

CFN.3
7L
1986



Universidad Nacional Autónoma de México

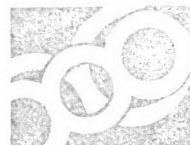
Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de
Posgrado del C.C.H.

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno

PAPEL DE LA GLUTAMATO SINTASA EN

Saccharomyces cerevisiae

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE
FIJACION DE NITROGENO



U. N. A. M.
BIBLIOTECA

T E S I S

Que para obtener el Título de
LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

p r e s e n t a

JORGE LUIS FOLCH MALLOL

México, D. F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAPEL DE LA GLUTAMATO SINTASA EN

S. cerevisiae

JORGE LUIS FOLCH MALLOL

A MIS PADRES, POR TODAS LAS OPORTUNIDADES QUE ME HAN DADO

A MIS ABUELOS

A MAITE POR SER A.T.M,

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Alicia González por todo el empeño y entusiasmo que ha puesto en la realización de este trabajo.

A la Dra. Aurora Brunner por la ayuda prestada para la elaboración de esta tesis.

INTRODUCCION

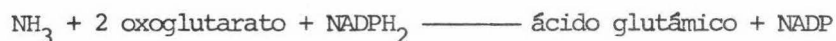
El nitrógeno es un elemento que forma parte de muchos compuestos simples y de casi todas las macromoléculas complejas de los seres vivos; especialmente de las proteínas y de los ácidos nucleicos.

Los microorganismos pueden utilizar una gran variedad de moléculas nitrogenadas como únicas fuentes de nitrógeno celular. El amonio, el ácido glutámico y la glutamina son las mejores fuentes de nitrógeno; sin embargo, algunos otros metabolitos constituyen fuentes de nitrógeno secundarias, entre ellas se encuentran; los nitratos y nitritos, las purinas, las proteínas y muchos aminoácidos. El uso de estos compuestos, supone la síntesis o activación de enzimas catabólicas, y dá como resultado la síntesis del ácido glutámico y la glutamina, intermediarios metabólicos, que distribuyen su nitrógeno en la síntesis de aminoácidos, aminoazúcares, vitaminas, purinas y pirimidinas, compuestos que a su vez participan en la síntesis de macromoléculas.

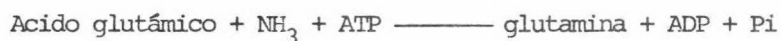
I. Asimilación de Amonio en Microorganismos Eucariotes:

En eucariotes sencillos como *Neurospora*, *Aspergillus* y *Candida* el amonio proveniente del catabolismo de

compuestos nitrogenados o el presente en el medio de cultivo es asimilado principalmente, a través de la deshidrogenasa glutámica biosintética NADPH-dependiente (GDH-NADP) (1, 2). La reacción catalizada por esta enzima, es una aminación reductiva del ácido α -cetoglutámico:



El ácido glutámico en presencia de amonio y ATP es convertido en glutamina en una reacción catalizada por la enzima glutamino sintetasa (GS).



En los microorganismos existen por lo tanto, dos enzimas capaces de asimilar el amonio: la GDH-NADP y la GS.

Durante mucho tiempo, se consideró que la GDH era la única enzima responsable de la síntesis de ácido glutámico; sin embargo, en 1970, Tempest y col (3), describieron en *Aerobacter aerogenes*, la existencia de una enzima denominada glutamato sintasa (GOGAT), que junto con la GS constituía una ruta alterna para la síntesis de ácido glutámico. Así, la GDH-NADP, la GS y la GOGAT, constituyen dos diferentes vías para la asimi

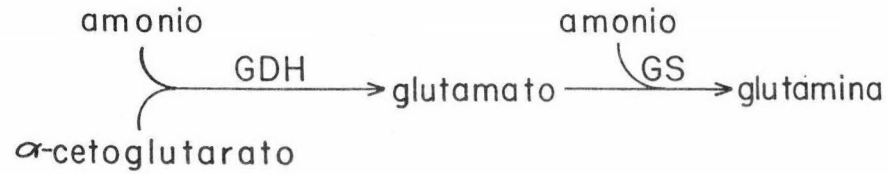
lación de amonio y la síntesis de ácido glutámico (Fig. 1). En algunos microorganismos, la GOGAT proporciona el único mecanismo para la síntesis de glutámico (4).

En algunos microorganismos, se ha encontrado, que la vía GS-GOGAT opera en condiciones en las que la concentración de amonio es limitante, mientras que la vía GDH-GS, juega un papel importante en la asimilación de amonio, cuando esta molécula se encuentra en exceso (5). En *Neurospora crassa*, Hummelt y Mora (6, 7), han demostrado, que mutantes carentes de GDH-NADP, sintetizan glutámico por la vía GS-GOGAT. Por otro lado, en este mismo microorganismo, se ha encontrado, que la GOGAT juega un papel importante en la distribución del nitrógeno de glutamina (8). También se ha sugerido que esta enzima juega un papel estabilizador cuando la asimilación se lleva a cabo en exceso de este compuesto, amortiguando fluctuaciones en las pozas de ácido glutámico y glutamina (9).

II. Regulación de la Asimilación de Amonio:

En *Aspergillus nidulans*, los niveles de GDH-NADP, son elevados en presencia de amonio y bajos en presencia de ácido glutámico (2). En algunos organismos, esta enzima se inactiva cuando los organismos se culti-

A. Via GDH-GS



B. Via GS-GOGAT

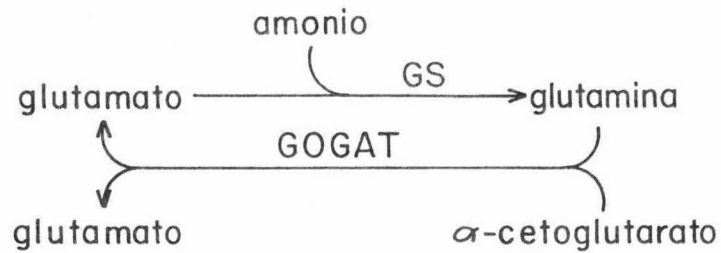


Fig. 1.- Vías de asimilación de amonio en microorganismos.

van en ausencia de una buena fuente de carbono (10, 11). En *N. crassa* la actividad de GDH-NADP, es tres veces más alta en nitrato y amonio que en ácido glutámico o glutamina, esta actividad corresponde a concentración de enzima sintetizada *de novo* (12).

La regulación de GOGAT ha sido estudiada en muy pocos organismos. En *N. crassa*, se ha hecho un estudio cuidadoso sobre la regulación de la expresión de esta enzima. Al cultivar este hongo en diferentes fuentes de nitrógeno, se encontró, que la actividad más alta de esta enzima se presenta cuando este organismo se cultiva bajo condiciones limitantes de amonio o en nitrato; encontrándose una actividad 4 veces menor en exceso de amonio presenta una actividad de GOGAT muy baja, y una mutante carente de GOGAT presenta un retraso para crecer en cultivos limitados alimentados de amonio, se ha propuesto que la GOGAT funciona proporcionando el ácido glutámico cuando el amonio se encuentra en bajas concentraciones (6, 7).

En *N. crassa*, *A. nidulans* y *C. utilis*, la actividad de la glutamino sintetasa es mínima cuando estos organismos se cultivan en amonio, urea, glutamato y amonio o glutamina y es máxima cuando el crecimiento se lleva a cabo en presencia de ácido glutámico como única

fuelle de nitr6geno (13, 14). En *N. crassa* se ha encontrado que estos cambios corresponden a cambios en los niveles de RNA mensajero (15).

La glutamino sintetasa de *N. crassa* ha sido purificada a homogeneidad (16). Esta enzima puede encontrarse en dos estados oligom6ricos diferentes, que se organizan a partir de dos tipos diferentes de mon6meros. Cuando el hongo se cultiva en concentraciones limitantes de amonio, el olig6mero predominante es un tetr6mero compuesto primordialmente por mon6meros α (17) mientras que en exceso de amonio se encuentra un oct6mero estructurado fundamentalmente por mon6meros β (18). El hecho de que la glutamino sintetasa posea estas posibilidades estructurales, da a este sistema una gran plasticidad, que podrfa sugerir el que cada uno de los olig6meros tuviera un papel diferente durante la asimilaci6n de amonio en asociaci6n con la GDH-NADP o con la GOGAT. Se ha propuesto, que cuando *N. crassa* crece exponencialmente en exceso de amonio, 6ste es fijado por la GDH y la GS octam6rica (18). Mientras que en limitaci6n de amonio participarfan la GS tetram6rica y la la GOGAT (18).

La GS de una gran variedad de microorganismos, -

está sujeta a retroinhibición por varios metabolitos - entre los que se incluyen algunos aminoácidos. La GS - de *Anabaena cylindrica* es inhibida por concentraciones fisiológicas de glicina y alanina lo que sugiere que - estos aminoácidos pudieran estar regulando la activi--dad de esta enzima in vivo. (20). Kapoor, ha reportado que la GS de *N. crassa* se inhibe in vitro por glicina - serina y alanina (21). Recientemente, Hernández y col. han hecho un estudio muy cuidadoso, acerca del papel de la regulación de la GS por estos aminoácidos in vivo - (19).

Por otro lado, Hernández y col. han encontrado - que la utilización de glucosa disminuye cuando se inhi--be a la glutamino sintetasa. Estos autores han propues--to que existe una regulación coordinada entre la utili--zación de carbono y nitrógeno y que ésta se logra sen--sando los flujos de carbono y nitrógeno por medio de la glutamino sintetasa (19).

III. Asimilación de Amonio en *S. cerevisiae*.

Como se mencionó anteriormente, la asimilación de amonio es un proceso mediante el cual el amonio es in--corporado a esqueletos de carbono; la síntesis de ácido glutámico y glutamina son el resultado de este proceso.

Al igual que en otros microorganismos, en *S. cerevisiae* la interconversión del ácido glutámico y el amonio es catalizada por dos enzimas: la deshidrogenasa glutámica biosintética (GDH-NADP) (1) y la deshidrogenasa glutámica catabólica (GDH-NAD) (2):



La enzima dependiente de NAD, se eleva cuando la levadura se cultiva en presencia de ácido glutámico como fuente de nitrógeno y disminuye cuando se utiliza amonio. Estos datos sugieren que esta enzima juega un papel catabólico (22). Por otro lado, la actividad de la enzima dependiente de NADP es mayor en presencia de amonio y disminuye cuando el glutámico es la única fuente de nitrógeno (22); por lo cual se le ha asignado un papel biosintético.

