en película autorradiográfica y los resultados se presentan en la figura 9:

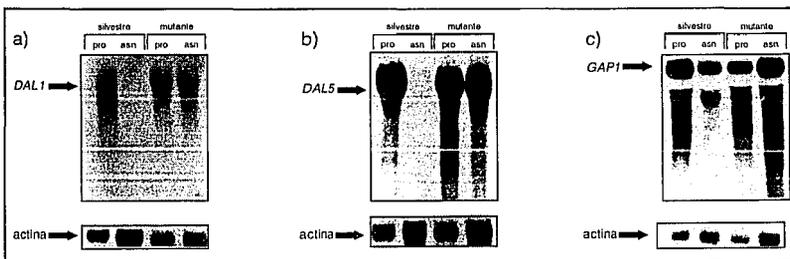


Figura 9. Efecto de la asparagina sobre la expresión de a) *dal1*, b) *dal5* y c) *gap1* en las cepas silvestre S288C y mutante AL50. La actina se usó como control interno.

Analizaremos primero los pánels a) dal1, y b) dal5. Como se aprecia, la cepa silvestre S288C presenta transcrito de ambos genes al ser cultivada en un medio que contiene como única fuente de nitrógeno prolina, dado que es un compuesto nitrogenado secundario, la síntesis de las enzimas requeridas para la degradación de este tipo de compuestos secundarios no es reprimida. En cambio, cuando la cepa silvestre se cultiva en un medio que contiene asparagina como única fuente de nitrógeno, la síntesis de estas enzimas se reprime y, por tanto, no hay transcrito de los genes probados. Por otro lado, en ambos casos la mutante AL50 presenta los transcritos aún en la presencia de asparagina.

En el caso del pánel c) el fenómeno de represión no es claro, ya que se observa transcrito de *gap1* en la cepa silvestre cultivada en asparagina como única fuente de nitrógeno. Se realizó una cuantificación por densitometría y encontramos que la expresión en asparagina de *gap1* en ambas cepas es prácticamente igual.

Finalmente, tratamos de averiguar si el efecto inhibitorio de la glicina sobre las actividades enzimáticas y el crecimiento de la cepa silvestre ocurría a nivel de la transcripción. Para ello, extrajimos RNA total de las cepas S288C y AL50 cultivadas en alantoína y en alantoína + glicina 20mM. Para nuestra sorpresa, al correr el gel de formaldehído, encontramos degradado el RNA de la cepa S288C en alantoína + glicina (esto es, no se distinguían los rRNA's). Tras este resultado, decidimos obtener RNA de la cepa silvestre y mutante en alantoína + glicina 5 y 10mM, transferirlo aunque no se vieran los rRNA's a filtro de *nylon* e hibridarlo contra actina, que es un gen que se expresa constitutivamente en la levadura, y que no es regulado por nitrógeno, ya que era posible que sólo los RNA's ribosómicos fueran más lábiles por la presencia de la glicina. En la figura 10, se muestra la fotografía de un gel de formaldehído y la placa autorradiográfica que se obtuvo tras hibridar el RNA del mismo gel transferido a filtro de *nylon*, con una sonda de actina marcada radiactivamente..

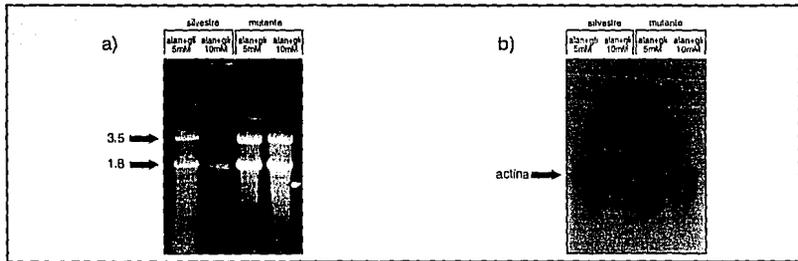


Figura 10. a) Integridad del RNA obtenido en presencia de glicina 5 y 10mM; b) autorradiografía usando como sonda actina en el mismo RNA del pánel a), en las cepas S288C y AL50.