Cuando la levadura se de priva de glucosa, la actividad de GDH-NADP disminuye: esta disminución se previene agregando dinitrofenol, iodoacetato, azida o cicloheximida (23). Si se agrega glucosa a las células privadas la actividad reaparece; esta reaparición se impide si se agrega glucosa y cicloheximida simultáneamente (23). Estos datos señalan la pérdida de esta - -

actividad se debe a una degradación de la enzima. Aún más, Mazon y col. (23) han demostrado que esta degradación es específica. Otros estudios han señalado que la GDH-NADP no se induce en mutantes que presentan una alteración en la aconitasa y que por lo tanto no sintetizan α -cetoglutarato (24); esto sugiere que el α -cetoglutarato o algún otro intermediario del ciclo de Krebs - modulan la actividad de esta enzima (24).

Se han aislado diferentes tipos de mutantes que - alteraciones en las actividades de GDH-NAD y GDH-NADP. El primer tipo fue aislado por Lacroute (25) y está - - constituido por mutantes que carecen o presentan alteraciones de la GDH-NADP. Dadas las características de - esta mutante, se ha considerado que están alteradas en el gene estructural de la GDH-NADP y a este locus se le ha denominado *gdh1* (25). Aún cuando estas mutantes carecen de la actividad de GDH-NADP, son capaces de crecer en amonio como única fuente de nitrógeno con un - - tiempo de duplicación 2,5 veces mayor que el de la cepa silvestre (25). Se han utilizado dos diferentes enfoques para dilucidar cuál es la vía metabólica que permite este crecimiento. Por un lado, Grenson y col. (26) han sugerido que el crecimiento residual se debe a la - operación de la GDH-NAD. Sin embargo, no se han logrado

do aislar mutantes que carezcan de esta actividad. Otro tipo de mutantes aisladas se han denominado *gdh CR* que son alélicas a las *URE2* y que resultan en una disminución de la actividad de *GDH-NADP* pero que tienen niveles de 130 a 150 veces más de la *GDH-NAD* en presencia de amonio como única fuente de nitrógeno.

Las mutantes *gdh CS* afectadas en el locus *NGL3*, presentan una actividad muy baja de *GDH-NAD* aún cuando crezcan en glutámico como única fuente de nitrógeno (27).

En *S. cerevisiae*, los niveles de la glutamino sintetasa están regulados por la naturaleza y cantidad de la fuente de nitrógeno en las que se cultiva a esta levadura (28). Estos niveles pueden variar hasta 150 veces y se han aislado mutantes alteradas en el gene estructural de esta enzima (*gln 1*) y mutantes incapaces de desreprimir la síntesis de esta enzima (29).

Al igual que en *N. crassa*, se ha encontrado que la actividad de *GS* de *S. cerevisiae* es alta cuando el microorganismo se cultiva en ácido glutámico como fuente de nitrógeno, intermedia cuando se cultiva en amonio y baja cuando la glutamina se usa como única fuente de nitrógeno (17, 28). La actividad de la *GS* de *S. cerevi*

siae también se regula a nivel de síntesis (30) y a nivel de la actividad por un sistema de inactivación - irreversiblemente, probablemente proteolítico (30, 31).

En *Saccharomyces cerevisiae* se ha reportado la existencia de la actividad de glutamato sintasa (GOGAT). Esta enzima ha sido purificada a homogeneidad por el grupo de Roon y col. (32). Se sabe que la GOGAT de *S. cerevisiae* consta de dos polipéptidos de alto peso molecular; su K_m por NADH, glutamina y α -cetoglutarato es de 2.6 μ M, 1.0 mM, y 140 μ M respectivamente. Su pH óptimo está entre 7.1 y 7.7 (32).

Como se menciona en la INTRODUCCION, el papel de esta enzima en algunos microorganismos es proveer una vía alterna de síntesis de ácido glutámico en condiciones de limitación de amonio (3, 5). En otros microorganismos la GOGAT también parece responder a la cantidad de amonio presente en el medio y en *N. crassa* podría proveer un mecanismo importante en el recambio de glutamina. (8, 9).

Sin embargo, en *S. cerevisiae*, esta enzima ha sido poco estudiada; al parecer su actividad es baja constitutiva y varía muy poco o nada al modificar el medio de cultivo. Además, no se han aislado mutantes de - -

levadura alteradas en la actividad de GOGAT, lo que no ha hecho posible establecer claramente cuál pudiera ser el significado biológico de la vía GS-GOGAT en este -- microorganismo. Esta vía podría constituir una ruta - alterna para la asimilación de amonio y la síntesis de glutámico en *S. cerevisiae*.

MATERIAL Y METODOS

CEPAS: Las cepas usadas en este trabajo son: la -
cepa STX21-4A (mat a, ura 2, his 6, arg 4, thr 1, gal 2)
que proviene del Yeast Genetic Stock Center. Las cepas
S288C (mat α mal gal 2); D587-4B (mat α , his 1) y D585-11C
(mat a, lys 1) que provienen de los laboratorios de Cold
Spring Harbor, Nueva York.

MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO: -
Para el crecimiento de precultivos se utilizó medio YDP
(extracto de levadura 1%, peptona de caseína 2%, y gluco
sa 2%) o medio mínimo, según indica el texto. El medio
mínimo (MM) se preparó con sales, elementos traza y vita
minas siguiendo la fórmula de Difco Yeast Nitrogen Base.
Como fuente de carbono se usó glucosa al 2% y como fuen
te de nitrógeno sulfato de amonio 40 mM. La histidina y
lisina suplementadas al medio fueron agregadas a una con
centración de 20 mg/l y 30 mg/l respectivamente. Los -
demás aminoácidos se ocuparon a una concentración de - -
0.5 mg/ml.

Para los experimentos de limitación de amonio se -
preparó a un medio idéntico al MM pero sin sulfato de -
amonio (SN). A este medio se le inyectaron 0.85 ml/hr -
de solución de cloruro de amonio al 0.008%.

Las células se incubaron a 30°C y el crecimiento se siguió midiendo la densidad óptica del cultivo a una longitud de onda de 650 nm o midiendo la cantidad de proteína por el método de Lowry (33).

Para las determinaciones de las actividades enzimáticas el tiempo de cultivo y la velocidad de agitación se variaron de acuerdo a cada experimento.

MUTAGENESIS Y SELECCION DE LAS MUTANTES:

a). Obtención de la mutante GDH⁻. La cepa STX21-4A se mutagenizó con ethylmetanosulfonato (EMS) siguiendo el método de Fink (34). Después de la mutagénesis las células se platearon en cajas de MM + Ureidosuccinato + requerimientos y se incubaron a 30°C durante 48 horas. A algunas de las colonias obtenidas se les midió la actividad de GDH-NADP para seleccionar una mutante GDH⁻.

b). Obtención de la mutante GOGAT⁻. La cepa CN31 se mutagenizó con EMS siguiendo el método arriba mencionado. Después de la mutagénesis se dejaron las células recuperarse en MM + his + glu durante 12 horas a 200 rpm y 30°C. El crecimiento se lavó con agua destilada y se pasó a MM + his + N-glicosil -polifungina durante una hora para enriquecer la población auxótrofa de ácido glutámico. La células se lavaron con agua destilada y se -

sembraron en MM + his + glu; se incubaron a 30°C durante 48 horas y se replicaron a MM + his para seleccionar una mutante auxótrofa de ácido glutámico.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE GDH-NADP: Las células se colectaron filtrando el cultivo por filtros Millipore tipo RA 1.2µm. La pastilla se resuspendió en buffer de extracción de GDH que contiene: fosfato de potasio 0.1M, pH7.0; EDTA 0.001M y β-mercaptoetanol 0.005M.

Las células se rompieron en un aparato homogenizador Braun con perlas de vidrio; la suspensión se centrifugó a 15,000 rpm durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante. El extracto se mantuvo todo el tiempo a 4°C. Para medir la actividad enzimática se preparó el siguiente coctel:

KH ₂ PO ₄ 1 M pH7.8	-----	1	ml
α-cetoglutarato 0.1 M	-----	0.3	ml
Cloruro de Amonio 0.05 M	-----	0.5	ml
NADPH 0.003 M	-----	0.12	ml
Agua tridestilada	-----	8	ml

Se pone 1 ml del coctel en una celda de cuarzo y se arranca la reacción con el extracto. Paralelamente se corren dos controles, uno sin amonio y otros sin - -

α -cetoglutarato. La reacción se sigue midiendo la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE GOGAT: El extracto celular se preparó de la misma manera que el anterior sólo que las células fueron resuspendidas en buffer de - extracción de GOGAT: fosfato monobásico de potasio 0.1 M, pH7.5. Para medir la actividad se preparó el siguiente coctel:

KH_2PO_4 0.1 M pH7.8 -----	0.82 ml
NADH 20 mM -----	0.05 ml
α -cetoglutarato 0.01 M ---	0.05 ml
Extracto -----	variable
Glutamina -----	0.02 ml

Como control se usó el mismo coctel adicionado de 0.2 ml de una solución de azaserina 25 mM. La reacción se arrancó con la glutamina y se siguió la disminución de absorbancia a 340 nm de longitud de onda.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE GDH-NAD: El extracto celular se preparó de la misma manera y en el mismo buffer que en el caso de extractos preparados para - medir la actividad de GDH-NADP. El ensayo es idéntico - salvo que el buffer de ensayo es fosfato monobásico de - potasio 0.1 M pH7.2 y se substituye el NADPH por NADH.

DISECCION DE TETRADAS: Las tétradas de las dife--
rentes cruzas se trataron con una solución de gluculasa
al 0.2% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se -
tomó una asada de la suspensión y se colocó sobre una -
capa de agarosa al 2%. La separación se llevó a cabo -
con un micromanipulador con aguja de vidrio.

Esta parte del trabajo se realizó en el laborato--
rio de la Doctora Aurora Brunner, en el Instituto de - -
Fisiología Celular de la U.N.A.M.

DETERMINACION DE PROTEINA: La proteína de los --
extractos celulares o de los cultivos se cuantificó de -
acuerdo al método de Lowry (33) usando albúmina bovina -
como estandar.

DETERMINACION DE LAS POZAS DE AMINOACIDOS: Los -
extractos y la cuantificación de las pozas intracelulares
de aminoácidos se llevaron a cabo siguiendo un método -
descrito previamente (24).

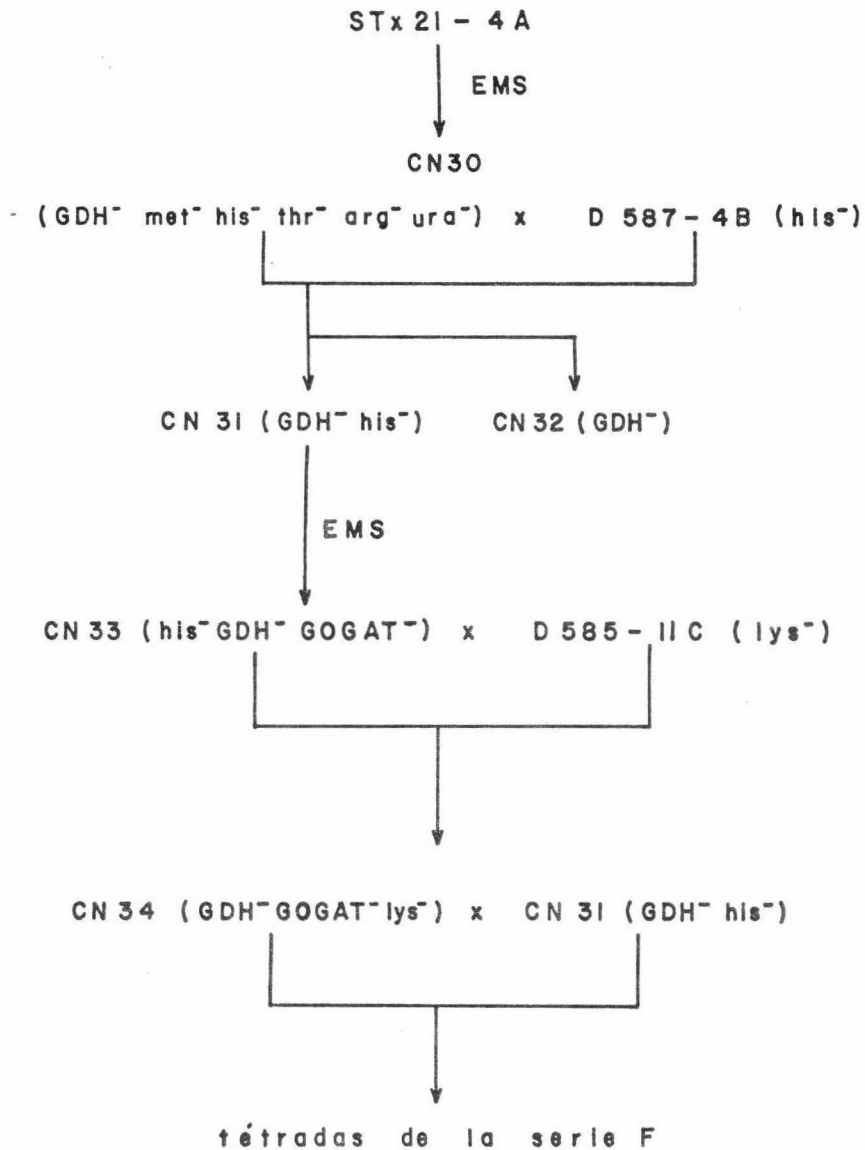


Fig. 2.

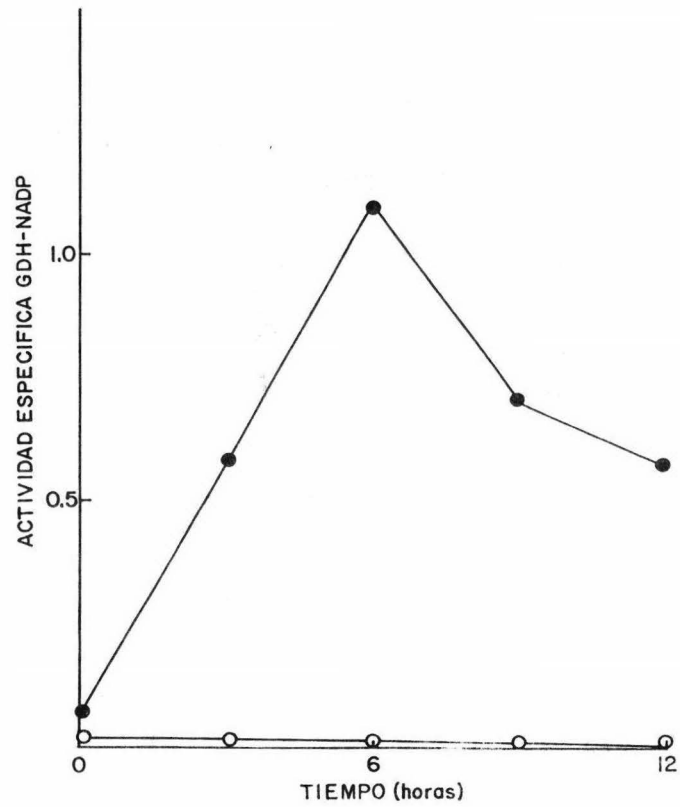
RESULTADOS

I. OBTENCION Y CARACTERIZACION FENOTIPICA DE MUTANTES - ALTERADAS EN LA DESHIDROGENASA GLUTAMICA BIOSINTETICA.

La cepa STX21-4A (mat a, ura 2, his 6, arg 4, met 1 gal 2) se mutagenizó con EMS como se describe en MATERIAL Y METODOS. Después de la mutagénesis las células se plataron en cajas de Petri que contenían MM adicionado de los requerimientos de la cepa STX21-4A. Dado que esta cepa es portadora de la mutación ura 2, requiere uracilo para crecer; en este caso el uracilo se substituyó por ureidosuccinato ya que se ha reportado que mutantes ura 2 son incapaces de utilizar este compuesto en presencia de amonio a menos que carezcan de la actividad de GDH-NADP (25). A 20 de las colonias obtenidas se les determinó la actividad de GDH-NADP y se seleccionó una que no presentaba actividad (CN30) y que conservaba los marcadores de auxotrofia de la cepa STX21-4A. Con el fin de obtener una cepa GDH⁻ que no presentara tantas auxotrofias, se cruzó la cepa CN30 por la cepa D587-4B (mat α , his 1). Por disección de tétradas se obtuvieron las cepas CN31 (mat α , gdh⁻, his⁻) y la cepa CN32 (gdh⁻) (Fig. 2) y se encontró que la segregación del carácter gdh⁻ seguía el patrón 2:2 sugiriendo que se trata de una mutación nuclear y nomogénica.

Fig. 3.- Actividad específica de GDH-NADP en MM.

S288C (●), CN31 (○).



En la Fig. 3 se muestra la actividad de la GDH-NADP de la cepa silvestre y de la cepa CN31. Se observa que la actividad de esta enzima en la cepa silvestre aumenta hasta alcanzar su máximo a las 6 horas mientras que la actividad de la mutante permanece en niveles mucho menores, alcanzándose una diferencia de hasta 100 veces. Ambas cepas fueron cultivadas en MM + histidina, ya que la cepa CN31 es auxótrofa de este aminoácido.

Como se explicó en la INTRODUCCION, Lacroute (25), describió el aislamiento de mutantes que carecían de la actividad de GDH-NADP, sin embargo, estas mutantes son capaces de crecer en amonio con un tiempo de duplicación 2.5 veces mayor que el de la cepa silvestre. Con el fin de comparar el fenotipo de nuestras mutantes con las reportadas por Lacroute, cultivamos la mutante CN32 (prototrofa) y la cepa silvestre S288C siguiendo la curva de crecimiento durante 24 horas. Como se muestra en la Fig. 4 la mutante CN32 tiene un tiempo de duplicación 3 veces mayor que el de la cepa silvestre. Asimismo, se determinó la actividad de GDH-NADP de estos cultivos a las 9 horas. La Fig 4 muestra que la cepa CN32 presenta una actividad 76 veces menor que la cepa silvestre. Para este experimento se usaron estas cepas ya que ambas son prototrofas y por lo tanto se pueden cultivar en MM sin

Fig. 4.- Curva de crecimiento de las cepas S288C (●) y CN32 (○) en MM.