Los resultados mostrados en la figura 10, muestran que en el caso de la cepa S288C no pudimos obtener RNA íntegro al cultivarla en alantoina + glicina 10mM; esto nos ha impedido analizar si la glicina pudiera ser también un co-represor del catabolismo. ✪

DISCUSION Y PERSPECTIVAS

En la cepa silvestre S288C, las actividades específicas de las enzimas alantoinasa, GS y GDH-NAD, así como el transporte de citrulina a través de la GAP, son inhibidos por la presencia de glutamina en el medio de cultivo (tablas 2, 3, 4 y 5). Los análisis a nivel de la expresión de los genes que codifican para la alantoinasa (*dal1*), la permeasa de alantoato (*dal5*) y la permeasa general de aminoácidos (*gap1*), mostraron que en la cepa silvestre la presencia simultánea de glutamina y una fuente de nitrógeno secundaria en el medio de cultivo se reprime la expresión de estos tres genes (figura 8), así como que en asparagina como única fuente de nitrógeno, se reprime la expresión de *dal1* y *dal5* (figura 9). Por su parte, la mutante AL50 tiene un fenotipo pleiotrópico: crece mal en algunos compuestos nitrogenados proporcionados como única fuente de nitrógeno (Segal, C. 1991), presenta actividades específicas de GS y alantoinasa que no son disminuidas por la presencia simultánea de glutamina y el metabolito inductor (tablas 2 y 3), no presenta represión sobre la síntesis de los genes *dal1*, *dal5* y *gap1*, en la presencia simultánea de una fuente de nitrógeno secundaria y glutamina (figura 8) ni de *dal1* y *dal5* en asparagina como única fuente de nitrógeno (figura 9). Estos datos nos permiten suponer que la alteración presente en la mutante AL50 podría estar a nivel de la síntesis de un producto génico que regula el catabolismo de compuestos nitrogenados en respuesta a la disponibilidad en el medio de cultivo de glutamina y asparagina, que podría ser, de acuerdo a la definición de Cooper y cols. (Daugherty, 1993) un producto génico que regula la RCN. Asimismo, es claro que el fenotipo de esta mutante es muy semejante al de las mutantes *areA^d*, ya que diferentes mutaciones alélicas en este gen de *A. nidulans* resultan en diferencias fenotípicas, como crecer bien en algunos compuestos, mal en otros, y represiones y derepresiones de algunas actividades enzimáticas (Stankovich, et al, 1985).

Como se discutió en la introducción, las mutantes en los genes reportados que regulan el catabolismo de compuestos nitrogenados en levaduras son recesivos con respecto al alelo silvestre (*gln3*, *ure2*, *dal80*). También los genes que regulan la RCN en otros microorganismos al ser mutados tienen fenotipo

recesivo (*areA* en *Aspergillus nidulans* y *nit2* en *Neurospora crassa*), debido a que ambos genes codifican para un activador de la transcripción que en las mutantes no es expresado. Sin embargo, la mutación que tiene la cepa AL50 es dominante (tablas 6 y 7), por lo que podemos suponer que el activador se sigue produciendo. Esto sugiere que en la cepa silvestre el producto podría actuar de manera positiva, expresándose constitutivamente, y activando la transcripción de genes cuya expresión es sujeta a represión; en la mutante, la afinidad de la proteína activadora por el co-represor estaría disminuida, con lo cual el activador no sería reprimido y en el diploide el fenotipo resultaría dominante.

Por otro lado, los resultados presentados en este trabajo presentan varias interrogantes: 1. Si es cierto que la mutante AL50 ya no es regulada a nivel de la transcripción por fuentes primarias de nitrógeno, ¿porqué la actividad específica de la GDH catabólica no es alta en la mutante cultivada en glutamato + glutamina (tabla 4)? 2. ¿Porqué la actividad de transporte a través de la GAP parece ser igual en las dos cepas al ser cultivadas en presencia de glutamina (tabla 5), si hay expresión de *gap1* en esas condiciones en la cepa mutante y no en la cepa silvestre (figura 8)? 3. ¿Porqué la expresión de *gap1* es diferente en la cepa silvestre al ser cultivada en presencia de glutamina o asparagina? (figuras 8 y 9)?. 4. ¿Porqué no se logró identificar colonias de la cepa silvestre transformadas capaces de crecer en un medio conteniendo glicina, donde la mutante es capaz de crecer (figuras 6 y 7), con el banco de DNA genómico de la AL50 (tabla 8)? Finalmente, 5. ¿Porqué, si la mutante fue aislada por su capacidad de crecer en presencia de glicina, parece ser resistente a RCN?. A continuación se discutirán estas observaciones:

Se ha reportado que la principal función de la GDH-NAD es la conversión del ácido glutámico en amonio (Miller y Magasanik, 1990). Así, como se aprecia en la tabla 4, en la cepa silvestre cuando los niveles de glutamato son altos y los de amonio bajos (esto es, en glutamato como única fuente de nitrógeno) la GDH-NAD se encuentra altamente activa. Por el contrario, si los niveles de glutamato son bajos y los de amonio altos (en glutamina o amonio como única fuente de nitrógeno), la actividad de la GDH-NAD es baja. ¿Podemos en este caso hablar de RCN?. Aparentemente no. El grupo del Dr.