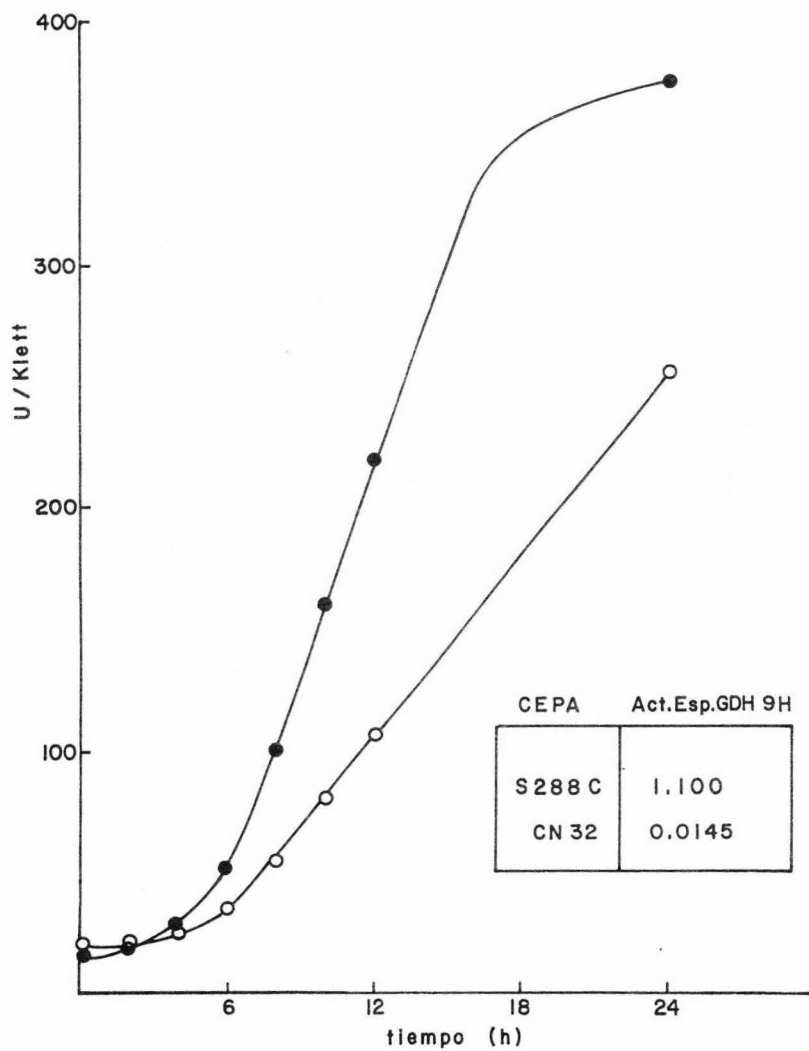
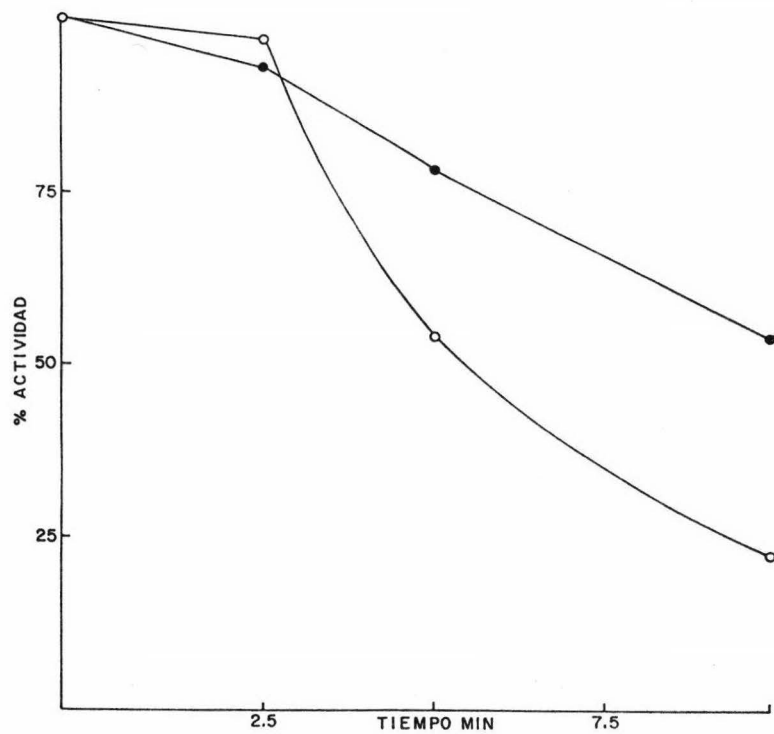


Fig. 5.- Curva de termoestabilidad de GDH-NADP de las cepas S288C (●) y CN31 (○). Los extractos se calentaron a 75°C.



adicionar aminoácidos.

Estos datos indican que la mutación presente en la mutante CN30 que heredaron las cepas CN31 y CN32, alteró la actividad de la GDH-NADP. En la Fig. 5 se presenta una curva de termoestabilidad de la GDH-NADP de la cepa padre STX21-4A y de la mutante CN31, que claramente muestra que la actividad residual de la cepa CN31 es más termolabil. Por otro lado, mezclas de extractos de GDH-NADP de las cepas STX21-4A y CN31 muestran que la baja actividad de GDH-NADP encontrada en la cepa CN31 no se debe a la presencia de efectores negativos (Tabla 1). Estos datos sugieren que la mutación afectó el gen estructural GDH 1.

En algunos microorganismos se ha propuesto que la vía GS-GOGAT proporciona una ruta para la asimilación de nitrógeno, cuando éste se encuentra en concentraciones limitantes (5). Siguiendo un método utilizado para N. crassa, (ver MATERIAL Y METODOS), cultivamos la levadura en un sistema limitado alimentado de amonio. La Fig. 6 presenta el crecimiento de las cepas CN31 y S288C en condiciones de limitación de amonio. Claramente se observa que estas cepas presentan un crecimiento similar en estas condiciones. Como control se determinó la actividad de GDH-NADP a las 10 y 24 horas, encontrándose que

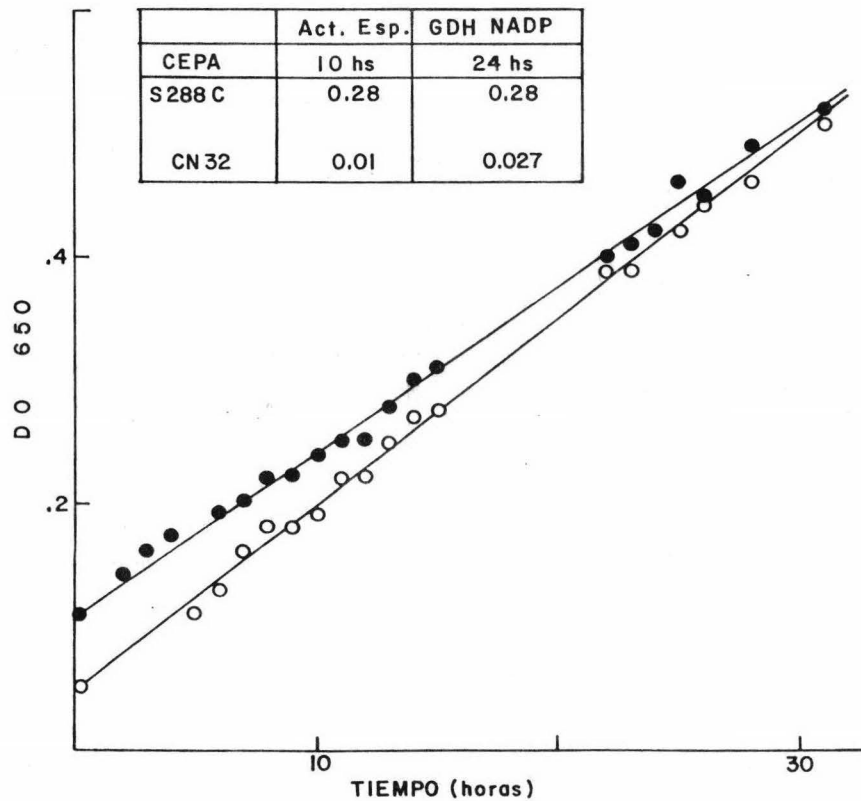


Fig. 6.- Curva de crecimiento en limitación de amonio de las cepas S288C (●) y CN32 (○).

TABLA 1. Mezcla de extractos de GDH-NADP de las cepas STX21-4A (Ura⁻ his⁻ met⁻ arg⁻ thr⁻) y CN31 (his⁻ gdh⁻).

CEPA	UNIDADES DE GDH-NADP
STX21-4A	4.3 U
CN31	0.15 U
STX21-4A + CN31	2.18 U (2.22) ^a

^a El número entre paréntesis indica el valor teórico esperado.

la cepa CN31 presenta solamente una actividad residual - de esta enzima (Fig. 6).

Los datos hasta aquí presentados indican que las - cepas CN31 y CN32 son portadoras de una mutación que - parece haber afectado el gene estructural de la GDH-NADP. Esta alteración no modifica el crecimiento de estas ce-- pas en limitación de amonio.

En N. crassa, se ha encontrado que mutantes GDH⁻, al igual que las de S. cerevisiae presentan un crecimien- to residual en MM. Algunos autores (26) han sugerido - que en S. cerevisiae este crecimiento se debe a un incre- mento en la GDH-NAD. La Tabla 2 muestra las actividades de GDH-NAD de las cepas CN32 y S288C crecidas en amonio como fuente de nitrógeno; como se observa la cepa CN32 - no presenta un aumento en la actividad de esta enzima, - por lo que es difícil que la síntesis de ácido glutámico en esta cepa se deba a la operación de la GDH-NAD. En - N. crassa este crecimiento se abate en mutantes GDH⁻ que además son portadoras de una mutación que disminuye la - actividad de GOGAT (6,7), sugiriendo que el crecimiento de estas cepas se debe a la operación de la vía GS-GOGAT. Asumiendo que S. cerevisiae se comporta igual que N. - - crassa, decidimos aislar mutantes a partir de la cepa - CN31 que fueran incapaces de crecer en MM.

TABLA 2. Actividades de GDH-NAD de las cepas CN32 y S288C cultivadas en exceso de amonio.

CEPA	Act. Esp. GDH-NAD
S288C	0.00956
CN32	0.010

II. OBTENCION Y CARACTERIZACION FENOTIPICA DE MUTANTES - ALTERADAS EN LA GLUTAMATO SINTASA.

La cepa CN31 se mutagenizó con EMS como se describe en MATERIAL Y METODOS. El enriquecimiento se llevó a cabo en MM + histidina y las células se recuperaron en MM + histidina + glutámico. El fenotipo de las colonias obtenidas (200 Aprox.) se probó en MM + histidina y en MM + histidina + glutámico y se seleccionó una (CN33) incapaz de crecer en MM + histidina pero capaz de crecer cuando este medio se suplementa con ácido glutámico. El fenotipo esperado para una mutante que carecerá de las actividades de GOGAT y GDH es una auxotrofia total por ácido glutámico. En la Fig. 7 se presenta el crecimiento de las mutantes CN33, CN31 y de la cepa silvestre S288C cultivadas en MM + histidina y en MM + histidina + glutámico. Como se puede observar aún cuando la mutante CN33 presenta una disminución de crecimiento en MM + histidina, cuando se compara con las cepas CN31 y S288C, todavía se puede observar un crecimiento residual, que pudiera atribuirse a la producción de glutámico a partir de histidina.