Cooper (Daugherty, et.al., 1993) reporta el resultado de análisis sobre la expresión del gen *gdh2*: ellos encuentran transcritos de intensidad similar al cultivar a la levadura en prolina o glutamina como únicas fuentes de nitrógeno. Sin embargo, al cultivar en asparagina como fuente de nitrógeno prácticamente no encuentran transcrito de *gdh2*. Este resultado es el esperado si realmente el papel de la GDH-NAD es regular la interconversión de amonio-glutamato, ya que la asparagina es convertida en amonio en una reacción catalizada por la asparaginasa, de modo que la síntesis de GDH-NAD está siendo impedida por la presencia de amonio. Como se observa en la tabla 4, la cepa mutante AL50 tiene una actividad de GDH-NAD que es baja debido a la presencia de glutamina en el medio de cultivo. Si, como proponen Cooper y cols., la inhibición mediada por la glutamina sobre la actividad de la GDH-NAD no es a nivel de la transcripción ni, por lo tanto, represión catabólica nitrogenada, nuestra mutante AL50 (tabla 4), que estaría alterada precisamente en este nivel de regulación no es capaz de liberarse del efecto posttranscripcional que ejercería la glutamina sobre la GDH-NAD.

Asimismo, la actividad de GS cataliza la biosíntesis de glutamina. Es un hecho que esta enzima se inactiva en presencia de glutamina, pero si esta inhibición es o no a nivel de la transcripción es algo que está en controversia. Magasanik y cols. (Benjamin, et.al., 1989), reportan los resultados obtenidos analizando mRNA de células crecidas en glutamina, en glutamato y al cambiarlas en fase media exponencial de crecimiento desde glutamato a glutamina, utilizando como sonda un fragmento del gen *gln1*, Encuentran que sólo en glutamato la expresión de *gln1* es alta; en los otros dos casos, la expresión es muy pequeña y similar entre sí. Sin embargo, Cooper y cols. (Daugherty, et.al., 1993) argumentan que la glutamina podría tener un efecto sobre la expresión de *gln1* similar a la represión que se observa sobre la expresión de los genes de la biosíntesis de la vía de arginina, al adicionar arginina a un MM de cultivo (transinhibición), ya que la glutamina es el producto de la reacción mediada por la GS. Por ello, con el fin de evitar un posible papel dual de regulación por parte de la glutamina, deciden utilizar asparagina, que también es una fuente de nitrógeno primaria, como condición de RCN. Así, al analizar el mRNA de células crecidas en prolina, glutamina o asparagina como únicas fuentes de nitrógeno, encuentran que la expresión de

gln1 es equivalente en los primeros dos cultivos y sólo ligeramente menor en el último medio de cultivo. Además, la expresión de gln1 no sólo exhibe una respuesta baja a RCN sino que tampoco responde a la disrupción del gen dal80, pero sí requiere de la presencia del producto funcional de gln3. El porqué al determinar la actividad de GS en extractos de células en cultivo o bien la producción de β -galactosidasa en un plásmido que lleva la región promotora de gln1 fusionado al gen reportero lacZ en presencia de glutamina se provoca una inhibición tan fuerte como la reportada en las tablas 3, 6 y 7 de este trabajo y también por otros autores (Benjamin, et.al., 1989; Minehart, y Magasanik, 1992; Mitchell y Magasanik, 1984a; Mitchell y Magasanik, 1984b; Daugherty, et.al., 1993) es algo que no se ha logrado entender.

Por otro lado, en la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos al determinar el transporte a través de la GAP. Para determinar la actividad de transporte a través de esta permeasa, medimos el transporte de L-citrulina, ya que este compuesto sólo puede entrar a la célula a través de la GAP. Como se observa en la tabla 5, ni la cepa silvestre ni la cepa mutante son capaces de transportar citrulina en la presencia simultánea de glutamina y una fuente de nitrógeno secundaria. Sin embargo, en la figura 8 se observa que la expresión del gen gap1 de las cepas silvestre y mutante en alantoína + glutamina es completamente diferente: mientras que la cepa silvestre no presenta transcrito en esta condición, la mutante AL50 es resistente a la represión mediada por la glutamina. ¿Por qué entonces, las actividades de transporte de ambas cepas son sensibles a la glutamina? En el caso de la cepa silvestre es muy simple: no hay transcrito, no hay GAP en la membrana. Sin embargo, se sabe que la represión de la GAP mediada por amonio, glutamina y asparagina responde a dos mecanismos de control diferentes: la represión a nivel de la síntesis y la inactivación reversible de las permeasas que es, probablemente, el caso de la mutante AL50.