En la tabla 3 se presentan las actividades de GOGAT y GDH-NADPH de las cepas S288C, CN31 y CN33. Se observa que tanto la CN31 como la CN33 presentan una

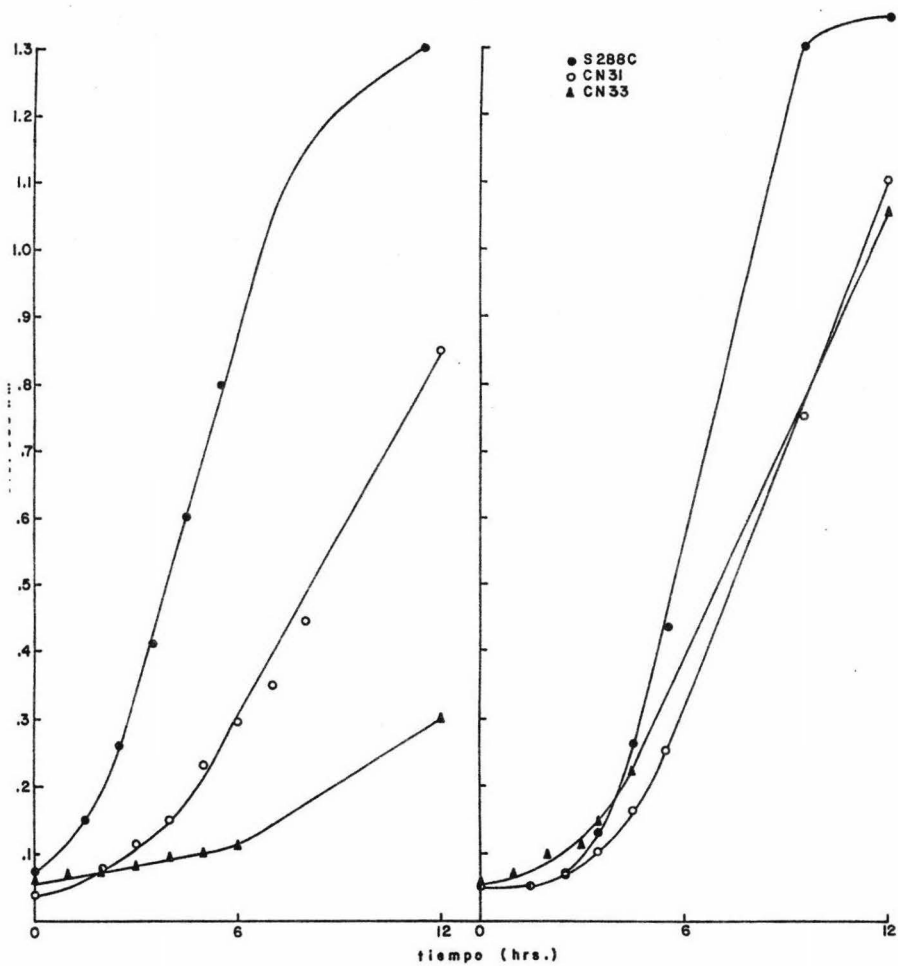


Fig. 7.- Curvas de crecimiento de las cepas S288C (●), CN31 (○) y CN33 (▲) en MM (panel izquierdo) y MM + ácido glutámico (panel derecho).

TABLA 3. Actividades específicas de GOGAT y GDH-NADP de las cepas S288C, CN31 y CN33.

CEPA	GOGAT (Act. Esp.)	GDH-NADP (Act. Esp.)
S288C	0.022	.314
CN31	0.021	.0032
CN33	0.0015	.0010

Las cepas se cultivaron durante 12 horas en MM + his.

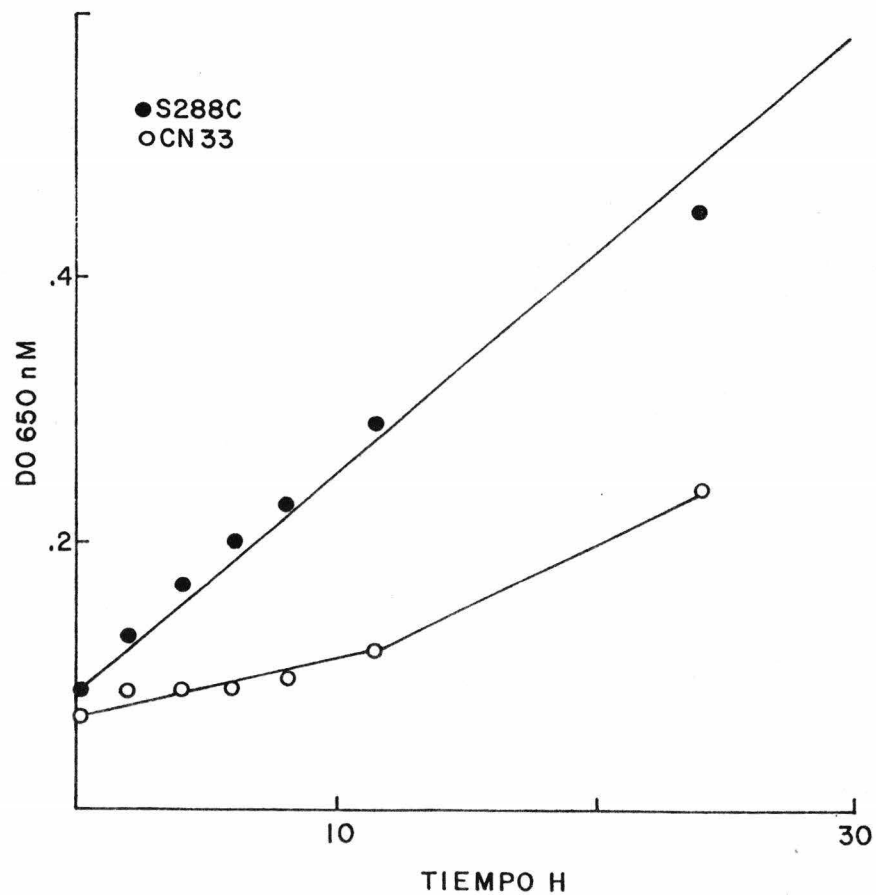


Fig. 8.- Curva de crecimiento en limitación de amonio de las cepas S288C y CN33.

actividad de GDH-NADP 100 veces menor que la encontrada en la cepa silvestre y que la mutante CN33 presenta una actividad de GOGAT 15 veces menor que la encontrada en la cepa silvestre y la cepa padre.

Con el fin de determinar el efecto de la disminución en la actividad de GOGAT en el crecimiento en condiciones de limitación de amonio, las cepas S288C y CN33 se crecieron en cultivos limitados alimentados de amonio. Como se observa en la Fig. 8, la cepa CN33 presenta una disminución de crecimiento considerable. Estos cultivos se llevan a cabo en presencia de histidina para suplementar el requerimiento de la cepa CN33; la adición de este aminoácido podría explicar que esta cepa aún presente un crecimiento residual.

Aparentemente la mutante CN33 es portadora de al menos una mutación que resulta en una disminución de la actividad de GOGAT que pudiera estar asociada a una disminución de crecimiento cuando esta cepa se cultiva en limitación de amonio. Con el fin de analizar el número de mutaciones presentes en la cepa CN33 se llevó a cabo un estudio de segregación.

III. ESTUDIO DE SEGREGACION DEL FENOTIPO GOGAT⁻ DE LA -
CEPA CN33.

S. Cerevisiae es un hongo ascomiceto capaz de formar diploides y después esporular para formar cuatro - - productos haploides, mismos que quedan encerrados en un saco llamado asca. A cada asca con sus cuatro esporas - se le llama tétradas.

Durante el proceso de esporulación los diploides - formados mediante cruas atraviesan por una meiosis que - da como resultado la formación de 4 esporas haploides. - La esporulación de los diploides se inicia con una división mitótica en la cual cada cromosoma se duplica, re-- combina con su homólogo y segrega hacia un polo de la - célula con su duplicado (4 cromátidas por c/cromosoma). Así, se obtienen dos productos que tienen cada uno dos - cromátidas de cada cromosoma homólogo de la célula. Inme-- diatamente estos productos entran a una segunda división meiótica en la que, sin replicación del DNA, se separan las cromátidas y dan origen a 4 células que sólo tienen 1 cromátida de cada cromosoma homólogo y por lo tanto la mitad del número cromosómico que había en el diploide.

Dada la primera división, cualquier mutación viajará de modo que al final dos de los productos de la meiosis

serán portadores de la mutación y dos no, independientemente de la recombinación que haya existido en los cromosomas homólogos.

Ahora bien, para el caso de dos mutaciones se da la posibilidad, dependiendo de la recombinación entre cromosomas homólogos antes de la primera división, de que estas queden repartidas de diferentes maneras: una posibilidad es que no haya recombinación y entonces se obtendrá un patrón de segregación 2:2 ya que las mutaciones viajarán juntas, como una unidad; si la recombinación es doble, una espora tendrá ambas mutaciones, y dos tendrán cuando menos una, mientras que la cuarta no tendrá ninguna. Una tercera posibilidad es en la que cada espora será portadora de una sola mutación. Estas posibilidades están ejemplificadas en la Tabla 6.

Con el objeto de hacer un análisis de segregación del carácter $GOGAT^-$ la mutante CN33 ($mat\ \alpha, his^-, gdh^-, gogat^-$) se cruzó por la cepa D585-11C ($mat\ a, lys\ 1$) con el fin de obtener una cepa $gdh^-, gogat^-, mat\ a$, que pudiera cruzarse con la cepa CN31 ($mat\ \alpha, his^-, gdh^-$). Toda la progenie de esta cruce sería gdh^- , lo que nos permitiría analizar las tétradas de esta cruce observando el fenotipo (Fig. 7) en lugar de medir la actividad de GOGAT a cada una de las colonias de cada tétrada.

TABLA 4. Fenotipo de la tétrada JK.

CEPA	His	Lys	Mat	GDH	GOGAT
Jk1	+	+	α	+	+
Jk2 (CN34)	+	-	a	-	-
Jk3	-	+	a	+	+
Jk4	-	-	α	-	-
CN33	-	+	α	-	-
D585-11C	+	-	a	+	+

La Tabla 4 presenta el fenotipo de las cuatro cepas de una tétrada obtenida de la cruce CN33 x D585-11C (Fig. 2). Puede observarse que la segregación de GOGAT es 2:2 al igual que la del resto de los marcadores. La cepa Jk2 (CN34) (mat a, lys⁻, gdh⁻, gogat⁻) se cruzó por la cepa CN31 (Fig. 2) y se analizaron 9 tétradas. La Tabla 5 presenta el fenotipo de las mismas. Se observa que tres tétradas presentan una segregación de GOGAT de 2:2 mientras que 5 presentan una segregación 3:1 y una 4:0. Los demás marcadores segregan 2:2. Estos datos sugieren que la cepa - CN34 sea portadora de dos mutaciones involucradas en el fenotipo GOGAT⁻. La Tabla 6 muestra las distintas combinaciones posibles de segregación de dos mutaciones involucradas en el fenotipo GOGAT⁻. Los fenotipos de las cepas de cada una de las tétradas hacen suponer que se requieren las dos mutaciones para producir el carácter GOGAT⁻.