En las figuras 8 y 9 se presentan las autorradiografías obtenidas al realizar análisis tipo *Northern Blot* de las cepas silvestre y mutante cultivadas en medios de cultivo no represores (alantoína o prolina como fuentes de nitrógeno) y en medios de cultivo represores (alantoína + glutamina o asparagina). En ambos casos, tanto el transcrito de dal1 como el de dal5

presentan represión provocada por la fuente de nitrógeno primaria en la cepa silvestre, mientras que la mutante resiste el efecto represor mediado tanto por la glutamina como por la asparagina. Sin embargo, el caso del transcrito de *GAP1* es diferente en una y otra condición de RCN en la cepa silvestre: mientras que en presencia de glutamina no se observa transcrito (figura 8, pánel c)), en el caso del pánel c) de la figura 9 el fenómeno de represión no es claro, ya que se observa transcrito de *gap1* en la cepa silvestre cultivada en asparagina como única fuente de nitrógeno. Cooper y cols. (Daugherty, et al 1993), reportan los resultados de este mismo tipo de análisis (*Northern Blot*) con una sonda de *gap1* sobre la cepa silvestre $\Sigma 1278b$, en donde claramente se observa transcrito al crecer a la cepa en prolina y no se ve transcrito al crecerla en asparagina.

Sin embargo, la cepa S288C parece tener una GAP que es regulada de modo diferente a la manera en que es regulada en otras cepas silvestres de *Saccharomyces cerevisiae*. En un análisis sobre la GAP de diferentes cepas silvestres (Rytka, 1975) se presenta un experimento de transporte de un D-aminoácido, que sólo puede penetrar al interior de la célula a través de la GAP, la D-serina, utilizando como medio de cultivo L-prolina, en tres diferentes cepas: la S288C, la $\Sigma 1278b$ y la JR211, encontrando que en las tres se transporta D-serina con la misma eficiencia. Sin embargo, al realizar el mismo experimento, pero con células cultivadas en sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno, las cepas $\Sigma 1278b$ y JR211 reprimen su actividad de transporte del D-aminoácido a través de la GAP, en cambio en la cepa S288C no se observa tal represión, indicando que esta cepa silvestre, a diferencia de las otras, no regula su GAP por la disponibilidad de amonio. Por otro lado, se ha reportado que al mutar un gen denominado *per1*, se previene la inactivación de la GAP por amonio, sin alterar la inactivación mediada por la glutamina o el glutamato (Courchesne y Magasanik, 1983). Se ha sugerido que el gen *per1*, reportado en la cepa silvestre $\Sigma 1278b$, que es la que utilizan los grupos belgas y algunos grupos de Estados Unidos, no está presente en otras cepas silvestres de *Saccharomyces cerevisiae* (Magasanik, 1992). Este parece ser el caso de la cepa S288C, y es probablemente por esto, que su GAP no es reprimida por asparagina.

Por otro lado, se cruzó la cepa mutante con el fin de realizar el análisis de segregación y demostrar que la mutación en la cepa AL50 fuera monogénica. Se obtuvieron suficientes tétradas para hacer el análisis, sin embargo, una vez disectadas no logré que las esporas germinaran. Paralelamente se hizo la disección de tétradas de diploides esporulados, productos de la cruce entre dos cepas con marcadores conocidos, para ver si no era durante la manipulación que las esporas perdían su viabilidad, pero estas esporas sí germinaron, por lo que aparentemente, no era debido al tratamiento que yo utilicé que nunca obtuve esporas viables del diploide d50-8b. Cabe la posibilidad que la alteración presente en la cepa AL50 sea producto de dos mutaciones que no pueden ser segregadas, ya que por sí solas son letales, o bien, que se genere un producto difusible que resulte tóxico para las esporas. En el laboratorio, se ha continuado intentando la disección de estas tétradas y ya se ha logrado obtener algunas en las que sólo dos de las esporas han germinado, lo que podría indicar que la mutante tiene también un defecto en la esporulación (A. González, comunicación personal).

Finalmente, el medio de selección de las transformaciones con el DNA de la mutante AL50, buscando identificar células capaces de crecer en presencia de glicina 20mM, no funcionó, a pesar de que las curvas de crecimiento muestran diferencias claramente distinguibles entre la cepa que usamos como receptora (la R757) y la mutante AL50 (figuras 6 y 7). Sin embargo, el fenotipo de poco crecimiento en medio líquido no es tan claro en medio sólido, ya que después de varios días de incubación en placas conteniendo glicina 20mM, tanto la cepa S288C como la R757 son capaces de formar pequeñas colonias. Sin embargo, la mutante AL50 es capaz de formar colonias un poco más rápido (aunque igual de pequeñas) y creímos que esta diferencia iba a ser suficiente como para distinguir, tras transformar con el DNA de la mutante a la S288C o a la R757, colonias que tuvieran la capacidad de crecer más rápido en un medio conteniendo glicina. Tras ser transformada, la célula debe de regenerar su pared y al mismo tiempo expresar el DNA que recibió. Es posible que esta adaptación tome tanto tiempo como el que toma a las células que no fueron transformadas con la resistencia a glicina, crecer en este medio sólido de cultivo. Debido a esta carencia de un fenotipo claramente complementable, será necesario utilizar técnicas de biología molecular para la clonación del gen