IV. CARACTERIZACION FENOTIPICA DE LA TETRADA Fi.

La Tabla 7, muestra las actividades de GOGAT de las cepas de la tétrada Fi cultivada en MM + histidina + lisina durante 12 horas. Como se puede observar la segregación en esta tétrada resultó 3:1 y correspondería a la combinación B de la Tabla 6. De este modo, las mutaciones deben de estar separadas en dos de las colonias de la

TABLA 5. Fenotipo de las tétradas de la cruza CN31 ($his^- gdh^-$) X CN34 ($lys^- gdh^- gogat^-$).

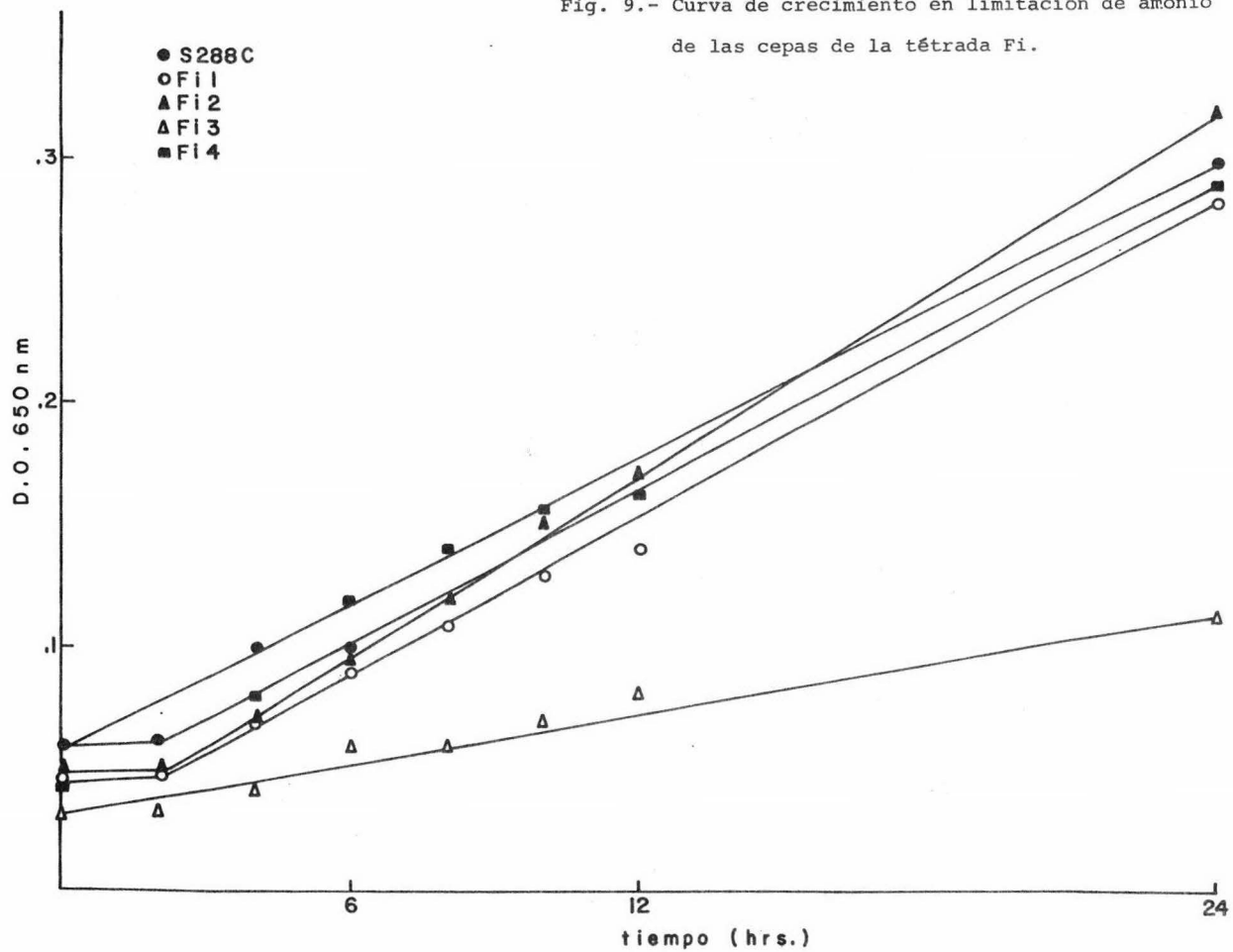
CEPA	His	Lys	GOGAT	CEPA	His	Lys	GOGAT
Fa1	+	+	+	Fg1	-	+	+
Fa2	+	-	-	Fg2	+	+	+
Fa3	-	-	-	Fg3	+	-	+
Fa4	-	+	+	Fg4	-	+	+
Fb1	-	+	+	Fh1	+	+	+
Fb2	+	-	-	Fh2	-	-	+
Fb3	-	+	+	Fh3	-	-	-
Fb4	+	-	-	Fh4	+	+	+
Fc1	+	+	+	Fi1	-	-	+
Fc2	-	-	-	Fi2	+	+	+
Fc3	-	+	-	Fi3	+	+	-
Fc4	+	-	+	Fi4	-	-	+
Fd1	+	+	+				
Fd2	+	-	+				
Fd3	-	+	-				
Fd4	-	-	+				
Fe1	+	+	+				
Fe2	+	-	-				
Fe3	-	-	+				
Fe4	-	+	+				
Ff1	+	-	+				
Ff2	+	-	+				
Ff3	-	+	+				
Ff4	-	+	-				

TABLA 7. Actividades de GOGAT de las cepas de la tétrada Fi cultivadas en exceso de amonio a las 12 horas de crecimiento.

CEPA	Act. Esp. de GOGAT
S288C	0.022
Fi1	0.025
Fi2	0.034
Fi3	n.d.*
Fi4	0.012

* n.d. no detectable.

Fig. 9.- Curva de crecimiento en limitación de amonio
de las cepas de la tétrada Fi.



tétrada; claramente se ve que la cepa Fi3 es portadora - de dos mutaciones ya que es la única con una actividad - de gogat muy reducida. Sin embargo, este dato no nos - permite distinguir el efecto de las mutaciones por separado ni distinguir el carácter silvestre en las cepas de la tétrada.

Con el fin de definir cual es el papel de estas - mutaciones, se crecieron todas las cepas de la tétrada - Fi y a la cepa silvestre S288C en cultivos limitados - - alimentados de amonio y se midió la actividad de GOGAT - en estas condiciones. La Fig. 9 muestra las curvas de - crecimiento de este experimento; se observa que tres de las cepas crecen de una manera similar a la cepa silvestre mientras que la doble mutante Fi3 es incapaz de sostener el crecimiento en estas condiciones. Asimismo, - sabemos que esta cepa carece de la actividad de GOGAT en estos cultivos (Tabla 8). Sin embargo, los datos del - resto de las cepas de la tétrada tampoco indican claramente cual pudiera ser el papel de las mutaciones por - separado, ya que todas las cepas presentan una actividad de GOGAT muy similar y se comportan muy parecido en cuanto a crecimiento.

TABLA 8. Actividades de GOGAT de las cepas de la tétrada
Fi cultivadas en limitación de amonio.

Tiempo	S288C	Fi1	Fi2	Fi3	Fi4
6 hrs.	0.023	0.016	0.021	0.0052	0.011
12 hrs.	0.022	0.015	0.026	0.0043	0.024
24 hrs.	0.028	0.017	0.019	n.d.*	0.030

* n.d. no detectable.

Los datos hasta aquí presentados sugieren fuertemente que para generar el fenotipo GOGAT⁻ se requieren 2 - - mutaciones. Para demostrar que este es el caso, se ha diseñado una serie de cruzas que, de acuerdo a su segregación definirán que cepas son portadoras de una mutación sencilla, cuáles son silvestres y cuáles dobles mutantes. Como cepa padre se seleccionará una doble mutante GOGAT⁻ que se cruzará por las cepas problema de una o varias tétra--das; así, la progenie de aquellas cepas que resulten portadoras de una sola mutación, segregará con un patrón 2:2 fenotípico, mientras que la de una cepa silvestre lo hará con patrones de 2:2, 3:1 y 4:0 al igual que las cruzas anteriores.

V. OBTENCION Y CARACTERIZACION DE UNA CEPA GDH⁺ GOGAT⁻.

Como ya se mencionó en los incisos I y II una cepa GDH⁻ GOGAT⁺ crece con el mismo tiempo de duplicación que la cepa silvestre en condiciones de limitación de amonio (Fig. 6), mientras que en una doble mutante GDH⁻ GOGAT⁻ el crecimiento se abate considerablemente (Fig. 8); esto sugiere fuertemente que la GOGAT juega un papel importante para el crecimiento en condiciones de limitación de amonio. Para explorar mejor la importancia de la vía - GS-GOGAT en estas condiciones decidimos obtener una cepa

GDH⁺ GOGAT⁻ y realizar con ella experimentos en condiciones de limitación de amonio.

De la progenie de la cruce de las cepas CN33 x D585-11C se escogió a la cepa CN35 cuyo fenotipo es: mat a, his⁻, GDH⁺, GOGAT⁻. Esta cepa es portadora de las dos mutaciones que confieren el fenotipo GOGAT⁻ ya que proviene de una tétrada con segregación 3:1 y es la única cepa de la tétrada que carece de esta actividad enzimática (posibilidad B de la Tabla 6).

La figura 10 muestra una curva de crecimiento de las cepas S288C y CN35 en condiciones de limitación de amonio. Se observa que la cepa CN35 presenta un retraso de 8 horas en el crecimiento con respecto a la cepa silvestre, pero después crece con el mismo tiempo de duplicación. En la Tabla 9 se presentan las actividades de GDH y GOGAT medidas en distintos puntos del crecimiento; es de notarse que aunque la cepa CN35 carece de la actividad de GOGAT, tiene el doble de la actividad de GDH-NADP que la cepa silvestre. Algunos experimentos realizados en este laboratorio (H. Olivera, comunicación personal) han demostrado que el amonio es un inductor de la actividad de GDH-NADP. Estos datos sugieren que la cepa CN35 requiere de la acumulación de amonio a falta -

- S 288C
- CN 35

Fig.10.- Curva de crecimiento en limitación de amonio
de las cepas S288C y CN35.