involucrado en la resistencia a RCN. Una posibilidad es construir una fusión con un gen reportero, como β -galactosidasa, bajo el control del promotor de, alguno de los genes que se sabe son reprimidos por RCN, como *dal5*, transformando con el banco de la cepa mutante y seleccionando aquellas células capaces de sintetizar esta proteína reportera en presencia de glutamina. Otra posibilidad es construir un banco de cDNA a partir de mRNA obtenido de la cepa AL50 cultivada en presencia de glutamina y utilizar la secuencia que codifica para el activador AREA para hacer un tamizado. Si el activador de *Aspergillus* y el codificado por la mutante AL50 son similares, será posible identificar clones positivas.

Una vez que el gen alterado en la mutante AL50 sea clonado, será posible localizar el gen que confiere la resistencia a glutamina, asparagina y glicina en la cepa silvestre. Así, se podrá obtener su secuencia nucleotídica y deducir la secuencia de la proteína para la que codificaría. Será interesante conocer si tiene dominios de "dedos de zinc" del tipo que presentan las proteínas GLN3, DAL80, AREA y NIT2, u otros dominios conocidos de unión a DNA y analizar la similitud entre la proteína obtenida y la de estos reguladores. Asimismo, se podría buscar complementar a las mutantes de estos genes reguladores en los tres hongos. Por otro lado, se podrá obtener una mutante *null*, por interrupción o por reemplazo genético, que permitirá estudiar el fenotipo de una mutante que no tiene la proteína. En este caso, es de esperarse que el fenotipo de un diploide obtenido de la cruce entre la cepa sin el gen y la silvestre será recesivo, como son las mutantes en *areA* y *nit2* de *A. nidulans* y *N. crassa*. También será interesante sobre-expresar la proteína que codifica al activador, para ver si la acción del co-represor depende de la dosis y estudiar el fenotipo que la presencia de un activador del catabolismo de compuestos nitrogenados tiene sobre el crecimiento y la actividad metabólica de la levadura. Este tipo de experimentos se podrían realizar utilizando como vector un plásmido multicopia, o bien, mejor, construyendo un vector que contenga un promotor inducible titulable, que controle la expresión del activador que hemos identificado.

Con el fin de estudiar también el papel que pudiera tener este activador en el ciclo celular, se podrá realizar análisis de RNA en antisentido, expresado

bajo el control de un promotor inducible, en los diferentes estadios del ciclo celular.

Estos son sólo un bosquejo de todos los análisis que se podrían realizar si se tuviera el gen responsable del fenómeno que se ha descrito en esta tesis. El realizar estos y otros análisis, permitirán incrementar la comprensión de la regulación del circuito nitrogenado en *Saccharomyces cerevisiae*.

Ahora bien, obtener una mutante resistente a la regulación mediada por la glutamina no había sido posible porque la misma glutamina es en sí una excelente fuente de nitrógeno. ¿Qué papel pudiera jugar la glicina, que nos permitió aislar una mutante resistente a la represión mediada por la glutamina? La GS, que es la enzima que cataliza la biosíntesis de glutamina a partir de glutamato y amonio, es inhibida *in vitro* por glutamina, por amonio (Mitchell y Magasanik, 1984) por glicina y por serina (Kapoor y Bray, 1968, en *Neurospora crassa*). Asimismo, se ha reportado que en la cepa silvestre de *Neurospora crassa* la glicina no tiene ningún efecto sobre el crecimiento ni sobre la actividad aparente de GS *in vivo*. Sin embargo, una mutante parcialmente auxótrofa de glutamina tiene una actividad específica de GS sensible *in vivo* a la presencia de glicina, y un tiempo de duplicación que aumenta en un medio de cultivo conteniendo glutamato + glicina. Observan que en estas condiciones, la síntesis de glutamina disminuye 100 veces, aunque el contenido intracelular de este aminoácido no se depleta, y se induce la síntesis de una de las isoformas de la GS, por lo que proponen que es la actividad de GS, más que el contenido de glutamina, el importante para el crecimiento óptimo, por lo que sugieren que la glicina regula reduciendo el transporte de glutamina al interior de la célula y activando la síntesis de los monómeros β de la isoforma octamérica de la GS que tiene mayor actividad en este hongo (Hernández, et al, 1986).

En cambio, la glicina sí tiene un efecto sobre el crecimiento y sobre la actividad de GDH-NAD de una cepa silvestre de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada en un medio conteniendo glutamato como única fuente de nitrógeno y glicina 50mM, en donde ambos metabolitos se acumulan (Guerrero, S., 1988); también sobre el crecimiento de la cepa silvestre en la presencia simultánea de glicina 20mM y al menos quince compuestos nitrogenados que pueden ser

única fuente de nitrógeno para la levadura y sobre la actividad específica de, al menos, la enzima alantoinasa en un cultivo conteniendo alantoína o urea + glicina 20mM. La actividad de GS es inhibida *in vitro* (Segal, C., 1991), pero no lo es en extractos de células cultivadas en glutamato + glicina (Segal y González, observaciones no publicadas). La mutante AL50 fue aislada por su capacidad de crecer rápidamente en un medio en el que la cepa silvestre crece 4-5 veces más lento: alantoína + glicina 20mM. Todas estas observaciones sugieren que la glicina podría tener un papel regulatorio, que en *Saccharomyces* no hemos logrado identificar. Por los datos presentados en este trabajo, podemos especular que es posible que la glicina actúe sobre la represión catabólica como lo hace la glutamina. Sin embargo, no hemos logrado obtener preparaciones de RNA que nos permitan analizar si la glicina reprime a nivel de la síntesis de las enzimas cuya actividad inhibe (figura 10). De ser así, el enfoque experimental de obtener mutantes resistentes a la inhibición del crecimiento provocado por la glicina, que presentan un fenotipo pleiotrópico, podría conducir a entender mejor el fenómeno de la represión catabólica nitrogenada. *

CONCLUSION

Las actividades específicas de algunas enzimas reguladas por represión catabólica nitrogenada disminuyen por la presencia simultánea de glutamina y una fuente de nitrógeno secundaria en la cepa silvestre S288C. Esta disminución es reflejo de la represión a nivel de la expresión de los genes que las codifican. De la misma manera, la asparagina reprime a nivel de la expresión a las enzimas necesarias para la degradación de compuestos nitrogenados secundarios. La mutante AL50 resiste a esta inhibición a nivel enzimático como resultado de ser resistente a la represión a nivel de la transcripción, de, al menos, los genes que codifican para la alantoinasa (*DAL1*), la permeasa de alantoato (*DAL5*) y la permeasa general de aminoácidos (*GAP1*). ❁

REFERENCIAS

- André, B. and J.C. Jauniaux.** 1990. Nucleotide sequence of the yeast *UGA1* gene encoding GABA transaminase. *Nucleic Acid Res.* **18**: 3049.
- Arst, H.N. and C. Scazzocchio.** 1985. Formal genetics and molecular biology of the control gene expression in *Aspergillus nidulans*. In *Gene Manipulations in Fungi*. Academic Press, Inc.
- Benjamin, P.M., J.I. Wu, A.P. Mitchell and B. Magasanik.** 1989. Three regulatory systems control expression of glutamine synthetase in *Saccharomyces cerevisiae* at the level of transcription. *Mol. Gen. Genet.* **217**: 370-377.
- Boeke, J.D., F. LaCroute and G.R. Fink.** 1987. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoroorotic acid and resistance. *Mol. Gen. Genet.* **197**: 345-346.
- Brandriss M.C.** 1987. Evidence for positive regulation of the proline utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **117**: 429-435.
- Bucholz, R.G. and T.G. Cooper.** 1991. The allantoinase (*DAL1*) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**: 913-923.
- Chiang, T.Y. and G.A. Marzluf.** 1994. DNA recognition by the *NIT2* nitrogen regulatory protein: Importance of the number, spacing, and orientation of GATA core elements and their flanking sequences upon *NIT2* binding. *Biochemistry* **33**: 576-582.
- Chisholm, G. and T.G. Cooper.** 1982. Isolation and characterization of mutants that produce the allantoin-degrading enzymes constitutively in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **2**: 1088-1095.
- Cooper, T.G.** 1982. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In J.N. Strathern, E.W. Jones and J.R. Broach (ed.), *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: metabolism and gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Cooper, T.G. and R.A. Sumrada.** 1983. What is the function of nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*?. *J. Bact.* **155**: 623-627.
- Coornaert, D., S. Vissers, B. André, and M. Grenson.** 1992. The *UGA43* negative regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* contains both a GATA-1 type zinc finger and a putative leucine zipper. *Curr. Genet.* **21**: 301-307.
- Coshigano, P.W. and B. Magasanik.** 1991. The *URE2* gene product of *Saccharomyces cerevisiae* plays an important role in the cellular response to the nitrogen source and has homology to glutathione S-transferases. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 822-832.