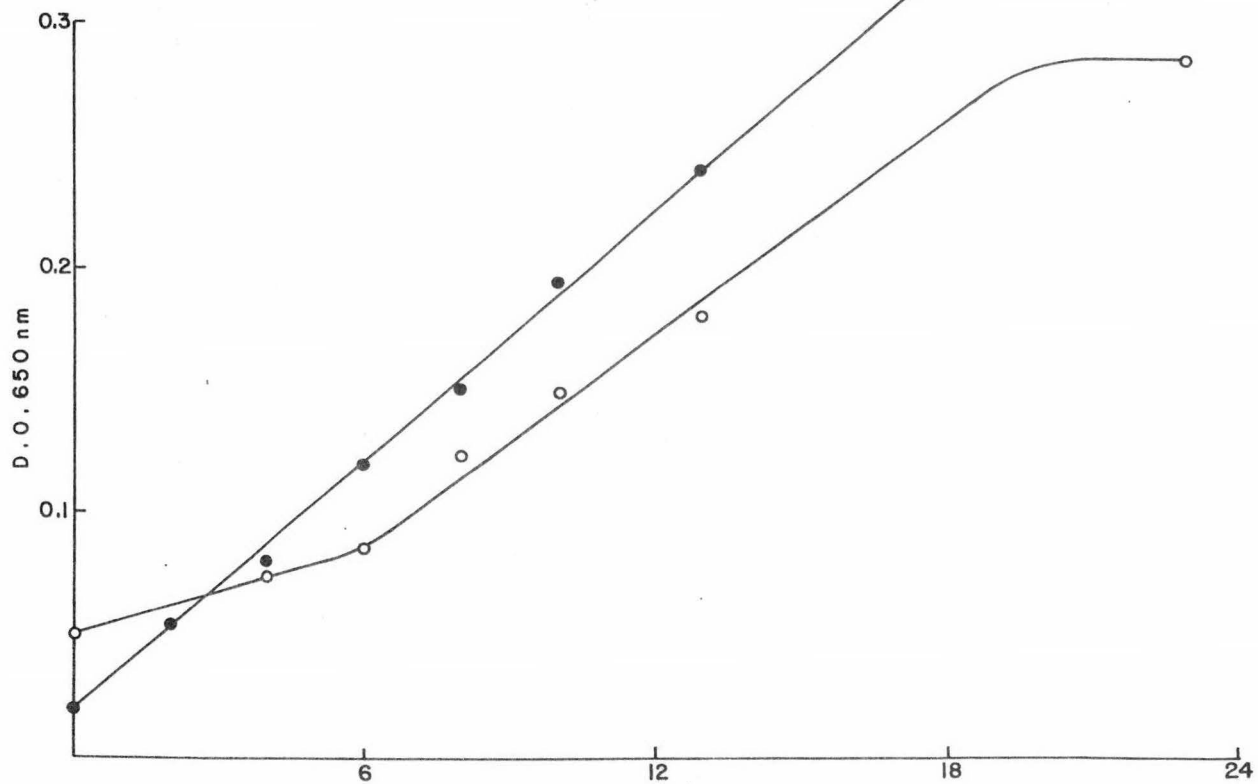


TABLA 9. Actividades Específicas de GDH-NADP y GOGAT de - las cepas S288C (silvestre) y CN35 (GDH^+ GOGAT^-) en condiciones de limitación de amonio.

CEPA	Tiempo (hrs)	Act. Esp. de GOGAT	Act. Esp. de GDH-NADP
S288C	6	0.021	0.62
	10	0.020	0.74
	24	0.010	0.36
CN35	6	0.005	1.29
	10	0.006	0.91
	24	0.005	0.69

de la actividad de GOGAT para lograr inducir su GDH-NADP y así poder iniciar su crecimiento por la vía GDH-GS, ya que no cuenta con la vía GS-GOGAT. Probablemente la - - acumulación de amonio se logre al disminuir las pozas de ácido glutámico de modo que la GS ya no es capaz de tomar el amonio para la síntesis de glutamina; al paso del tiempo la cantidad de amonio intracelular es tal que ahora se puede inducir la actividad de GDH-NADP con lo que se iniciaría la síntesis de ácido glutámico. Una vez -- que existen los substratos la GDH-NADP y la GS llevan a cabo la asimilación de amonio mediante la síntesis de - ácido glutámico y glutamina.

Para esclarecer con mayor precisión el papel de - cada una de las vías de asimilación de amonio en S. cerevisiae hemos pensado en hacer experimentos en un quimiostato utilizando a las diferentes mutantes obtenidas en este estudio (CN32, CN35, etc). Este aparato permite mantener en un estado estacionario a las células en el - grado de limitación que se desee durante un tiempo indefinido. Así, variando el substrato limitante y su grado de limitación se pueden establecer los efectores que nodulan la actividad enzimática en las diferentes condiciones. De este modo, pensamos obtener un panorama mucho - más completo del que se tiene a la fecha de las vías de asimilación de amonio que operan en S. cerevisiae.

DISCUSION

Usando el método descrito por Lacroute (25) se obtuvo una mutante alterada en la actividad de GDH-NADP. Esta mutante, al igual que las descritas anteriormente, parece haber sido afectada en el gene estructural GDH1. La Fig. 4 muestra una curva de termosensibilidad de la enzima obtenida de las cepas STX21-4A (silvestre) y CN31 (GDH⁻) donde claramente se observa que la enzima mutante es más sensible al calor que la enzima silvestre. Esto indica una modificación en la proteína mutante que es la responsable de su termosensibilidad. Por otro lado, en la Tabla 1 se observa que la actividad de GDH-NADP no se altera al mezclar, en partes iguales, extractos obtenidos de las cepas CN31 y S288C, lo que sugiere que la baja actividad de GDH-NADP de la cepa CN31 no se debe a la presencia de un inhibidor de esta enzima. Los datos de termoestabilidad y mezcla de extractos sugieren fuertemente que se trata de una mutación estructural en el gene GDH1.

El crecimiento de una cepa portadora de esta mutación (CN32) en amonio como única fuente de nitrógeno se ve disminuido con respecto al de una cepa silvestre, pero no es totalmente abatido, por lo que es de suponer

se la existencia de una vía alterna para la síntesis de ácido glutámico. Algunos autores han propuesto que esta vía podría ser a través del aumento de la actividad de la GDH-NAD (26); sin embargo, en S. cerevisiae, se ha descrito la existencia de la enzima glutamato sintasa, la cual podría ser la responsable de la síntesis de ácido glutámico en las mutantes GDH⁻.

Para dilucidar cuál de estas posibilidades es más acertada, decidimos utilizar dos enfoques experimentales. El más directo consiste en medir la actividad de la GDH-NAD cultivando las cepas CN31 y S288C en amonio como única fuente de nitrógeno. Si la GDH-NAD es responsable de la síntesis de ácido glutámico en la mutante CN31, es de esperarse un aumento en la actividad de esta enzima. La Tabla 2 muestra que este no es el caso, ya que las actividades de GDH-NAD de las cepas CN31 y S288C son muy parecidas.

El otro enfoque para demostrar que la síntesis de ácido glutámico en las mutantes GDH⁻ se debe a la operación de la vía GS-GOGAT fue la obtención de mutantes alteradas en la actividad de glutamato sintasa. De este modo, una doble mutante GDH⁻GOGAT⁻, debe ser incapaz de crecer en amonio como única fuente de nitrógeno - -

si es que la síntesis de ácido glutámico procede a través de la vía GS-GOGAT en las mutantes que carecen de la actividad de GDH-NADP.

La Fig. 7, muestra el crecimiento de las cepas S288C, CN31, y CN33 en amonio y en amonio + glutámico como fuentes de nitrógeno. La cepa CN33 es portadora, además de la mutación en GDH-NADP, de una o varias mutaciones que afectan la actividad de GOGAT. En esta cepa el crecimiento en amonio como fuente de nitrógeno se ve muy disminuido en comparación con la cepa CN31 (GDH⁻); el crecimiento residual que aún conserva la cepa CN33 podría ser explicado por la obtención de ácido glutámico a partir de histidina, ya que las cepas CN31 y CN33, son auxótrofas de este aminoácido y el medio de cultivo está suplementado con histidina. Una cepa protótrofa GDH⁻ GOGAT⁻ es incapaz de crecer en MM (dato no mostrado). Así pues, esto indica fuertemente que la vía de síntesis de ácido glutámico que opera en las cepas GDH⁻ es la vía GS-GOGAT.

Ahora bien, para otros microorganismos, ha sido propuesto que la vía GS-GOGAT funciona principalmente en condiciones de limitación de amonio (5,6,7). Para explorar si en S. cerevisiae la vía GS-GOGAT es importante en estas condiciones, decidimos hacer cultivos

limitados alimentados de amonio utilizando a las dife--
rentes cepas mutantes y así poder determinar la impor--
tancia de cada una de estas vías en condiciones de limi--
tación de amonio.

La Fig. 6, muestra la curva de crecimiento y las -
actividades de GDH-NADP de las cepas S288C y CN31 en -
condiciones de limitación de amonio. Se observa que el
crecimiento de estas cepas en estas condiciones es - -
prácticamente igual, pese a que la mutante CN31 carece
de actividad de GDH-NADP. Este dato indica que la - -
GDH-NADP no es importante en condiciones de limitación
de amonio, ya que la cepa CN31, que carece de esta acti--
vidad, es capaz de crecer con el mismo tiempo de dupli--
cación que una cepa que sí presenta actividad de - - -
GDH-NADP. El resultado obtenido de un experimento simi--
lar utilizando a la cepa CN33 (GDH⁻ GOGAT⁻) es bastante
diferente. Como se observa en la Fig. 8, esta cepa - -
presenta sólo un crecimiento residual en comparación de
la cepa S288C (silvestre) lo que indica que, al faltar
la GOGAT, en una cepa GDH⁻, el crecimiento se abate.