- Coshigano, P.W., S.M. Miller and B. Magasanik.** 1991. Physiological and genetic analysis of the carbon regulation of the NAD-dependent glutamate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11: 4455-4562.
- Courchesne, W.E. and B. Magasanik.** 1983. Ammonia regulation of amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 3: 672-683.
- Courchesne, W.E. and B. Magasanik.** 1988. Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*: role of the *URE2* and *GLN3* genes. *J. Bact.* 170: 708-713.
- Culbertson, M.R. and S.A. Henry.** 1975. *Genetics* 80: 23-30.
- Cunningham, T.S. and T.G. Cooper.** 1991. Expression of the *DAL80* gene, whose product is homologous to the GATA factor and is negative regulator of multiple nitrogen catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, is sensitive to nitrogen catabolic repression. *Mol. Cell. Biol.* 11: 6205-6215.
- Cunningham, T.S. and T.G. Cooper.** 1993. The *Saccharomyces cerevisiae* *DAL80* repressor protein binds to multiple copies of GATAA-containing sequences (*URS*_{GATA}). *J. Bact.* 175:5815-5861.
- Daugherty, J.R.** 1992. Role of the yeast GATA element, *UAS*_{NTR}, in activation and repression of nitrogen catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Ph.D Thesis. The University of Tennessee, Memphis, Tn.
- Daugherty, J.R., R. Rai, H. El-Berry and T.G. Cooper.** 1993. Regulatory circuit responses of nitrogen catabolic gene expression to the *GLN3* and *DAL80* proteins and nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.* 175: 64-73.
- Davis, M.A. and M.J. Hynes.** 1987. Complementation of *areA*⁻ regulatory gene mutations of *Aspergillus nidulans* by the heterologous regulatory gene *nit-2* of *Neurospora crassa*. *PNAS* 84: 3753-3757.
- Dorrington, R.A. and T.G. Cooper.** 1993. The *DAL82* protein of *Saccharomyces cerevisiae* binds to the *DAL* upstream induction sequence (*UIS*). *Nucleic Acid Res.* 21: 3777-3784.
- Drillien, R., M. Aigle and F. Lacroute.** (1973). Yeast mutants pleiotropically impaired in the regulation of the two glutamate dehydrogenases. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 53: 367-372.
- El-Berry, H. M., M.L. Majumdar, T.S. Cunningham, R. Sumrada and T.G. Cooper.** 1993. Regulation of the urea active transporter gene (*DUR3*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.* 175: 4688-4698.
- Ferguson, A.R. and A.P. Sims.** (1974). *J. Gen. Microbiol.* 80: 23-30.

- Fu Y.H. and G.A. Marzluf.** 1990. *nit-2*, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a sequence-specific DNA-binding protein. PNAS 87: 5331-5335.
- Gaber, R.F., C.A. Styles and G.R. Fink.** 1988. *TRK1* encodes a plasma membrane required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 8: 2848-2859.
- Genbaurffe, F.S. and T.G. Cooper.** 1986. Induction and repression of the urea amidolyase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 6: 3954-3964.
- González, A., L. Rodríguez, J. Folch, M. Soberón and H. Olivera.** 1987. Coordinated regulation of ammonium assimilation and carbon catabolism by glioxilate in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 133: 2497-2501.
- Grenson, M.** 1983. Study of the positive control of the general amino acid permease and other ammonia sensitive uptake systems by the product of the *NPR1* gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 133: 141.
- Grenson, M. and E. Dubois.** 1982. Pleiotropic deficiency in nitrogen-uptake systems and derepression of nitrogen catabolic enzymes in *npr-1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 121: 643-647.
- Grenson, M., F. Muyldermans, K. Broman and S. Vissers.** 1987. 4-aminobutyric acid (GABA) uptake in baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by the general amino acid permease, the proline permease and a GABA-specific permease integrated into the GABA-catabolic pathway. Life Sci. Adv. Ser. C. 6: 35-39.
- Guerrero, S.** 1988. Regulación de la degradación del ácido glutámico por glicina en *S. cerevisiae*. Tesis de Licenciatura. UACPyP-CCH. UNAM.
- Hernández, G., Y. Mora and J. Mora.** 1986. Regulation of glutamine synthesis by glycine and serine in *Neurospora crassa*. J. Bact. 165: 133-138.
- Hinnen, A., J.B. Hicks and G.R. Fink** (1978). Transformation of yeast. PNAS 75: 1929-1933.
- Ito, H., K. Fukuda and A. Kimura.** (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J. Bacteriol. 153: 163-168.
- Jauniaux, J. and M. Grenson.** 1990. *GAP1*, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*: nucleotide sequence, protein similarity with other baker's yeast amino acid permeases and nitrogen catabolite repression. Eur. J. Biochem. 190: 39-44.
- Kapoor M. and D. Bray.** 1968. Feedback inhibition of glutamine synthetase

of *Neurospora crassa* by nicotinamide adenine dinucleotides. Biochem. Biophys. Res. Commun. 96: 1688-1694.

Large, P.J. 1986. Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. YEAST 2: 1-34.

Lee K.W. and A.H. Roush. (1954). Allantoinase assays and their applications to yeast and soybean allantoinases. Arch. Biochem. Biophys. 108: 460-467.