Para explorar de una manera más completa la impor--
tancia de la vía GS-GOGAT en S. cerevisiae decidimos -
utilizar una cepa proveniente de la cruza CN33 x D585-11C

(Fig. 2) cuyo fenotipo es $GDH^+ GOGAT^-$. Esta cepa (CN35) debe ser portadora de las dos mutaciones que confieren el fenotipo $GOGAT^-$, ya que es la única cepa que carece de esta actividad en una tétrada cuyo patrón de segregación fue 3:1.

La figura 10 muestra una curva de crecimiento de las cepas CN35 ($GDH^+ GOGAT^-$) y S288C (silvestre) en condiciones de limitación de amonio. Como se observa, la cepa CN35 presenta un retraso en el crecimiento de 6 horas con respecto a la cepa silvestre, pero al cabo de este tiempo es capaz de crecer con un tiempo de duplicación muy similar al de la cepa silvestre. En la Tabla 9 se presentan las actividades específicas de GDH y GOGAT de estas cepas en distintos puntos del crecimiento; es de notarse que la cepa CN35 presenta una actividad específica de GOGAT muy reducida, sin embargo, la actividad específica de GDH en esta cepa es aproximadamente el doble de la encontrada en la cepa silvestre. Esto indica que la cepa CN35 es capaz de inducir su GDH para compensar la falta de la actividad de GOGAT y así poder crecer en condiciones de limitación de amonio. En el laboratorio (H. Olivera, comunicación personal) se han realizado experimentos que demuestran que el amonio es un inductor de la actividad de GDH; el retraso en el

crecimiento de la cepa CN35 podría explicarse suponiendo que en este tiempo la poza intracelular de amonio se eleva a niveles capaces de inducir la actividad de GDH. Probablemente, la GS no es capaz de tomar el amonio que entra a la célula, ya que las pozas de ácido glutámico deben de estar muy reducidas por la falta de la actividad de GOGAT. Así, pasaría un tiempo hasta que la poza intracelular de amonio se elevaría permitiendo la inducción de la actividad de GDH lo que a su vez reanudaría la síntesis de ácido glutámico y la asimilación de amonio por la vía GDH-GS. Estos datos indican que la enzima GOGAT es necesaria para crecer en limitación de amonio.

Con el objeto de identificar a los moduladores y las condiciones que regulan el funcionamiento de estas vías de asimilación de amonio, hemos decidido utilizar un quimiostato para hacer experimentos con las diferentes mutantes obtenidas en este estudio. Este aparato permite mantener en un estado estacionario a las células del cultivo y manejar diferentes grados de limitación del substrato que se desee. Así, es posible variar la limitación de amonio y establecer los efectores que modulan la actividad enzimática en las diferentes condiciones. De este modo, pensamos obtener un panorama - - mucho más completo del que se tiene a la fecha acerca - - de las diferentes vías de asimilación de amonio que - -

operan en S. cerevisiae.

Los datos hasta aquí presentados sugieren fuertemente que, al igual que en otros microorganismos, la GS-GOGAT en S. cerevisiae opera principalmente en condiciones de limitación de amonio. Por otro lado, esta vía es capaz de sostener un buen crecimiento en condiciones de exceso de nitrógeno cuando falta la actividad de GDH-NADP. (Fig. 7).

El estudio de segregación llevado a cabo con la cruzada CN34 x CN31 sugiere que la cepa CN33 es portadora de una doble mutación. El hecho de que la segregación de esta cruzada sea predominante 3:1, podría explicarse de dos maneras: la primera es que un fenómeno de conversión génica fuera el responsable de la aparición de segregantes 3:1; sin embargo, se sabe que la frecuencia de conversión génica es de 1 en diez tétradas, y dado el elevado número de segregantes 3:1 obtenidas en este estudio, es poco probable que la conversión génica explique esta segregación. En la Tabla 6 se plantean las posibles combinaciones de segregación en caso de que el fenotipo GOGAT⁻ estuviera dado por dos mutaciones. Esta posibilidad es más real que la de conversión génica y se hicieron algunos experimentos para comprobarla.

Decidimos tomar a la téttrada Fi para llevar a cabo estos estudios, ya que esta téttrada correspondería a la combinación B de la Tabla 6, en donde las mutaciones estarían separadas en dos de las cepas de la téttrada. Cuando esta téttrada se crece en exceso de amonio, los valores de las actividades de GOGAT (Tabla 7) de las diferentes cepas sólo permiten identificar a la doble mutante Fi3 que carece de la actividad de esta enzima. El resto de las cepas tienen una actividad de GOGAT muy similar a la de la cepa silvestre por lo que se hace difícil discernir cuál es la silvestre y cuáles las mutantes separadas.

En un intento para tratar de identificar a qué cepa corresponde cada una de las diferentes mutantes, se creció a la téttrada Fi en limitación de amonio, esperando ver alguna diferencia en el crecimiento (Fig. 9) o en la actividad enzimática (Tabla 8). Sólo la cepa Fi3, posiblemente portadora de las dos mutaciones se comporta diferente de la cepa silvestre tanto en actividad como en crecimiento. Este dato tampoco permite distinguir a las mutantes separadas de la cepa silvestre de la téttrada.

Datos preliminares (no mostrados) sugieren que las dos mutaciones presentes en la cepa Fi3 son estructurales, ya que un estudio de sensibilidad a temperatura de la GOGAT de cada una de las cepas de la tétada Fi mostró que la GOGAT de las cepas Fi2 y Fi4 es más termosensible, mientras que la GOGAT de la cepa Fi1 se comporta igual que la de la cepa silvestre.

Por otro lado, la GOGAT obtenida de la cepa Fi2 presenta una mayor sensibilidad a glioxalato que la de las cepas silvestres y Fi4. Estos datos sugieren que el fenotipo gogat⁻ se debe a la presencia de 2 mutaciones que han afectado muy probablemente a 2 diferentes enzimas (gogat).

Hemos encontrado que el glioxalato es un inhibidor de la gogat, la diferente respuesta que las cepas Fi2 y Fi4 presentan con glioxalato sugiere que la regulación de las dos enzimas es diferente.

El hecho de que S. cerevisiae presente dos enzimas con actividad de gogat explica porque una mutante con fenotipo gogat⁻ es portadora de dos mutaciones.

Ahora bien, un enfoque que nos permitirá analizar con mayor detalle estas mutaciones, consiste en cruzar a cada una de las cepas de la tétada Fi por una cepa -

portadora de las dos mutaciones como la cepa Fi3. La progenie de estas cruzas debe de comportarse de la siguiente manera: la progenie de la cepa silvestre de la téttrada Fi debe de segregarse en patrones 2:2, 3:1 y 4:0 como lo hizo la progenie de la cruce CN34 x CN31, ya que todas las combinaciones de la Tabla 6 son posibles para esta cruce. Sin embargo, cuando la progenie provenga de las mutantes sencillas la segregación debe de ser 2:2 ya que al mantener siempre una de las mutaciones constante, sólo puede segregarse con un patrón 2:2.

REFERENCIAS

1. Sanwal, B.D., and M. Lata. Arch. Biochem. Biophys. 97: 582, 1962
2. Pateman, J.A. Biochem. J. 115: 769, 1969
3. Tempest, D.W., Meers, J.L. and Brown, C.M. Biochem J. 117: 405, 1970
4. Dean, D.R. and Aronson, A.I. J. Bact. 141: 958, 1980
5. Senior, P.J. J. Bacteriol. 123: 407, 1975
6. Hummelt, G. and Mora, J. Biochem. Biophys. Res. Comm. 92: 127, 1980
7. Hummelt, G. and Mora, J. Biochem. Biophys. Res. Comm. 96: 1688, 1980
8. Calderón, J., Morett, E., and Mora, J. J. Bact. 161: 807, 1985
9. Loomnitz, A., Hernández, G., Calderón, J. and Mora, J. (en preparación).
10. Hynes, M. J. Bact. 120: 1116, 1974
11. Kinghorn, J.R. and Pareman, J.A. J. Gen. Microbiol. 86: 294, 1975
12. Hernández, G., Sánchez-Pescador, R., Palacios, R., and Mora, J. J. Bact. 154: 524, 1983

13. Ferguson, A.R., Sims, A.P., J. Gen. Microbiol. 80: 159, 1974
14. Vichido, I., Mora, Y., Quinto, C., Palacios, R. and Mora, J., J. Gen. Microbiol. 106: 251, 1978
15. Sánchez, F., Campomanes, M., Quinto, C., Hansberg, W., Mora, J. and Palacios, R. J. Bact. 136: 880, 1978
16. Palacios, R. J. Biol. Chem. 251: 4787, 1976
17. Dávila, G., Lara, M., Guzmán, J. and Mora, J. Biochem. Biophys. Res. Comm. 92: 134, 1980
18. Lara, M., Blanco, L., Campomanes, M., Calva, E., Palacios, R., and Mora, J., J. Bacteriol. 150: 105, 1982
19. Hernández, G., Mora, Y. and Mora, J., J. Bact. 165: 133, 1966
20. Rovell, O., S. Enticott, and W.P.D. Stewart, New Phyto 179: 41, 1977
21. Kapoor, M., and D. Bray, Biochemistry, 7: 3583, 1968
22. Holzer, H., and Schneider, S., Biochem Z. 43: 87, 1957
23. Mazon, M.J., and Hemmings, B.A. J. Bact. 139: 686, 1979
24. González, A., Olivera, H., Rodríguez, L., Soberón, M. J. Gen. Microbiol. 135: 2565, 1985
25. Drillien, R.M. Lacroute, F., J. Bact. 109: 203, 1972

26. Grenson, M., Dubois, E., and Piotrowska, M.
Mol. Gen. Genet. 128: 73, 1974
27. Drillien, R., Aigle, M., F. Laucroute. Biochem.
Biophys. Res. Comm. 53: 367, 1973
28. Dubois, E., Grenson, M., Biochem. Biophys. Res.
Com. 60: 150, 1974
29. Mitchell, A.P. and Magasanik, B., J. Biol. Chem.
258: 119, 1983
30. Legrain, C., S., Vissers, E. Dubois, Legrain, M., and
J.M. Wiame Eur. J. Biochem. 123: 611, 1982
31. Mitchell, A.P. and Magasanik, B., J. Biol. Chemistry,
259: 12054, 1984
32. Roon, J.R., Harvey, L., and Larimore, F.J. Bact.,
118: 89, 1974
33. Lowry, O.H., Roseburg, N.J., Farr, A.L., and Randall,
R.J. J. Biol. Chem. 193: 285, 1951.