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.

Magasanik, B. 1992. Regulation of nitrogen utilization. In The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: Gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Marzluf, G.A. 1993. Regulation of sulfur and nitrogen metabolism in filamentous fungi. Annu. Rev. Microbiol. 42: 31-55.

Marzluf, G.A., K.G. Perrine and B.H. Nahm. 1985. Genetic regulation of nitrogen metabolism in *Neurospora crassa*. In Molecular Genetics of Filamentous Fungi. Timberlake W.E. and Liss A.R. Eds. New York. Chap. 4: 83-98.

Marzluf, G.A. and Y.H. Fu. 1988. Genetic and metabolic regulation of nitrogen metabolism in *Neurospora crassa*. In Nitrogen Source Control of Microbial Processes. Sergio Sánchez-Ezquivel, Ed., CRC Press, Inc.

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

Miller, S.M. and B. Magasanik. 1991. Role of the complex upstream region of the *GDH2* gene in nitrogen regulation of the NAD-linked glutamate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 11: 6229-6247.

Minehart, P.L. and B. Magasanik. 1991. Sequence and expression of *GLN3*, a positive nitrogen regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. Mol. Cell. Biol. 11: 6216-6228.

Minehart, P.L. and B. Magasanik. 1992. Sequence of the *GLN1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: role of the upstream region in regulation of glutamine synthetase expression. J. Bact. 174: 1828-1836.

Mitchell, A.P. 1985. The *GLN1* locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes glutamine synthetase. Genetics 111: 243-258.

Mitchell, A.P. and B. Magasanik. 1984a. Biochemical and physiological

aspects of glutamine synthetase inactivation in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 4: 2758-2766.

Mitchell, A.P. and B. Magasanik. 1984b. Three regulatory systems control production of glutamine synthetase in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 4: 2767-2773.

Polaina and Conde. 1981. Use of the polyene antibiotic N-glycosyl-polyfungin in counterscreening yeast mutants. Mutation Res. 91: 111-114.

Rai, R., F.S. Genbauffe, R.A. Sumrada and T.G. Cooper. 1989. Identification of sequences responsible for transcriptional activation of the allantoin permease gene in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 9: 602-608.

Rose, M. and F. Winston. 1984. MGG 193:557.

Rytka, J. 1975. Positive selection of general amino acid permease mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bact. 121: 562-570.

Segal, C. 1991. Regulación del catabolismo de compuestos nitrogenados en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Licenciatura. UACPyP-CCH, UNAM.

Sheiness, D. and D. Sullivan. (1986). Staining of RNA in formaldehyde gels. FOCUS 8:11-15.

Siddiqui, A.H. and M.C. Brandriss. 1989. The *Saccharomyces cerevisiae* *PUT3* activator protein associates with proline-specific upstream activation sequences. Mol. Cell. Biol. 9: 4706-4712.

Stankovich, M. A. Platt, M.X. Caddick, T. Langdom, P.M. Shaffer and H.N. Arst. 1993. C-terminal truncation of the transcriptional activator encoded by *areA* in *Aspergillus nidulans* results in both loss-of-function and gain-of-function phenotypes. Mol. Microbiol. 7: 81-87.

Sumrada, R.A. and T.G. Cooper. 1974. Oxaluric acid: a non-metabolizable inducer of the allantoin degradative enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bact. 117: 1240-1247.

Thomas, P.S. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. PNAS 77: 5201-5205.

Tomsett, A.B., N. Dunn-Coleman and R.H. Garret. 1981. The regulation of nitrate assimilation in *Neurospora crassa*. The isolation and genetic analysis of *nmr-1* mutants. MGG 189: 229-233.

Wang, S.S. and M.C. Brandriss. 1987. Proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: sequence, regulation and mitochondrial localization of the *PUT1* gene product. Mol. Cell. Biol. 7: 4431-4440.

Whitney, P.A. and B. Magasanik. 1973. The induction of arginase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 248: 6197-6202.

Yoo, H.S. and T.G. Cooper. 1989. The *DAL7* promoter consists of multiple elements that cooperatively mediate regulation of the gene's expression. *Mol. Cell. Biol.* 9: 3231-3243.

Yoo, H.S. and T.G. Cooper. 1991. The ureidoglycolate hydrolase (*DAL3*) gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7: 693-698.

Yoo, H.S., F.S. Genbauffe and T.G. Cooper. 1985. Identification of the ureidoglycolate hydrolase gene in the *DAL* gene cluster of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 5: 2279-2288.

Young, J.L., G. Jarai, Y.H. Fu and G.A. Marzluf. 1990. Nucleotide sequence and analysis of *NMR*, a negative acting regulatory gene in the nitrogen circuit of *Neurospora crassa*. *MGG* 222: 120-128. *



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UACPYP-CCH

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN