

03069
lej. 2



Universidad Nacional Autónoma de México

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y
POSTGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN SOBRE FIJACIÓN
DE NITRÓGENO

PAPEL DE LA GLUTAMINA SINTETASA
DURANTE LA FORMACIÓN DEL MICELIO
AEREO EN NEUROSPORA CRASSA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA
P R E S E N T A

MARIA ELENA CARDENAS CORONA

CUERNAVACA, MOR.

1983

**TESIS CON
PALLA 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.

I N D I C E

INTRODUCCION.

- Ciclo de vida asexual de <i>Neurospora crassa</i>	1
- Sistemas experimentales de aerealogénesis y conidiación.	4
- Algunos aspectos de la fisiología de la esporulación	6
- Degradación de proteínas durante la esporulación	6
- Metabolismo nitrogenado durante la esporulación	9
- Asimilación de NH_4^+ en <i>N. crassa</i>	13

OBJETIVOS DE ESTE ESTUDIO.

17

MATERIALES Y METODOS.

- Copas	18
- Condiciones de cultivo	18
- Crecimiento del micelio aéreo	19
- Extracción y determinación de glucógeno	19
- Experimento de pulso y caza	20
- Determinación de CO_2 radioactivo	20
- Fraccionación celular	21
- Determinación del amonio extracelular.	22
- Determinación de aminoácidos	23
- Actividades enzimáticas	23
- Sedimentación de la GS en gradientes de sacarosa	25

- Immunoprecipitación de la GS	25
- Electroforésis	26

RESULTADOS.

- Crecimiento del micelio aéreo	27
- Catabolismo del glucógeno y las proteínas del micelio vegetativo durante la aerealogénesis	28
- Utilización de los esqueletos de carbono derivados del catabolismo protéico.	32
- Pozas de aminoácidos durante la aerealogénesis	36
- Disminución de algunas pozas de aminoácidos del micelio vegetativo y su efecto sobre la aerealogénesis.	36
- Asimilación de amonio durante la aerealogénesis.	45
- Formas oligoméricas e isozimas de la GS durante la aerealogénesis.	50
- Vías alternas de síntesis del ácido glutámico en el micelio aéreo	53

<u>DISCUSION.</u>	57
-------------------	----

<u>CONCLUSIONES</u>	70
---------------------	----

<u>PERSPECTIVAS</u>	73
---------------------	----

<u>REFERENCIAS</u>	74
--------------------	----

INTRODUCCION

CICLO DE VIDA ASEJUAL DE *Neurospora crassa*.

El ciclo de vida asexual de *Neurospora crassa* puede visualizarse como un modelo conveniente para el estudio de la diferenciación celular. Algunos de sus atractivos derivan de los siguientes hechos: es un organismo eucariote sencillo, para el cual se han desarrollado en el laboratorio métodos de crecimiento en medios definidos; la secuencia de desarrollo es relativamente simple, produce estructuras bien definidas (1), fáciles de separar y en cantidades suficientes para su análisis bioquímico; *N. crassa* está bien caracterizada desde el punto de vista genético, se cuenta con cerca de 2,000 mutantes, de las cuales algunas son morfológicas (2). Dado que *N. crassa* ha sido uno de los organismos más estudiados, se cuenta con mucha información acerca de los mecanismos bioquímicos que pudieran estar involucrados en los procesos de diferenciación celular. Esto incluye entre otras cosas: regulación de la expresión genética (3), análisis fisiológicos (4) y compartimentación celular (5).

El ciclo de vida asexual de *N. crassa* se puede visualizar como la expresión de dos programas mutuamente excluyentes (Fig. 1). Un programa de crecimiento y un programa de esporulación. El programa de crecimiento se inicia con la hidratación y la activación metabólica de las conidias. En presencia de algunas sales y cofactores la conidia metabólicamente activa forma tubos de germinación en uno o en ambos de sus polos. Si además existen en el medio ambiente fuentes de nitrógeno y carbono adecuadas, el tubo

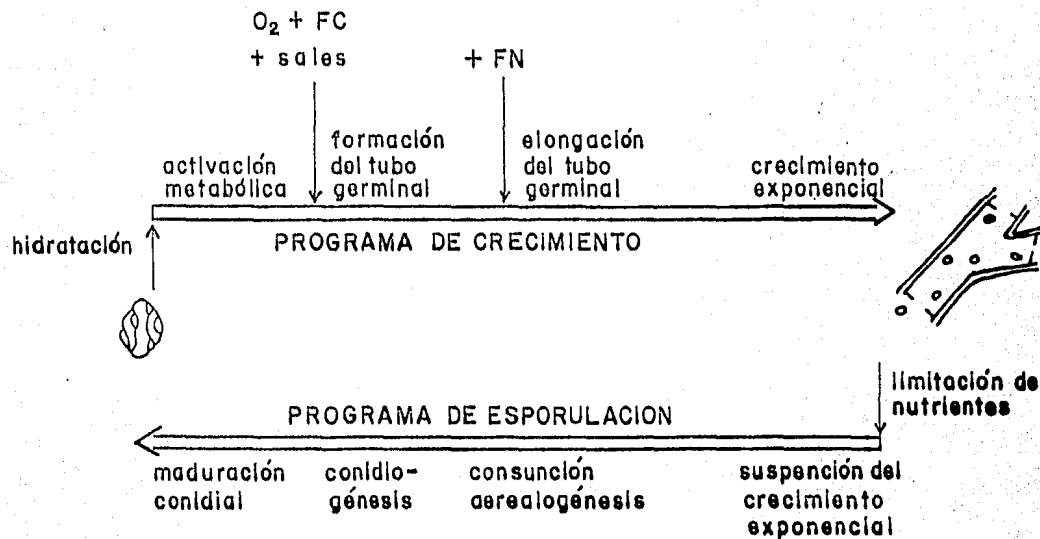


Fig. 1. Ciclo de vida asexual de *Neurospora crassa*, visualizado como la expresión de dos programas mutuamente excluyentes. FC y FN, significan fuente de carbono y de nitrógeno, respectivamente.

germinal se alarga apicalmente, crece vegetativamente de una manera exponencial y posteriormente se ramifica. Si pequeñas cantidades de micelio en crecimiento vegetativo se transfieren periódicamente a medio fresco, es posible mantener este tipo de crecimiento indefinidamente (2).

El programa de esporulación de *N. crassa* se establece cuando en el medio escasean los nutrientes y su desarrollo es más rápido en ausencia total de ellos. En estas condiciones el micelio suspende su crecimiento vegetativo y las hifas se alargan hacia el ambiente aéreo en dirección perpendicular a las hifas vegetativas. De este modo de crecimiento se ha derivado el nombre de micelio aéreo o hifa aérea (6). La formación de las hifas aéreas puede considerarse como parte del programa de esporulación. Las hifas aéreas se han aislado y algunas de sus propiedades son distintas de las hifas vegetativas (7). El micelio aéreo crece ramificándose y a continuación sus puntas se transforman en conidióforos con trenes de gemas en forma de rosario. A continuación ocurre una activa división de los núcleos y migración de los mismos hacia las gemas de los conidióforos. Posteriormente el conidióforo se septa (6) y cada conidia queda separada del resto mediante un par de septos de pared, de manera que las conidias solo quedan unidas entre sí por un anillo de pared celular. Las conidias producidas son en su gran mayoría macroconidias o conidias multinucleadas. Finalmente las conidias se deshidratan y basta un movimiento o una corriente de aire para que se desarticulen y puedan diseminarse. Pero antes de poder iniciar un nuevo ciclo de vida vegetativo en un medio ambiente adecuado las conidias deben pasar por un período de maduración de aproximadamente tres días (8).

SISTEMAS EXPERIMENTALES DE AEREOGENESIS Y CONIDIACION.

Uno de los problemas principales en el estudio de los procesos de aereologénesis y conidiación ha sido el desarrollo de sistemas de formación de micelio aéreo y conidiación. La mayoría de los cultivos esporulantes en condiciones sumergidas normalmente son heterogéneos en estados y estructuras, de tal manera que los análisis bioquímicos obtenidos de éstos representan una suma de varios estados fisiológicos. Para contender con esta dificultad se ha buscado introducir sincronía al desarrollo morfológico. En varios sistemas de esporulación, *Aspergillus niger* (9), *Penicillium digitatum* (10) y *Neurospora crassa* (11, 12 y 13), entre otros, se ha logrado sincronizar la conidiación por variaciones en la temperatura y nutrientes o por manipulaciones en otras condiciones de cultivo. Sin embargo debe tomarse especial cuidado en distinguir si los fenómenos observados se deben a los procesos de diferenciación en sí, o a las condiciones en que se producen. Aún cuando el proceso de esporulación se encuentre sincronizado, es conveniente la separación física de las distintas estructuras y que el sistema experimental produzca cantidades suficientes de ellas para su análisis bioquímico. Por último es de importancia que las conidias generadas en los sistemas experimentales sean viables y que preserven la capacidad de reproducir el ciclo de vida vegetativo.

La conidiación puede inducirse inmediatamente después de la germinación de la conidia, de tal manera que existe un período mínimo de crecimiento vegetativo. A este fenómeno se le ha llamado microciclo de conidiación. Tal modo de conidiación ha sido desarrollado con fines experimentales para varios microorganismos (para revisión ver la referencia 14), entre ellos *N. crassa*.

En este sistema las conidias se someten 16 horas a una temperatura de 36°C en un medio de cultivo líquido normal y posteriormente se incuban a 25°C en un medio con baja fuente de carbono y de nitrógeno. En estas condiciones las conidias germinan después de 3 horas a 25°C, a las 10 horas el tubo germinal deja de crecer y se comienzan a formar gemas que se separan como conidias a las 24 horas de incubación (15). En este sistema es difícil discernir si los cambios observados están determinados por el tratamiento a temperatura alta que no permite el crecimiento, por la incubación en un medio limitante en la fuente de carbono y de nitrógeno ó si los cambios son intrínsecos al proceso de conidiación. Tampoco ha sido descrito si las conidias formadas en líquido son equivalentes a las formadas en el micelio aéreo y si son capaces de germinar y formar colonias normales.

Un sistema interesante para el estudio de la esporulación es la experimentación con las mutantes de *N. crassa* que, en cultivos sólidos con determinados medios de cultivo, alternan períodos de crecimiento y de conidiación. Son mutantes en el gene *band* que manifiestan un auténtico ritmo circadiano, ésto es, un ritmo que tiene duración cercana a un día, que no es afectado apreciablemente por la temperatura, que se sincroniza con ciclos de luz y oscuridad y que persiste cuando la cepa se mantiene en la oscuridad (16 y 17). La duración del ritmo de la mutante *band* es a la vez alterada por otras mutaciones que afectan la composición celular de lípidos y algunas funciones mitocondriales (18). Por esta razón se ha propuesto que las mitocondrias, pueden tener algún papel en la regulación del período del ritmo circadiano. Estos datos, aunados al hecho de que la mutante *band* conidia abundantemente sin que se requiera emplear condiciones

que induzcan la conidiación, hacen pensar que el estudio de las mutantes *band*, puede ayudar al entendimiento de los mecanismos celulares implicados en la conidiación de *N. crassa*.

Se han descrito otros dos sistemas de sincronización de la conidiación en *N. crassa* (12 y 13). En estos sistemas el micelio vegetativo, obtenido del crecimiento de cultivos en medio líquido, es incubado a 25°C (12) ó a 30°C (13), en ausencia de nutrientes y en contacto directo con el aire. En estas condiciones se forma micelio aéreo que mas tarde conidia sincrónicamente. Utilizando estos cultivos se han estudiado algunas enzimas (19 y 20), así como mutantes que tienen algún bloqueo a distintos niveles de la conidiogénesis y la septación (21 y 22). Estos sistemas ofrecen la posibilidad de analizar los procesos involucrados en la formación del micelio aéreo y las conidias, a expensas del micelio vegetativo. El sistema de Stine y Clark (12) permite la separación de conidias, micelio aéreo y micelio vegetativo. De éste último es posible aislar la capa de micelio vegetativo que se encuentra en contacto directo con el aire; las hifas que lo componen aparecen más agregadas que las del resto del micelio vegetativo. Por otra parte, las estructuras resultantes de la diferenciación se producen en suficiente cantidad y las conidias obtenidas tienen un alto porcentaje de viabilidad.

ALGUNOS ASPECTOS DE LA FISILOGIA DE LA ESPORULACION.

I. DEGRADACION DE PROTEINAS DURANTE LA ESPORULACION.

La degradación de proteínas constituye uno de los principales eventos asociados a la esporulación de los microorganismos estudiados como son

Saccharomyces (2) *Blastocladiella* (24), *Bacillus* (25) y *Dictyostelium* (26)

Ya que la esporulación ocurre, entre otros factores, como una respuesta a la limitación de nutrientes, la proteólisis durante este proceso pudiera proveer aminoácidos para la síntesis de las proteínas, nucleótidos y otros compuestos nitrogenados requeridos durante la esporulación (27). Además existen evidencias experimentales de que la degradación de proteínas podría controlar la secuencia morfogénica durante la esporulación a distintos niveles: participando en la regulación del metabolismo intermediario por inactivación específica de algunas enzimas; en el procesamiento de precursores de proteínas específicas de la esporulación y por último, aunque no ha sido demostrado, contribuyendo a la adquisición de dormancia metabólica mediante la degradación de los citocromos de la membrana mitocondrial interna (27).

En *Blastocladiella emersonii* la esporulación es bloqueada por antipaína, un inhibidor de proteinasas alcalinas. Dicho efecto no es reversible y la esporulación es sensible al inhibidor solo durante los primeros 60 minutos del proceso, sugiriendo un papel crítico de las proteinasas alcalinas durante este período inicial (24).

Durante la esporulación de *Saccharomyces cerevisiae* se ha detectado un incremento, con respecto al crecimiento vegetativo de 10 a 25 veces en la actividad específica de varias proteasas. Este incremento es debido a síntesis *de novo* ya que es bloqueado por cicloheximida. Cuando cultivos no esporogénicos de cepas α/α se inocularon en medio de esporulación, no se observó incremento en la actividad proteolítica, lo cual indica que el incremento en la actividad de dichas enzimas es específico de la esporulación y no de las condiciones que la indujeron (27). Aunque la esporulación en

levadura no es sensible a la mayoría de los inhibidores de proteinasas probados (28), si es afectada parcialmente por mutaciones que resultan en la ausencia de proteinasas A y B (29 y 30). Mutantes estructurales de *S. cerevisiae*, que carecen de las actividades de las carboxipeptidasas S y Y y proteinasa B, pierden por completo la capacidad de esporular (31).

Durante la formación del cuerpo fructífero en *Dictyostelium discoideum* se ha observado incremento en las actividades de la leucina aminopeptidasa (32) y de algunas proteasas, activas a pH 7.5 (33), también se ha detectado la aparición de una nueva forma de proteinasa ácida (34). Fong y Bonner (35) observaron que la diferenciación se bloquea con inhibidores de la degradación de proteínas como cloroquina, lupeptina y antipaína. El efecto de los inhibidores se revirtió adicionando aminoácidos, por lo que dichos autores sugieren que las actividades proteolíticas inhibidas, son responsables de suplir a la célula con aminoácidos durante el proceso de esporulación.

En varias especies de *Bacillus*, la tasa de degradación de proteínas es baja durante el crecimiento vegetativo. Sin embargo esta tasa se incrementa varias veces durante la esporulación (25) dando por resultado la degradación del 15 al 20% de la proteína inicial. Una mutante temperatura sensible que es incapáz de esporular a la temperatura restrictiva, presenta una reducción en el recambio de proteínas durante la esporulación (36).

En *B. subtilis* la actividad proteolítica puede ser un punto de control importante en el metabolismo intermediario durante la esporulación: Inmediatamente antes de la esporulación, se ha observado una degradación

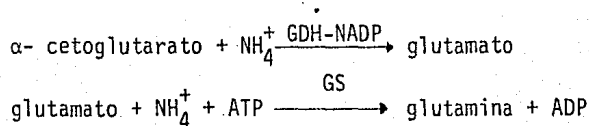
selectiva de la aspartato transcarbamilasa y de la fosforibosilpirofosfatoamidotransferasa, enzimas que participan en el metabolismo de nucleótidos (37 y 38). También la proteólisis durante la esporulación de *B. Subtilis* participa en el procesamiento de proteínas específicas de la esporulación: Se ha visto el procesamiento de polipeptidos, identificados como precursores de proteínas de la pared de la espora. Una mutante que muestra un reducido valor de procesamiento parece ser el resultado de una mutación en el gene de una proteasa. Las esporas producidas por esta mutante germinan pobremente (39).

En *N. crassa* la posible relación de proteasas con el proceso de esporulación no ha sido explorada.

II. METABOLISMO NITROGENADO DURANTE LA ESPORULACION.

Poco se conoce acerca del metabolismo nitrogenado de los microorganismos en proceso de esporulación. Los estudios reportados a la fecha se han hecho principalmente en *S. cerevisiae* (40,41 y 42), *B. Subtilis* (43, 44, 45) y *B. megaterium* (46, 47 y 48).

En *S. cerevisiae* la asimilación de NH_4^+ ocurre principalmente mediante la vía:



La primera reacción, en la cual se sintetiza glutamato, es una aminación reductiva del α -cetoglutarato catalizada por la glutamato deshidrogenasa biosintética dependiente de NADP (GDH-NADP). La reacción opuesta, la

desaminación del glutamato, también se lleva a cabo en levaduras y es catalizada por la glutamato deshidrogenasa catabólica dependiente de NAD (GDH-NAD).

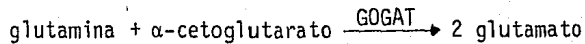
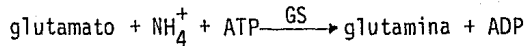
En la segunda reacción, mediante la glutamina sintetasa (GS), se fija NH_4^+ en glutamato para producir glutamina. También se ha reportado en *S. cerevisiae* la presencia de la enzima amido transferasa-NADP oxidoreductasa, glutamato sintasa (GOGAT) pero debido a su baja actividad, 1% de la actividad de la GDH-NADP, se duda de que participe en la asimilación del NH_4^+ (49).

La esporulación sexual en levaduras se produce entre otros factores, como respuesta a la deprivación o a la limitación severa de las fuentes de carbono, nitrógeno o fósforo (42). En ausencia o limitación de las fuentes de carbono o fósforo (42), concentraciones bajas de NH_4^+ (2-5mM) y de glutamina (4-7.5mM) inhiben la formación de esporas sexuales (40). Por otra parte, glutamato a una concentración de 40 mM no causó ninguna inhibición de la esporulación (41). Las actividades de la GDH-NADP y de la GS, así como las pozas de glutamato y de glutamina, se midieron en condiciones de esporulación en ausencia y presencia de NH_4^+ . La poza de glutamato disminuye durante la esporulación en ausencia de NH_4^+ en el medio, la poza de glutamato se incrementa y la actividad de la GDH-NADP disminuye (41). Estos datos podrían interpretarse en el sentido de que NH_4^+ y/o glutamato reprimen a la GDH-NADP. La baja actividad de la GDH-NADP detectada en presencia de NH_4^+ no parece estar relacionada con la represión de la esporulación observada en estas condiciones, ya que mutantes con una actividad residual de GDH-NADP, menor del 1%, muestran una esporulación normal y son sensibles a NH_4^+ (50). Estos

estudios descartan a la enzima GDH-NADP y al glutamato como posibles mediadores del efecto inhibitorio del NH_4^+ . Por otra parte, al inicio de la esporulación la poza de glutamina disminuye notablemente y la actividad de la GS se incrementa hasta en un 160%. En presencia de NH_4^+ la poza de glutamina se incrementa y la actividad de la GS permanece constante. Estos datos, y el hecho de que mutantes que carecen de la actividad de GS no esporulan (mencionado en la 41 como comunicación personal de E. Dubois y J.M. Wiame), sugieren que la enzima GS tiene una importante participación durante el proceso de esporulación.

Con base en estos estudios no es posible distinguir si la inhibición de la esporulación por el NH_4^+ es mediada en última instancia por glutamina, ó si el NH_4^+ y la glutamina actúan independientemente. Tampoco queda claro cual es el papel de la GS durante la esporulación.

B. subtilis y otras especies de *Bacillus* carecen de la actividad de la GDH biosintética, en estos microorganismos la fijación de NH_4^+ se efectúa únicamente mediante la GS en la siguiente vía metabólica:



El glutamato en esta vía se sintetiza a partir del α -cetoglutarato y el nitrógeno amido de la glutamina en una reacción catalizada por la GOGAT.

De manera similar a *S. cerevisiae*, la esporulación de *B. megaterium* se produce cuando existe una limitación de nutrientes en el medio. La esporulación en esta bacteria es inhibida en presencia de buenas fuentes de

carbono y de nitrógeno, así NH_4^+ más glucosa inhiben casi completamente la esporulación. Sin embargo NH_4^+ ó glucosa por sí solos no ocasionan este efecto (43).

Una mutante de *B. megaterium* con baja actividad de GS esporula normalmente y es insensible a glucosa más NH_4^+ . La esporulación de esta mutante tampoco se reprimió en presencia de glutamato en el medio de esporulación, sin embargo, fué totalmente reprimida en presencia de glutamina. Por otra parte una mutante que carece de la actividad de GOGAT mostró muy bajos valores de esporulación en medios con o sin NH_4^+ más glucosa. Los autores de este trabajo discuten que éste efecto pudo ser ocasionado por acumulación de glutamina, aunque no muestran el dato (46). Sin embargo ésto pudiera ser factible si el glutamato requerido para la acumulación de glutamina proviene de transaminaciones. Ryu y Takayanagi estudiaron la esporulación de una mutante de GOGAT de *B. subtilis*, y encontraron que esta mutante esporuló normalmente, lo cual sugiere que la actividad de esta enzima no se requiere para la esporulación (44). En vista de la contradicción de éstos resultados, no se puede dar una conclusión acerca de la participación de la GOGAT en el proceso de esporulación. Sin embargo, si se puede concluir que la represión de la esporulación en *B. megaterium* es causada por glutamina o por un producto de glutamina, pero no de glutamato.

Estudios posteriores indicaron que el efecto represor de glutamina sobre la esporulación en *B. megaterium*, requiere de la vía biosintética de purinas, ya que la esporulación de una doble mutante defectiva en la actividad

de GS y que requiere purinas para crecer, no es reprimida por glutamina y sí por adenina más glutamina (47).

ASIMILACION DE NH_4^+ EN *N. crassa*.

En *N. crassa* la asimilación de NH_4^+ en glutamina ocurre mediante dos vías: Durante el crecimiento vegetativo en exceso de NH_4^+ , glutamina se sintetiza mediante la GDH-NADP y la GS; cuando en el medio de cultivo el NH_4^+ es limitante, éste se asimila a través de la GS y la GOGAT (51).

En *N. crassa* existen dos GDHs, la biosintética (GDH-NADP) y la catabólica (GDH-NAD). La GDH-NADP es un hexámero, formado por subunidades iguales de un peso molecular de 48 000 (52). La actividad de esta enzima se induce en presencia de fuentes de nitrógeno inorgánico como NH_4^+ y NO_3^- . Sin embargo, la actividad de la GDH-NADP disminuye cuando la fuente de nitrógeno es glutamato, glutamina (53) ó NH_4^+ más un aminoácido del cual se pueda obtener glutamato por transaminación (54). Por otra parte, se vió que los cambios en la actividad de la GDH-NADP, en NH_4^+ , NO_3^- , glutamato y glutamina corresponden a cambios en la concentración de la misma, los cuales están dados por ajustes en la velocidad de síntesis de la enzima (53). También existe una regulación positiva de la GDH-NADP causada por la fuente de carbono, o sea, que en presencia de altas concentraciones de glucosa o fructuosa en el medio de cultivo, la enzima aumenta su actividad. Contrariamente a la GDH-NADP, la GDH-NAD reprime su actividad cuando la concentración de la fuente de carbono en el medio es alta. Sin embargo, esta represión puede ser suprimida cuando aparte de la concentración de carbono se adiciona glutamato al medio; en estas condiciones se observa un incremento en la

actividad de esta enzima (55).

La regulación de la GS de *N. crassa* ha sido estudiada en presencia de sus sustratos y productos. En exceso de NH_4^+ ó en glutamina la actividad de la enzima es baja. El crecimiento del hongo en glutamina es ligeramente mejor que en NH_4^+ . En glutamato como fuente de nitrógeno, se observó un aumento en la actividad de la GS. Este aumento no ocurre si además de glutamato se adiciona glutamina al medio. Glutamato no es una buena fuente de nitrógeno, ya que en estas condiciones *N. crassa* mostró una velocidad de crecimiento menor a la observada en exceso de NH_4^+ (56). En estas tres condiciones nitrogenadas la GS mostró una forma oligomérica de octámero (56 y 57). Por otra parte, se vió que las diferencias en la actividad de la enzima correspondieron a diferencias en la concentración de la misma (56). Así mismo, se observó que la fuente de nitrógeno reguló la velocidad de síntesis de la GS (58) mediante la regulación de los niveles de ARNm específico (59). Los datos anteriores y el hecho de que en las condiciones en donde la actividad de la GS se vió reprimida también se detectó una poza alta de glutamina (56), permitieron concluir que glutamina regula su propia síntesis y que esta regulación es ejercida a nivel de la transcripción de la GS (59 y 60).

En cultivos limitados de NH_4^+ , por alimentación continua (feed batch), *N. crassa* mostró un crecimiento lineal. En estas condiciones la actividad de la GS se encontró inducida y con una forma oligomérica que correspondió a un tetramero. En estos cultivos se detectó una poza alta de α -cetoglutarato junto con pozas bajas de glutamina y glutamato. Por otra parte, la limitación en la fuente de carbono en un medio con exceso de NH_4^+ , previno la inducción

en la actividad de la GS (57). Con base en estos datos y la observación de que una mutante deficiente en la GDH-NADP crecida en exceso de NH_4^+ mostró una actividad alta de GS, se concluyó que la fuente de carbono ejerce un control positivo sobre la GS (57). La ausencia total de la fuente de carbono condujo a la degradación de la enzima (61). Si aparte de la fuente de carbono se priva de la fuente de nitrógeno, se observa, además de la degradación de la GS, degradación del resto de las proteínas y el cultivo excreta NH_4^+ al medio (61).

La GS de *N. crassa* ha sido purificada a homogeneidad (62) y se ha visto que esta enzima está constituida por dos polipéptidos, α y β (63). Cuando el tetrámero, obtenido de un extracto de la cepa silvestre crecida en limitación de NH_4^+ , se inmunoprecipitó con anticuerpos para la GS, el resultado obtenido mostró que el tetrámero estuvo compuesto preferencialmente de monómeros α (64). Este dato, y el hecho de que la mutante *gln-1a*, que sólo tiene el tetrámero, sea capaz de crecer en un medio con NH_4^+ limitado, confirmó que la forma tetramérica de la GS fija NH_4^+ a bajas concentraciones (65 y 66). Por otra parte, la inmunoprecipitación del octámero de la GS, obtenido de un extracto de la cepa silvestre crecida en exceso de NH_4^+ , mostró que este oligómero está compuesto preferencialmente de monómeros β . Con ésto se concluyó que en exceso de NH_4^+ , este es fijado por la GS octamérica compuesta principalmente por monómeros β (64). Posteriormente se observó que la síntesis de β es regulada por la fuente de nitrógeno; siendo alta en glutamato, intermedia en NH_4^+ y muy baja en glutamina (51). La síntesis *in vivo* de α y de β , correlacionaron con la

síntesis obtenida en un sistema de traducción *in vitro* dependiente de ARNm de *N. crassa* (51).

Hummelt y Mora (67) reportaron que la cepa *am-1*, defectiva en la actividad de la GDH-NADP, fué capaz de crecer y acumular glutamato de manera similar a la cepa silvestre en medio limitado de NH_4^+ ; no así la doble mutante *am-1; gln-1a* defectiva en las enzimas GDH-NADP y GS. Estos datos condujeron a estos investigadores al descubrimiento (67) y purificación (68) de la enzima GOGAT de *N. crassa*. La actividad de la enzima en cuestión se encontró alta en cultivos crecidos en NO_3^- o limitados de NH_4^+ , pero su actividad fué reprimida en cultivos con exceso de NH_4^+ , y no se detectó en presencia de NH_4^+ más glutamato o en un medio con glutamina (68). Posteriormente Lara et al (51) observaron que cultivos crecidos en exceso de NH_4^+ mostraron una actividad alta de la GDH-NADP y una actividad baja de la GOGAT; cuando estos cultivos se cambiaron a medio limitado de NH_4^+ , la actividad de la GDH-NADP se reprimió y la GOGAT se incrementó.

Con base en los resultados mencionados se concluyó que, en exceso de amonio, éste es asimilado mediante las enzimas GDH-NADP y GS octamérica compuesta por monómeros β ; cuando el NH_4^+ es limitante, la enzima que lo asimila es la GS tetramérica compuesta de monómeros α y el glutamato es sintetizado a través de la actividad de la GOGAT.

OBJETIVOS DE ESTE ESTUDIO

En el laboratorio estamos interesados en el estudio de los procesos de diferenciación que ocurren a lo largo del ciclo vegetativo de *N. crassa*, y en este caso particular en la transformación del micelio vegetativo a micelio aéreo. Dado que en *N. crassa* la aerealogénesis y conidiación ocurren como respuesta a la privación de nutrientes, el micelio aéreo crece a expensas del micelio vegetativo; nos hemos planteado las siguientes preguntas:

¿ Cuales son los constituyentes celulares del micelio vegetativo que participan como fuente de energía, carbono y de nitrógeno para nutrir el proceso de aerealogénesis ?

Durante el crecimiento en fase exponencial y prestacionaria *N. crassa* acumula aminoácidos (69), ¿ Son estos aminoácidos indispensables para la aerealogénesis ?

¿ Cual es la vía de asimilación de amonio en los micelios vegetativos superior e inferior y en el micelio aéreo ?

El sistema de aerealogénesis y conidiación que se ha elegido para la obtención del micelio aéreo es el de Stine y Clark (12), cuyas ventajas, en parte ya han sido mencionadas y serán discutidas más adelante.

MATERIALES Y METODOS

Cepas.

A lo largo de este trabajo se utilizaron las cepas *prol-3*, *gln-1b*, *am-1*; en *am-1*, *trp-2* y *arg-3*, auxótrofos de prolina, glutamina, glutamato, triptofano y arginina, respectivamente. Estas cepas fueron obsequiadas por el Dr. J. Mora.

Condiciones de cultivo.

Para la obtención de conidias, las cepas se crecieron en medio mínimo N de Vogel (70) sólido, suplementado con sacarosa al 1.5% (p/v) (MM-sacarosa). En los cultivos de los auxótrofos *prol-3*, *am-1*; en *am-1*, *trp-2* y *arg-3*, se adicionó al medio prolina 200 µg/ml, glutamato 5mM y alanina 200 µg/ml, indol 50 µg/ml y arginina 100 µg/ml respectivamente, mientras que para el auxótrofo de glutamina, se omitió del medio el NH_4NO_3 y se sustituyó por glutamina 10 mM. Los cultivos se incubaron a 25°C durante 3 días en la obscuridad más 2 días en la luz. Las conidias se cosecharon con agua destilada y se filtraron a través de lana de vidrio. Con la suspensión conidial se inoculó el MM-sacarosa, o MM-sacarosa sin NH_4NO_3 para la *gln-1b* suplementado con el aminoácido o precursor del aminoácido requerido. El inóculo se ajustó a 0.05 DO/ml. El medio inoculado se incubó durante 12-15 h a 25°C con un flujo continuo de aire húmedo. En algunos experimentos después de crecer los cultivos por 12 h, éstos se filtraron y transfirieron a MM-sacarosa sin el aminoácido requerido y la incubación se continuó

por 2 h más. En algunos casos la cepa *gln-1b* se transfirió a MM-sacarosa sin NH_4NO_3 y con metionina sulfoximina 0.5 mM. Después de 30 min de incubación en este medio, el cultivo se dividió en 8 fracciones iguales, las cuales se filtraron por separado y se resuspendieron en MM-sacarosa ó en MM-sacarosa en el cual el NH_4NO_3 se substituyó por glutamina 5 mM, glutamato 10 mM, arginina 2.5 mM, triptofano 5 mM, guanosina 2 mM, glucosamina 10 mM ó una mezcla de todas las aminas más adenosina 2 mM, histidina 3.3 mM y asparagina 5 mM. Los cultivos se incubaron 30 min más y después se privaron de nutrientes para inducir la aereolación.

Crecimiento del Micelio Aéreo.

Se filtraron 300 ml de cultivo a través de papel filtro Whatman No. 41. La mata micelial se lavó con 100 ml de agua fría y 100 ml de amortiguador de fosfatos 0.03 M. pH 6.1 (12). Después de eliminar el exceso del amortiguador, la mata micelial se transfirió a una caja Petri y se incubó en una cámara a 28°C de temperatura y una humedad relativa de 80%. Cada 3 h se sacó de la cámara una caja Petri, se cosechó el micelio aéreo usando una espátula y luego la capa superior de la mata micelial (menos del 10%) se separó del resto del micelio vegetativo. Los 3 micelios se colectaron en agua fría y se utilizaron directamente para algunas determinaciones, o alternativamente, el micelio se filtró a través de papel filtro Whatman No. 1, y se deshidrató con acetona (polvos de acetona). Los polvos de acetona se almacenaron a -20°C hasta su uso para las determinaciones enzimáticas.

Extracción y Determinación de Glucóneno.

Fracciones de 0.3 g de micelio vegetativo de la cepa *prol-3* se

homogeneizaron en 4 ml de una solución de ácido tricloracético (TCA) al 10%. Los homogeneizados se centrifugaron a 4°C, 15 min a 4,000 x g. Los sobrenadantes se precipitaron con 2 volúmenes de etanol frío y los precipitados se colectaron por centrifugación. A continuación, estos se resuspendieron en 0.5 ml de agua destilada y se centrifugaron a 4°C 20 min a 16,000 x g. Los sobrenadantes resultantes se precipitaron nuevamente agregando 2 volúmenes de etanol frío (71) y los precipitados de glucógeno se disolvieron en 1 ml de H₂SO₄ 0.5 M. A continuación, el glucógeno se colocó en ampolletas selladas al vacío y se hidrolizó a 100°C durante 10 h. La glucosa liberada se cuantificó por el método de la glucosa oxidasa usando el equipo analítico de Boehringer (72).

Experimento de Pulso y Caza.

A un cultivo de 11 h de la cepa *prol-3* se le adicionó 0.3 µCi/ml de 14C - leucina, uniformemente marcada y se incubó durante 15 min. Después se filtró rápidamente el cultivo, y el micelio se transfirió a medio fresco y se cultivo por 1 h más. Una muestra de 10 ml de cultivo se filtró, se lavó con abundante agua destilada y se fraccionó como se indica más adelante. El resto del micelio se privó de nutrientes y se colocó en condiciones para formar micelio aéreo.

Determinación del CO₂ radioactivo.

La incubación del cultivo radioactivo durante la aereologénesis, se efectuó en una cámara sellada, a través de la cual se hizo pasar una corriente de aire húmedo. El aire proveniente de la cámara se burbujó a través de una serie de tres trampas conteniendo cada una 16 ml de NaOH 2.5 N.

Las trampas se cambiaron cada 3 h y se determinó la radioactividad retenida en cada una de ellas. Para ello se tomaron alícuotas de 2 ml y se precipitaron con 8 ml de una mezcla 3: 5 de BaCl_2 1.5N y NH_4Cl 2N (73). Los precipitados se lavaron 2 veces con 8 ml de agua destilada y se resuspendieron en 1 ml de agua. Muestras de 50 μl se secaron sobre papel filtro Whatman 540 y se contaron en un espectrofotómetro de centelleo líquido marca Packard Tri Carb Modelo 3390.

Fraccionación Celular.

Alícuotas de micelio vegetativo o aéreo se homogeneizaron en 1 ml de UMSDT (Urea 9.5 M, 2-mercaptoetanol 1 M, NaCl 0.5 M, NP-40 2%, desoxicolato de sodio (SDS) 0.5%, dodecil sulfato de sodio 0.25% en Tris-HCL 10 mM pH 7.4). Este amortiguador se empleó para lograr una efectiva solubilización de las proteínas, y se diseñó en base a los amortiguadores de lisis usados por O'Farrell (74) y por Hansberg et al (60). El homogeneizado se centrifugó a 25°C durante 15 min a 3,600 $\times g$. La pastilla resultante se homogeneizó nuevamente con el mismo volumen de UMSDT. Después de centrifugar nuevamente la pastilla se lavó 2 veces con 1 ml de agua fría y posteriormente los lavados se repitieron 3 veces empleando para ello etanol al 30%, 70% y 98% (75). La pureza de la fracción de pared celular obtenida en el precipitado después de lavar con etanol, se juzgó con base en su bajo contenido de proteína (menos del 6% del contenido de proteína en la muestra homogeneizada), y por la casi indetectable cantidad de radioactividad solubilizada con un lavado adicional de metanol, éter o cloroformo.

Las fracciones solubilizadas con UMSDT y agua se juntaron y se precipitaron

con TCA a una concentración final del 10% y se centrifugaron a 4 000 xg durante 30 min a 4°C. Del sobrenadante resultante, el glucógeno se precipitó con etanol, como se describió anteriormente. Al precipitado se le adicionaron 5 μ l de una solución de FMSF (fenil metil sulfonilfluoruro 3.5 mg/ml de etanol), y después se incubó con 50 μ g/ml de ARNasa (ARNasa pancreática la cual fué disuelta en Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, conteniendo MgCl 5 mM; previamente hervida) (74). Después la mezcla se incubó y se precipitó con 10 volúmenes de ATA (acetona: trietilamina: ácido acético 90:5:5) (76) durante 1 h a 4°C. Después de centrifugar, los precipitados resultantes se secaron al vacío y se trataron con 50 μ g/ml de ADNasa (ADNasa pancreática disuelta en Tris-HCl, pH 7.4 conteniendo MgCl 1 mM) (74). Esta mezcla de reacción se incubó a 25°C durante 10 min y se precipitó con ATA. Después de centrifugar el precipitado se lavó con 1 ml de acetona y se secó al vacío. La radioactividad no precipitada por el ATA, después de cada tratamiento enzimático, se consideró como marca incorporada en ARN y ADN. La marca detectada en el precipitado se consideró como marca incorporada en proteína. De cada fracción se tomó una alícuota y se secó en un filtro Whatman 540. Los filtros se colocaron en viales de centelleo, conteniendo 10 ml de PPO-tolueno (4 g/l), y se contaron en un espectrofotómetro de centelleo líquido.

Determinación del Amonio Extracélular.

El micelio vegetativo inferior se resuspendió en 100 ml de agua destilada y se filtró. Del filtrado resultante se tomaron 10 ml y se ajustaron con HCl 1N a un pH de 4.5. Después se agregó 0.1 ml de NaOH 10M, y el NH_4^+ así liberado se midió utilizando un electrodo con una membrana específica para éste compuesto

(electrodo Orion, Cambridge, Mass., U.S.A.).

Determinación de Aminoácidos.

Una muestra de micelio conteniendo alrededor de 5 mg de proteína, se hirvió en etanol al 80%. Las muestras se enfriaron, se homogeneizaron y se filtraron a través de filtros Millipore RA, 1.2 μ m. Los filtrados se liofilizaron y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Las muestras se disolvieron con agua deionizada a una concentración final de 1 mg de proteína por ml. Los aminoácidos se separaron en un analizador de aminoácidos Aminco y se cuantificaron usando un fluorómetro después de su acoplamiento a o-ftaldialdehído.

Actividades Enzimáticas.

Los polvos de acetona se trituraron con hielo seco, se resuspendieron en el amortiguador adecuado según la enzima ensayada y luego se homogeneizaron a 4°C . Los homogeneizados se centrifugaron y se midieron las actividades de cada enzima, tanto en el sobrenadante como en el precipitado. La cantidad de enzima extraída en el sobrenadante fué mayor al 90%. La actividad de la glutamina sintetasa (EC 6.3.1.2) se ensayó según el método descrito por Ferguson y Sims (77). La actividad específica se expresó como μ moles de γ -glutamilhidroxamato producido en 1 min a 30°C por mg de proteína. Las actividades de las glutamato-deshidrogenasas, dependiente de NADP (EC 1.4.1.4) y dependiente de NAD (EC 1.4.1.2), se midieron siguiendo espectrofotométricamente la oxidación de las coenzimas como lo describe Fincham (78). La actividad de la glutamato sintasa (EC 1.4.7.1) se midió siguiendo el método de Boland y Benny (79), adaptado por Hummelt y Mora (67). Las actividades específicas para las enzimas

glutamato deshidrogenasas y glutamato sintasa se expresaron como μ moles de coenzima oxidada en 1 min a 25°C por mg de proteína. La actividad de la alanina transaminasa (EC 2.6.1.2) se midió como reportaron Firtel y Brackenbury (32), excepto que el amortiguador de tricina se sustituyó por amortiguador de fosfatos 0.1M. La formación de piruvato se midió en un exceso de la enzima lactato deshidrogenasa y la reacción se siguió midiendo la oxidación del NADH a 340 nm. La actividad específica de esta enzima se expresó como μ moles de coenzima oxidada en 1 min a 37°C por mg de proteína. La actividad de la glutamina transaminasa (EC 2.6.1.15) se determinó midiendo la desaparición del complejo enol-borato-fenilpiruvato a 300 nm como reportaron Kupchik y Knox (80), en este método se incluyó una modificación que consistió en adicionar al ensayo 0.2 mM de fosfato de piridoxal (Calderón, J. y Mora, J. Manuscrito en preparación). La actividad específica se expresó como μ moles de complejo desaparecido en 1 min a 37°C por mg de proteína. La actividad de la glutaminasa (EC 3.5.1.2) se ensayó midiendo la aparición de ^{14}C -ácido glutámico a partir de ^{14}C -glutamina. Los extractos libres de células se prepararon a partir de polvos de acetona o de micelio fresco. La reacción se corrió en diferentes amortiguadores con pHs en el rango de 5 a 9 y adicionando activadores de glutaminasa como fosfato, ATP, GTP (84), AMP_c y glutamato (85). Todos los activadores se probaron a una concentración de 10 mM, ya sea preincubandolos, a 4°C durante 60 min, con el extracto o adicionandolos directamente a la reacción (85). La mezcla de reacción se incubó a 30 o 37°C durante 30 o 60 min y la reacción se paró con ácido perclórico. El glutámico y la glutamina se separaron por cromatografía en papel y se cuantificaron como indican Kuamme y Olsen (86).

Las proteínas se cuantificaron por el método de Lowry et al (87).

Sedimentación de la GS en Gradientes de Sacarosa.

Los extractos libres de células se prepararon a partir de polvos de acetona, homogeneizando 0.1 g de polvo en 1 ml de amortiguador de extracción para la GS: K_2PO_4 50 mM; ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5 mM, pH 7.2. Alícuotas de 400 μ l de estos extractos se colocaron sobre gradientes continuos de sacarosa de 5 a 20% (p/v), disuelta en el amortiguador de extracción. Después de centrifugar a 4°C por 12 h a 280 000 xg en un rotor Beckman SW-40, los gradientes se colectaron en fracciones de 375 μ l y se ensayó la actividad de la GS (transferasa) en cada una de las fracciones.

Inmunoprecipitación de la GS.

El procedimiento que se utilizó para la inmunoprecipitación de la GS fue el descrito por Palacios et al (88) con algunas modificaciones. Los extractos libres de células se prepararon en amortiguador A: imidazol 50 mM; glutamato de sodio 50 mM; $MgSO_4$ 80 mM; K_2SO_4 50 mM; EDTA 0.5 mM, pH 7.1. Alícuotas con 5 mg de proteína, se inmunoprecipitaron con 6.4 μ g de anticuerpos anti-GS. Después de incubar a 4°C durante 60 min, se adicionaron 40 μ g de anti-globulina de cabra obtenida en conejo, el volumen final de la reacción fue de 264 μ l inmediatamente después de adicionar el segundo anticuerpo, la mezcla fue dividida en dos y colocada sobre gradientes discontinuos de sacarosa, preparados en tubos eppendorf: 100 μ l de sacarosa 1 M y 50 μ l de sacarosa 0.5 M en amortiguador A conteniendo 1 mg/ml de albumina de suero bovino. Después de centrifugar los gradientes a 4°C durante 8 min a 13 000 xg, se congelaron en hielo seco. Las

puntas de los tubos, conteniendo los inmunoprecipitados, se cortaron y los inmunoprecipitados se procesaron para analizarlos mediante electroforésis.

Electroforésis.

Los inmunoprecipitados se disolvieron en 20 μ l de una solución con SDS 2%; β -mercaptoetanol 2%; EDTA 2 mM; glicerol 10% y azul de bromofenol en amortiguador de Tris-HCL pH 6.8. A continuación las muestras se hirvieron durante 3 min. La electroforésis en geles de acrilamida con SDS y urea (63), se corrió como indica Laemmli (89). Los geles se fijaron y tiñeron con una solución de metanol 30%, ácido acético 10% y azul brillante de coomasie 0.06%. Una vez teñidos y desteñidos, los geles se cortaron para determinar las cantidades relativas de los polipeptidos α y β de la GS en los distintos carriles, midiendo su absorción luminosa a 680 nm en un espectrofotómetro Beckman serie 30, modelo 35, equipado con un graficador.

RESULTADOS

I. CRECIMIENTO DEL MICELIO AEREO.

Cuando el micelio vegetativo de *N. crassa*, obtenido del crecimiento en fase exponencial o preestacionaria de cultivos en medio líquido, es colocado en ausencia de nutrientes y en contacto con el aire, rápidamente forma micelio aéreo. Después de 3 hrs. de incubación, la capa superior de la mata micelial, en contacto directo con el aire se encuentra totalmente cubierta de micelio aéreo. Durante las próximas 12 hrs. el micelio aéreo crece rápidamente y 2 hrs. después conidia. En este tiempo las hifas de la parte superior del micelio vegetativo forman una capa difícil de disgregar, que en lo sucesivo llamaré micelio vegetativo superior. A medida que progresa la aerealogénesis esta capa va engrosando y es fácil separarla del resto del micelio vegetativo (micelio vegetativo inferior). Al final el micelio vegetativo superior representa alrededor del 10% de la proteína del micelio vegetativo total. La formación del micelio vegetativo superior parece estar estrechamente relacionada con la formación del micelio aéreo: cultivos en los que la aerealogénesis se retarda, también se retarda formación del micelio vegetativo superior.

En este sistema, la aparición y el crecimiento del micelio aéreo ocurren de una manera sincrónica (12). Las estructuras morfológicas generadas son perfectamente distinguibles y fáciles de separar, además se obtienen en cantidades suficientes para su análisis bioquímico: una mata micelial de aproximadamente 100 mg, extendida en una superficie de 43 cm², con un grosor aproximado de 4 mm, produce un promedio de 6 mg de micelio aéreo.

Las conidias obtenidas de estos cultivos son capaces de germinar y crecer de igual manera que las provenientes de cultivos sólidos (slants). El porcentaje de germinación de estas conidias fué de 93%, juzgado por el número de colonias obtenidas a los 6 días de incubación en un medio con agar y sorbosa. Cuando las conidias fueron inoculadas en medio mínimo de Vogel, crecieron con un tiempo de duplicación de 2.5 h y el micelio resultante volvió a conidiar con la misma eficiencia con la que conidia un cultivo obtenido a partir de conidias de slants.

Dado que uno de los objetivos de este trabajo es determinar como influye sobre la formación del micelio aéreo la disminución del nivel de algunas pozas de aminoácidos, particularmente la de glutamina, con fines comparativos se decidió utilizar como control a algún auxótrofo de un aminoácido cuyo bloqueo no sea en la vía biosintética de glutamina. Por esta razón en la mayoría de los experimentos que a continuación se presentan excepto en los indicados, se utilizó la cepa *prol-3*.

II. CATABOLISMO DEL GLUCOGENO Y LAS PROTEINAS DEL MICELIO VEGETATIVO DURANTE LA AEREALOGENESIS.

Durante el crecimiento en fase exponencial el micelio de *N. crassa* acumula glucógeno (Fig 2 y referencia 71). Dado que en este sistema experimental el micelio aéreo se produce a expensas del micelio vegetativo, hemos analizado la relación que guarda la fuente de carbono en forma de glucógeno con la aerealógenesis. Con este propósito se analizó la formación del micelio aéreo a partir de micelios vegetativos con alto, moderado y bajo contenido de glucógeno. El micelio obtenido en un crecimiento de 15 h en medio mínimo de Vogel, con 1.5% de sacarosa, presentó un contenido de glucógeno de 15mg/ gr

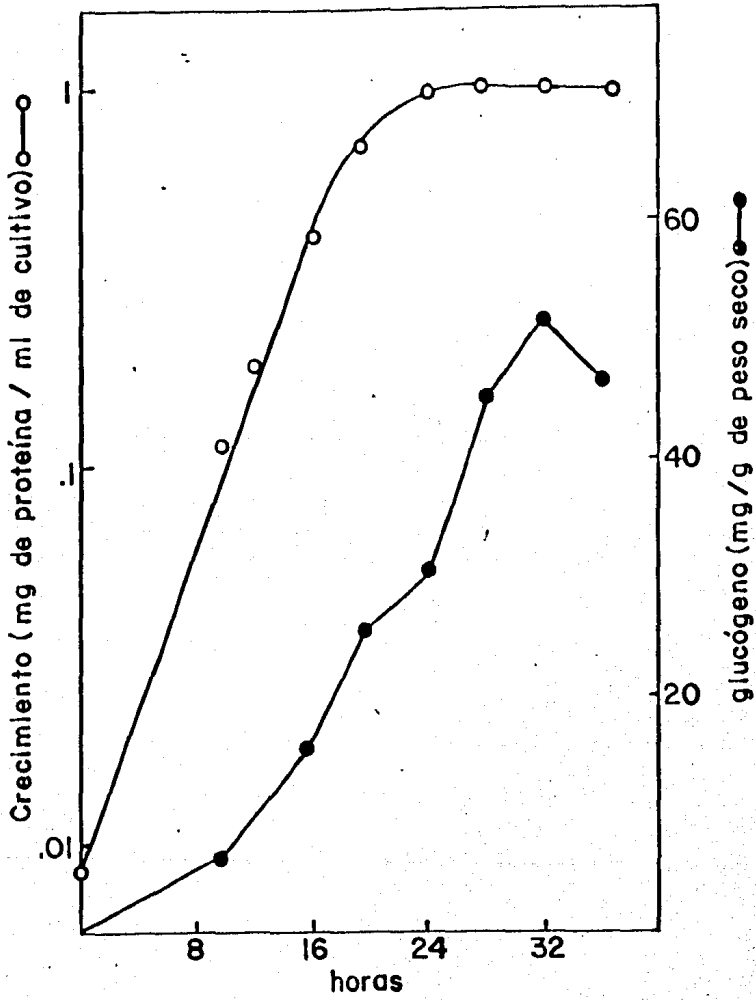


Fig. 2. Crecimiento y acumulación de glucógeno en el micelio vegetativo de un cultivo en MM de Vogel con 1.5% de sacarosa,

de peso seco (mg/gr ps), (micelio vegetativo con moderado contenido de glucógeno). Cuando el micelio vegetativo de 14 h de crecimiento en medio con un 1.5% de sacarosa se colocó 1 h en medio sin sacarosa, el glucógeno del micelio se degradó hasta tener 1.8 mg/gr ps (micelio vegetativo con bajo contenido de glucógeno). El micelio vegetativo con alto contenido de glucógeno, se obtuvo creciendo al organismo durante 35 h en medio con 2% de sacarosa. Cuando los micelios vegetativos con moderado y bajo contenido de glucógeno se colocaron en condiciones de aerealogénesis, rápidamente formaron micelio aéreo en igual cantidad (Fig. 3A). En el micelio con contenido moderado de glucógeno el 90% de éste se degradó en las primeras 3 h, y 5% en las próximas 9 h del período de incubación (Fig. 3B). En el micelio con bajo contenido de glucógeno éste disminuyó aún más, con mayor velocidad en las primeras 6 h que en el resto del período de incubación (Fig. 3B), posteriormente la degradación continuó pero con menor velocidad. En este cultivo el micelio aéreo apareció hasta las 4 h de incubación. No obstante este retraso y el crecimiento más lento (Fig. 3A), después de 23 h de incubación, la cantidad del micelio aéreo formada fué comparable a la producida en 15 h por los micelios vegetativos con moderado o bajo glucógeno. Los resultados anteriores indican que para la aerealogénesis no es indispensable la acumulación del glucógeno en el micelio vegetativo; por el contrario un alto contenido de glucógeno hace más lenta la formación del micelio aéreo. En los experimentos anteriores se observó una disminución en el contenido de la proteína en el micelio vegetativo. Con el fin de analizar más detalladamente este fenómeno se cuantificó la proteína del micelio vegetativo a distintos tiempos durante la aerealogénesis. Los cultivos con bajo o moderado glucógeno perdieron durante las 15 h de incubación 30 mg del total de su proteína

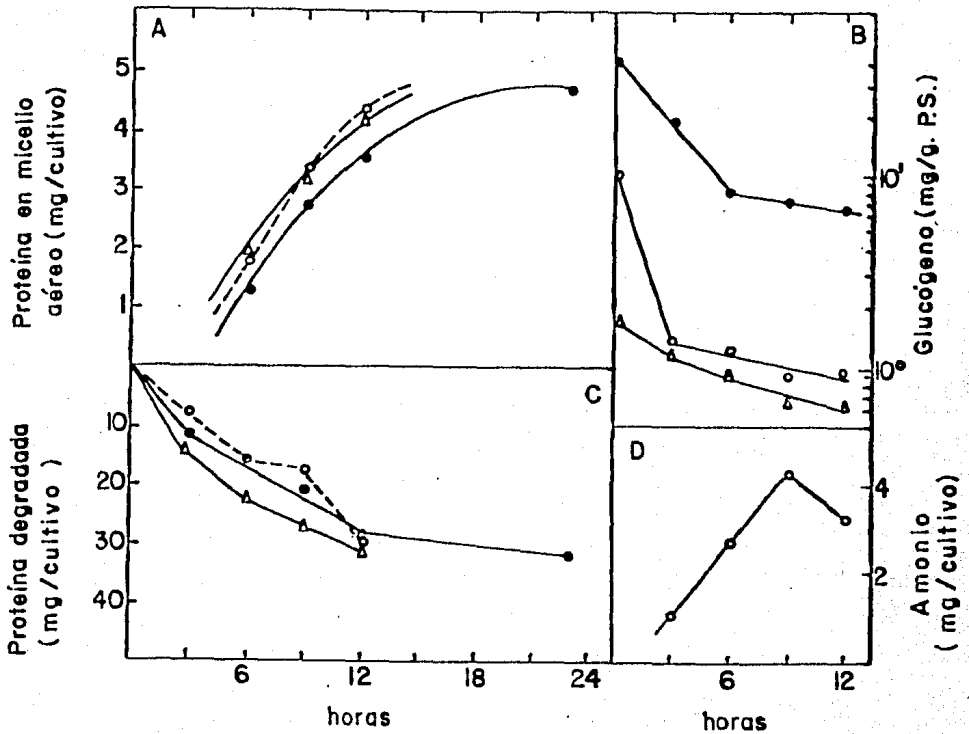


Fig. 3. Catabolismo del glucógeno y las proteínas del micelio vegetativo durante la aerealogénesis. A) Crecimiento del micelio aéreo a partir del micelio vegetativo con un contenido de glucógeno bajo (Δ), moderado (o) y alto (\bullet). Los resultados son promedio de 3, 10 y 6 experimentos, respectivamente. B) Glucogenólisis en el micelio vegetativo con bajo (Δ), moderado (o) y alto (\bullet) contenido de glucógeno. Los resultados son promedios de 3, 5 y 4 experimentos, respectivamente. C) Degradación de proteínas en el micelio con bajo (Δ), moderado (o) y alto (\bullet) contenido de glucógeno. Los resultados son promedios de 3, 8 y 5 experimentos, respectivamente. D) Excreción de amonio del micelio vegetativo con moderado contenido de glucógeno.

inicial (Fig. 3C). También en el micelio vegetativo con alto glucógeno se detectó una disminución de proteínas, la cual presentó una cinética similar a la de cultivos con bajo y moderado glucógeno (Fig. 3C). La cantidad inicial del micelio vegetativo, en un rango de 70-150 mg de proteína, no tiene ningún efecto sobre la magnitud del catabolismo proteico.

La degradación masiva de proteínas en el micelio vegetativo podría producir un exceso de NH_4^+ intracelular y tal vez la excreción de este compuesto. Debido a ello se lavó el micelio vegetativo del cultivo con moderado contenido de glucógeno, a distintos tiempos de la formación del micelio aéreo, y después de filtrar se analizó el contenido de NH_4^+ en el filtrado. El NH_4^+ se excretó al medio durante las primeras 9 h de incubación y en las siguientes 3 h se registró una ligera disminución en la cantidad de NH_4^+ extracelular (Fig. 3D).

III. UTILIZACION DE LOS ESQUELETOS DE CARBONO DERIVADOS DEL CATABOLISMO PROTEICO.

Los α -cetoácidos resultantes de la desaminación de los aminoácidos provenientes del catabolismo proteico podrían aportar, mediante su oxidación, parte de la energía requerida para la aereologénesis, o bien utilizarse como esqueletos de carbono para la síntesis de las estructuras requeridas para el proceso morfogénético. Para ver la distribución de los esqueletos de carbono provenientes del catabolismo proteico se efectuó un experimento de pulso y caza con ^{14}C -leucina. El pulso y la caza se dieron durante el crecimiento en líquido y a continuación el micelio se colocó en ausencia

de nutrientes y en contacto con el aire. En las condiciones en que se efectuó el marcaje, el 85% de la marca incorporada por el cultivo se detectó en proteínas, el 15% restante se localizó en pared y en la fracción soluble (Tabla 1). Al término de la aerealogénesis se analizó la distribución de la marca hacia otros constituyentes celulares del micelio vegetativo y del micelio aéreo. La proteína del micelio vegetativo perdió el 70% de la radioactividad inicialmente incorporada en ella, y la pared del micelio incrementó 3.6 veces su radioactividad con respecto a la radioactividad inicial (Tabla 1). En el micelio aéreo se encontró el 10% de la marca inicialmente incorporada por el cultivo (Tabla 1).

La radioactividad asociada al CO_2 liberado por el cultivo, se midió a distintos tiempos durante la aerealogénesis. A las 15 h de incubación el 20% de la marca inicialmente incorporada por el cultivo se recuperó como CO_2 (Tabla 1). La máxima liberación de CO_2 radioactivo, registrada entre las 6 y 9 h, correlacionó con la máxima velocidad de crecimiento del micelio aéreo; a medida que éste dejó de crecer también fué cesando la liberación de CO_2 radioactivo (Fig. 4).

La cantidad de marca perdida por la proteína (1.7×10^6 cpm) es semejante a la suma de la marca incorporada durante la aerealogénesis en las distintas estructuras del micelio vegetativo y micelio aéreo más la radioactividad liberada como CO_2 (1.5×10^6 cpm). A las 15 h de la aerealogénesis la suma de la marca en micelio vegetativo, micelio aéreo y CO_2 constituyó el 92% de la marca inicialmente incorporada por el cultivo (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de la radioactividad antes y después de 15 h de aerealogénesis. El micelio vegetativo en crecimiento exponencial, se marcó con un pulso corto de ^{14}C -leucina seguido por un período de caza y después de 15 h de aerealogénesis se analizó la distribución de la marca.

	ANTES DE LA AEREALOGENESIS		DESPUES DE LA AEREALOGENESIS			
	MV		MV'		MA	
	cpm	%	cpm	%	cpm	%
PROTEINA	2 632 728	84.95	927 347	29.92	167 895	5.42
PARED CELULAR	221 216	7.14	807 466	26.06	91 804	2.96
F. SOLUBLE	240 038	7.74	186 027	6.00	38 348	1.24
GLUCOGENO	4 183	0.13	3 369	0.11	708	0.02
ARN	736	0.02	1 209	0.04	1 131	0.04
ADN	166	0.00	1 537	0.05	111	0.00
TOTAL	3 099 067	100.00	1 926 955	62.18	300 033	9.68
CO ₂	624 720	20.17				
MV'+CO ₂ +MA	2 851 708	92.02				

Abreviaturas: MV, micelio vegetativo antes de la aerealogénesis; MV', micelio vegetativo después de 15 h de aerealogénesis; MA, micelio aéreo de 15 h de crecimiento y F. SOLUBLE, se refiere a la fracción soluble que es la mezcla de los sobrenadantes obtenidos después de precipitar con TCA y etanol y de lavar la fracción de pared celular.

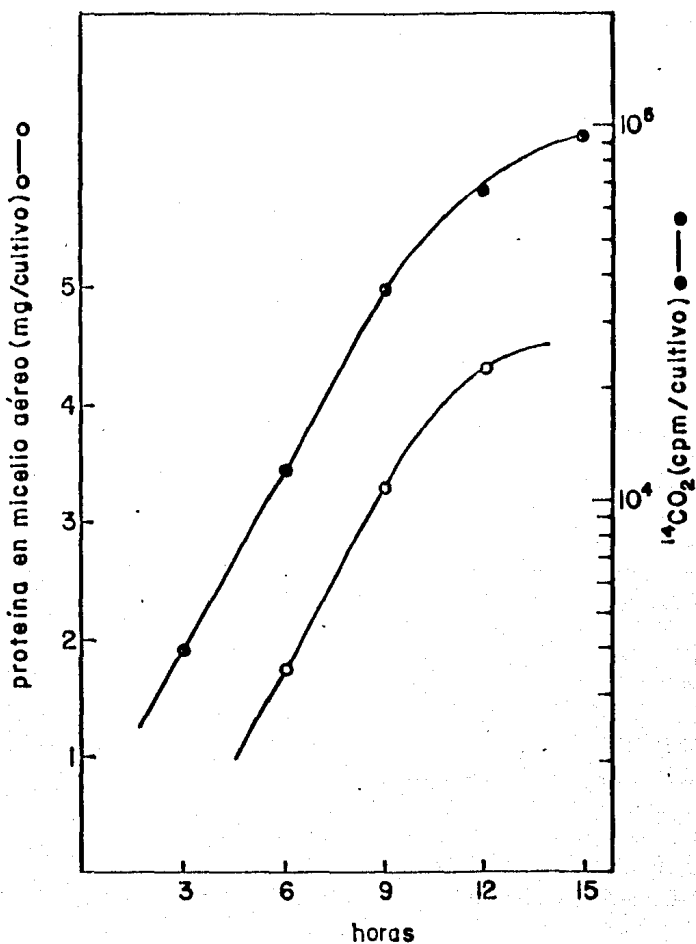


Fig. 4. Liberación de CO_2 radioactivo durante la aerealogénesis de un cultivo marcado preferencialmente en proteínas. La incorporación de la marca se realizó en un cultivo en medio líquido al final de la fase de crecimiento exponencial. El CO_2 liberado durante la aerealogénesis se atrapó en una solución alcalina, se precipitó como carbonato de bario y se contó su radioactividad. Liberación de CO_2 radioactivo (●) y crecimiento del micelio aéreo (○).

IV. POZAS DE AMINOACIDOS DURANTE LA AEREALOGENESIS.

Durante la fase del crecimiento prestacionaria en medio líquido, *N. crassa* acumula aminoácidos, preferencialmente glutamina y arginina (69). En la cepa *prol-3* a las 16 h de crecimiento, las pozas de aminoácidos más elevadas fueron: La de alanina que constituyó el 45% del total de aminoácidos, glutamina 20%, glutamato 14% y ornitina más arginina 14% (Fig. 5A). Al final de la aerealogénesis, los niveles de las pozas de aminoácidos en el micelio vegetativo han disminuido notablemente en comparación a los valores iniciales (Fig. 5B). Cuando se midieron las pozas a intervalos de 3 h durante el período de aerealogénesis, se observó que la mayoría de ellas disminuyeron con una velocidad semejante, sólo los niveles de glutamina y alanina durante las primeras 6 h bajaron más rápidamente que los demás aminoácidos y posteriormente disminuyeron a menor velocidad (Fig. 5C).

V. DISMINUCION DE ALGUNAS POZAS DE AMINOACIDOS DEL MICELIO VEGETATIVO Y SU EFECTO SOBRE LA AEREALOGENESIS.

Para determinar si para que la aerealogénesis ocurra es requerida la acumulación de aminoácidos en el micelio vegetativo, se probó la capacidad para formar micelio aéreo de algunos auxótrofos de aminoácidos, conteniendo una poza baja del aminoácido requerido. En la tabla 2 se muestran las pozas de aminoácidos de las cepas *prol-3*, *gln-1b*, *am-1*; en *am-1*, *arg-3* y *trp-2* antes y después de incubar sin el aminoácido requerido. En todos los auxótrofos, excepto en el de prolina (ya que nuestro sistema de análisis no detecta iminoácidos), después del ayuno se comprobó la disminución de la poza del aminoácido requerido.

La poza de glutamina en la cepa *gln-1b* disminuyó 7.6 veces cuando se privó de glutamina y fué 13.8 veces menor con respecto a la observada en la *prol-3*. Para depletar la poza de glutamato sin ocasionar una limitación de glutamina, se creció al auxótrofo *am-1*; en *am-1* en glutamina más alanina y después

Fig. 5. Pozas de aminoácidos en: A) el micelio vegetativo después del crecimiento prestacionario (16 h), B) el micelio vegetativo después de 15 h de aerealogénesis, C) el micelio aéreo después de 15 h de crecimiento y D) en el micelio vegetativo a distintos tiempos durante el período de aerealogénesis.

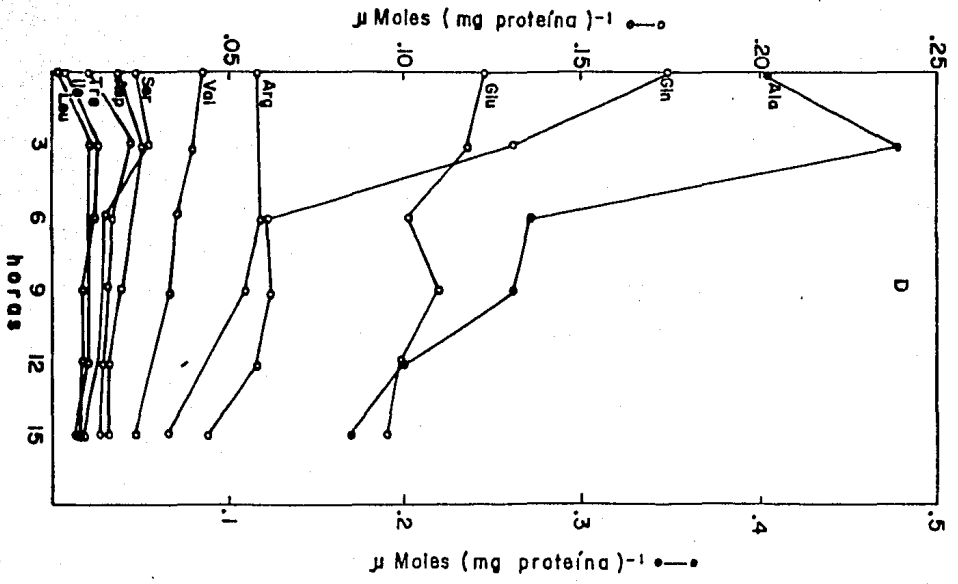
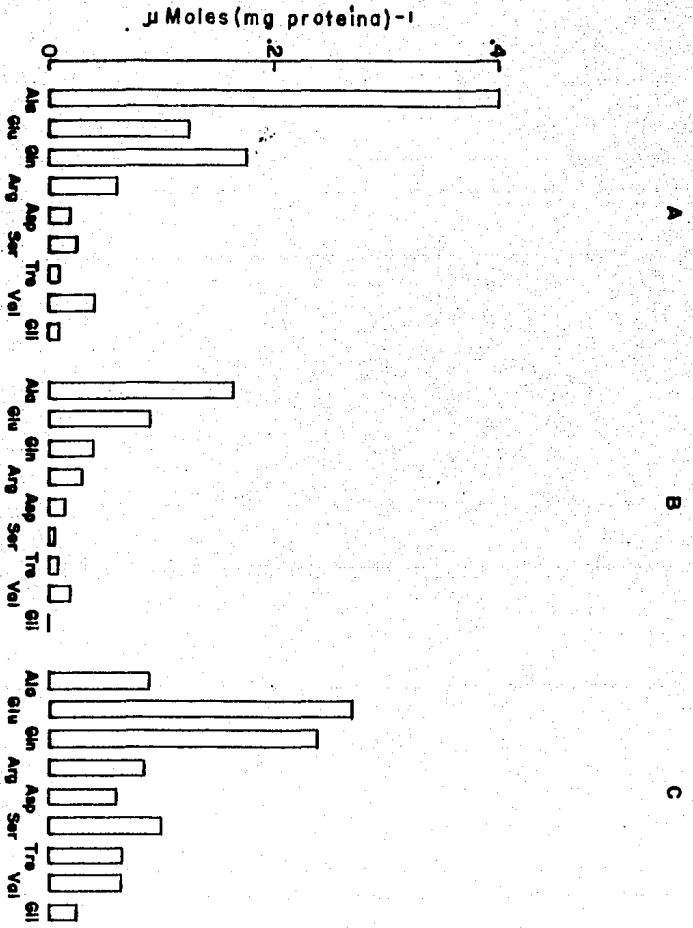


TABLA 2. Pozas de aminoácidos de varios auxótrofos de aminoácidos privados o no del aminoácido requerido. Los auxótrofos se crecieron por 12 h en MM-sacarosa con los aminoácidos requeridos, excepto la *gln-1b* que se creció en MM-sacarosa sin NH_4NO_3 más glutamina 5 mM. Los cultivos se dividieron en dos y se incubaron por 2 h en MM-sacarosa con o sin aminoácido. Las pozas de aminoácidos están expresadas como $\mu\text{moles (mg de proteína)}^{-1}$

Medio	<i>prol-3</i>		<i>gln-1b</i>		<i>an-1; en an-1</i>		<i>arg-3</i>		<i>trp-2</i>	
	NH_4^+ -pro	NH_4^+	Gln	NH_4^+	NH_4^+ -Ala-Gln	NH_4^+	NH_4^+ -Arg	NH_4^+	NH_4^+ -indol	NH_4^+
Glu	.151	-.167	.204	-.272	.057	-.033	.160	-.111	.164	-.205
Gln	.305	-.289	.159	-.021	.341	-.143	.193	-.125	.306	-.303
Ala	.410	-.303	.263	-1.167	.124	-.017	.183	-.147	.506	-.438
Trp	ND	-ND	ND	-ND	ND	-ND	ND	-ND	.010	-.003
Arg	.068	-.072	.057	-.023	.075	-.066	.044	-.027	.068	-.080

ND significa no detectado.

se privó de estos aminoácidos. Bajo estas condiciones la poza de glutamato fue 1.7 veces menor que la del cultivo no privado y 5 veces menor que la de la cepa *prol-3*. no obstante que la poza de glutamina disminuyó 2.3 veces, todavía se mantuvo acumulada. En la cepa *am-1*; en *am-1*, además de la poza de glutamato y glutamina, también bajo considerablemente la poza de alanina, 7.3 veces comparada con el cultivo no privado y 18 veces comparada con la cepa *prol-3*. La poza de arginina en el cultivo de la *arg-3* en ayuno de este aminoácido fue de 1.6 veces más baja que en el cultivo no privado y 2.7 veces menor que en la *prol-3*. La poza de triptofano sólo se detectó cuando la cepa *trp-2* se creció en indol, y disminuyó notablemente cuando la cepa se creció en ausencia de dicho precursor de triptofano.

Además de la disminución en las pozas de los aminoácidos requeridos se observó: que tanto en la cepa *gln-1b* como en la *am-1*; en *am-1* cuando se crecieron en glutamina y en glutamina-alanina- NH_4^+ , respectivamente; la poza de alanina fue baja, 1.5 y 3.3 veces menor que en la *prol-3*. Cuando se transfirieron a NH_4^+ , en la *gln-1b* la poza de alanina se incrementó 4.5 veces, no así en la doble mutante *am-1*; en *am-1*, en la cual la poza de alanina disminuyó aún más, 7.3 veces (tabla 2). En la *gln-1b* en ayuno de glutamina, además de la poza de este aminoácido también disminuyó la poza de arginina, 2.5 veces si se compara con el cultivo no limitado y 3.1 veces si se compara con la cepa *prol-3* privada de prolina (tabla 2).

Las cepas *prol-3*, *am-1*; en *am-1* y *trp-2* privadas, formaron 9%, 15% y 8% más micelio aéreo que cuando no fueron privadas. La *arg-3* y la *gln-1b* formaron 25% y 67% menos cantidad de micelio aéreo que la producida por el cultivo no limitado (Fig. 6). La *prol-3*, tratada con metionina

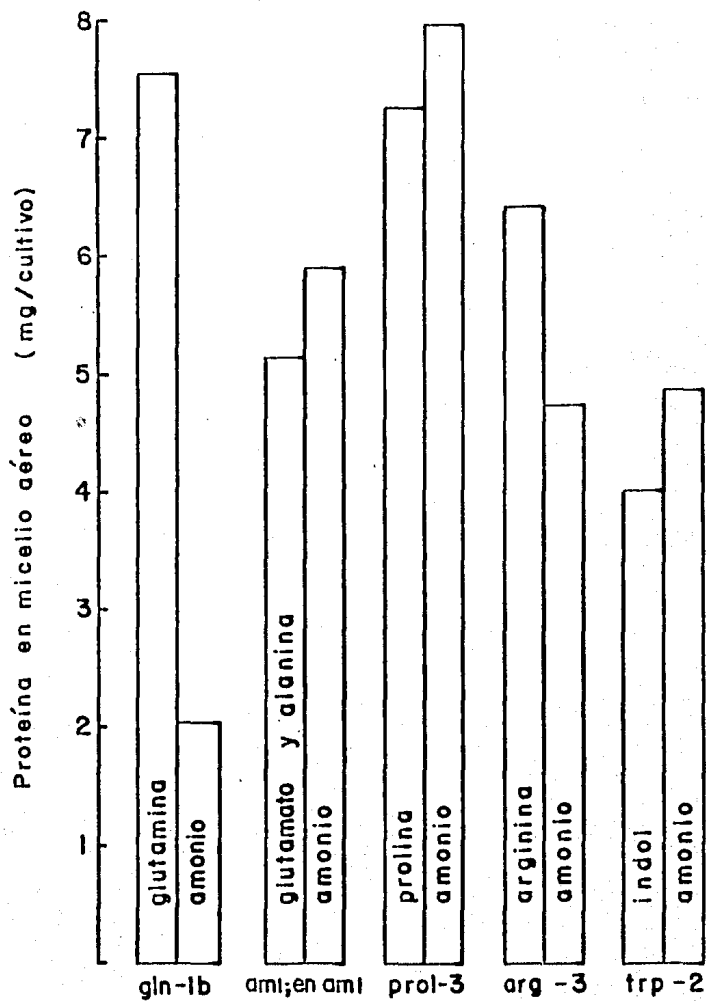


Fig. 6. Cantidad de micelio aéreo producido por varios auxótrofos de aminoácidos privados o no del aminoácido requerido. Las condiciones experimentales son las de la tabla 2. Los micelios aéreos se cosecharon a las 15 h de aerealogenésis. La primera barra para cada cepa representa la cantidad de micelio aéreo producido por el cultivo privado, la segunda, por el cultivo privado; ambas son el promedio de dos experimentos.

sulfoximina (MS) para inhibir la GS (90) y depletar la poza de glutamina, también produjo mucho menos cantidad de micelio aéreo que el cultivo no tratado. (dato no mostrado).

Al final de la aerealogénesis, la distribución de las pozas de aminoácidos en las cepas *am-1*; *en am-1*, *trp-2* y *arg-3*, privadas ó no del aminoácido requerido fueron similares a las de la *prol-3* no limitada. En la fig. 5A-C se presenta la distribución de las pozas en las distintas estructuras de la *prol-3* no limitada. En la cepa *am-1*; *en am-1*, no obstante de carecer de las actividades de la GDH-NADP y la GOGAT, y que el nivel de la poza de glutamato en el micelio vegetativo fue bajo durante el crecimiento prestacionario (Tabla 2 y fig. 7A), al final de la aerealogénesis la poza de este aminoácido aumentó en el micelio vegetativo y se acumuló en el micelio aéreo. La acumulación de glutamato fue mayor en el cultivo privado (Fig. 7B). En el escaso micelio aéreo formado por el cultivo de la *gln-1b* limitado de glutamina, los niveles de todos los aminoácidos fueron marcadamente más bajos que los observados en el cultivo no limitado (Fig. 8A y B)

La inhibición de la aerealogénesis en la cepa con baja poza de glutamina, podría deberse a la falta de alguno de los compuestos cuya biosíntesis depende de glutamina. Para descartar esta posibilidad, a cultivos de la cepa *gln-1b*, previamente tratados con MS para disminuir aún más la poza de glutamina, (Tabla 3), se les adicionó por separado algunos de los siguientes compuestos: NH_4^+ , glutamato, arginina, triptofano, glucosamina, guanosina y una mezcla de estas distintas aminas además de histidina, asparagina y adenosina. Al término de la incubación con los compuestos adicionados se midieron las pozas de aminoácidos, la poza de glutamina

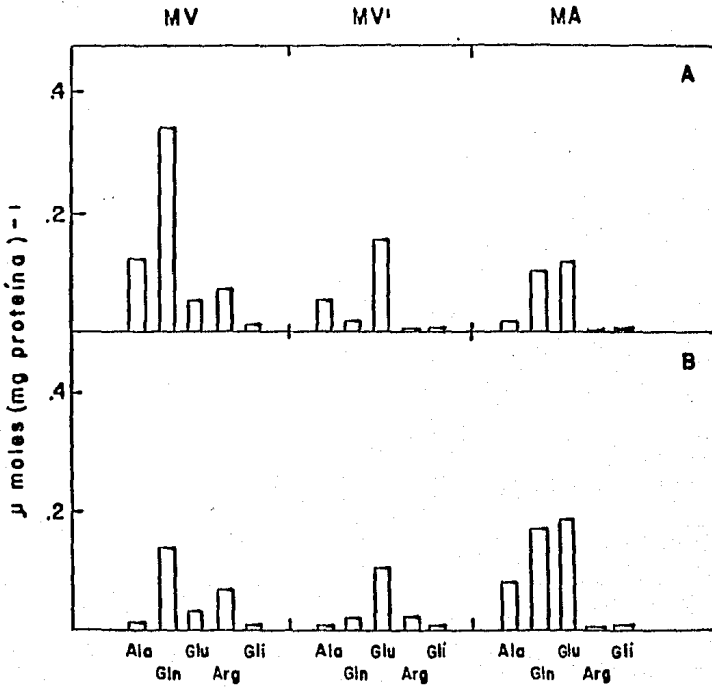


Fig. 7. Pozas de aminoácidos en la cepa *am-1*; en *am-1*. A) Cultivo no privado y b) cultivo privado de alanina y glutamina. Micelio vegetativo, antes (MV) y después (MV') de 15 h de aerealogénesis y micelio aéreo a las 15 h de crecimiento (MA).

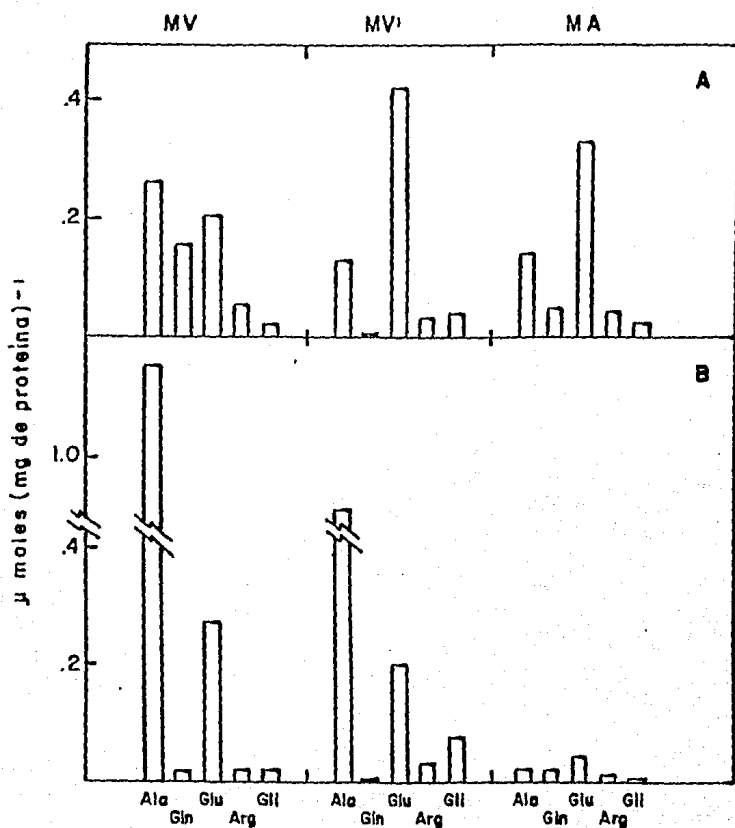


Fig. 8. Pozas de aminoácidos en la cepa *gln-7b*. A) Cultivo no privado y B) cultivo privado de glutamina. Micelio vegetativo (MV) antes de la aerealogénesis, micelio vegetativo inferior (MV') y micelio aéreo (MA) después de 15 h de aerealogénesis.

Tabla 3. Pozas de aminoácidos en la cepa *gln-1b* deprivada de glutamina e incubada en presencia de varias aminos. La cepa *gln-1b* se creció durante 12 h en MM-sacarosa sin NH_4NO_3 más 5 mM de glutamina (primera columna) y posteriormente se transfirió durante 30 min a MM-sacarosa con 0.5 mM de metionina sulfoximina (segunda columna). A continuación el cultivo se dividió en 8 fracciones iguales que se incubaron por 2 h en : MM-sacarosa (tercera columna), MM-sacarosa mas alguna de las aminos indicadas (cuarta a novena columna) y MM-sacarosa con la mezcla de estas aminos más histidina, asparagina y adenosina.

	*Gln	MS	NH_4^+	Gln	Glu	Arg	Trp	Guan.**	GluN.***	Mezcla
Glu	.205	.237	.268	.223	.398	.207	.204	.222	.230	.241
Gln	.159	.010	.024	.078	.017	.005	.007	.007	.020	.002
Ala	.274	.291	.729	.198	.437	.320	.319	.316	.296	.556
MS	-	.140	.023	.006	.016	.021	.009	.035	.020	.005
His	.095	.060	.058	.079	.082	.071	.067	.030	.058	.085
Trp	ND	ND	ND	ND	ND	ND	.486	ND	ND	.373
Orn	.047	.048	.044	.030	.051	.028	.042	.018	.034	.038
Arg	.057	.043	.043	.063	.054	.166	.072	.048	.034	.093

* Cultivo no deprivado de glutamina ni incubado con MS

** Guanosina

***Glucosamina

permaneció baja y cuando se adicionó a los cultivos glutamato, arginina, triptofano, glutamina y glucosamina por separado o en mezcla se notó un incremento en las pozas respectivas (Tablas 3, glucosamina no se muestra y nuestro sistema de análisis no detecta purinas). Ninguno de los compuestos probados ni la mezcla de todos restauró el crecimiento del micelio aéreo tan eficientemente como glutamina (Fig. 9).

V. ASIMILACION DE AMONIO DURANTE LA AEREOLOGENESIS.

Como se mencionó en la introducción, durante el crecimiento vegetativo en *N. crassa* el NH_4^+ es asimilado mediante dos vías biosintéticas: en exceso de NH_4^+ , éste se asimila mediante la GDH-NADP y el octámero de isozima β de GS; cuando el NH_4^+ es limitante, se asimila a través del tetrámero de la isozima α de GS y la GOGAT (51, 65). Para determinar cuales son las vías de asimilación del NH_4^+ en las distintas estructuras generadas durante la aereologénesis, se midieron las actividades enzimáticas de las dos vías a diferentes tiempos de incubación. En estos estudios las determinaciones se efectuaron en el micelio vegetativo en fase de crecimiento prestacionaria, en el micelio vegetativo capa inferior y superior, y en el micelio aéreo.

La actividad de la GDH-NADP es alta en el micelio de fase de crecimiento prestacionario, se mantiene alta en el micelio vegetativo inferior y decrece en el micelio vegetativo superior. A las 12 h de incubación la actividad es 7 veces menor en el micelio vegetativo superior que en el micelio en fase de crecimiento prestacionario o en el micelio vegetativo inferior. En el micelio aéreo se detectó una mínima actividad de la GDH-NADP

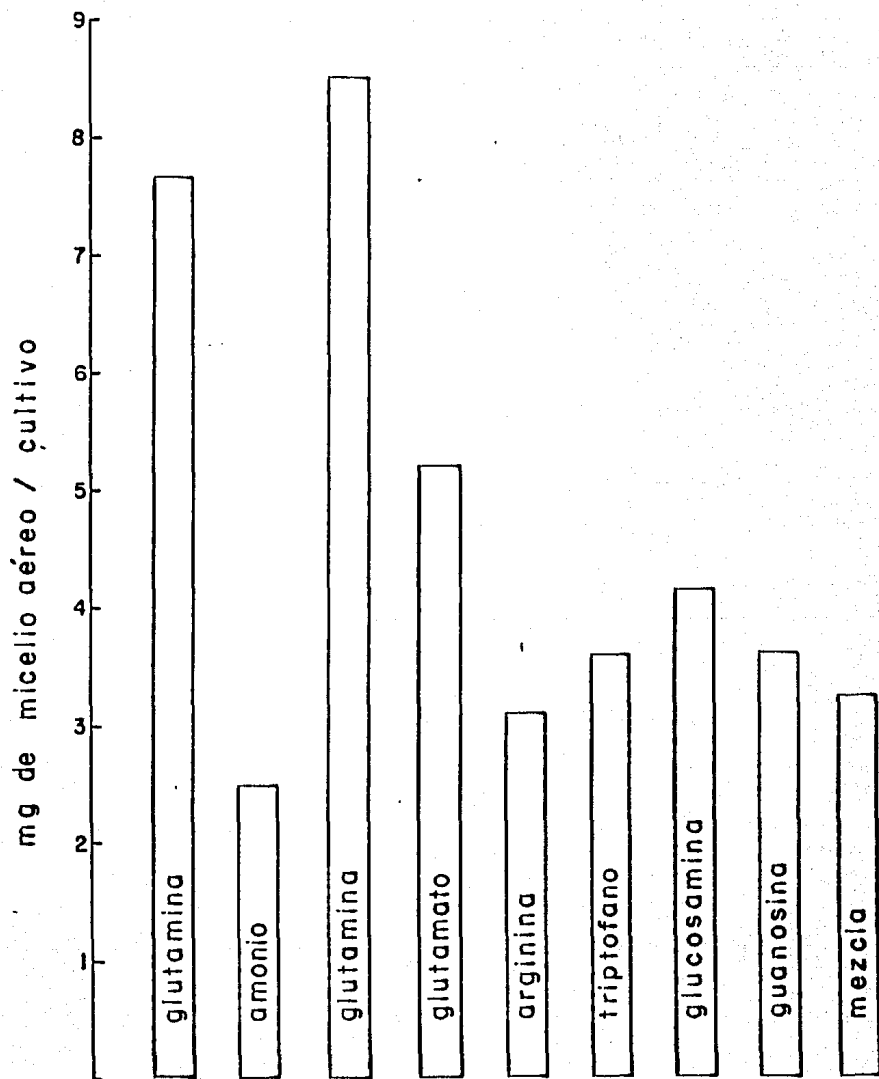


Fig. 9. Cantidad de micelio aéreo formada por la cepa *gln-1b* privada de glutamina e incubada en presencia de varias aminas. Las condiciones experimentales son las de la tabla 3. Después de las 15 h de aerealogénesis se cuantificó la cantidad de proteína del micelio aéreo. Cada barra es el promedio de dos experimentos.

(Fig. 10A). Se midió también la actividad de la glutamato deshidrogenasa catabólica (GDH-NAD), y en general se obtuvieron bajos valores de oxidación del NADH (Fig. 10B). Se observó que la actividad de esta enzima siempre guardó una relación inversa a la enzima biosintética.

La actividad de la GS en el micelio vegetativo inferior se incrementó 2 veces durante las 12 h de incubación, con respecto a la presente en el micelio vegetativo en crecimiento prestacionario. En el micelio vegetativo superior esta actividad disminuyó 8 veces; a las 12 h de incubación, la actividad de GS fue 16 veces más alta en el micelio vegetativo inferior que en el superior. En el micelio aéreo se detectó una moderada actividad de GS (Fig. 11A).

Ya que la actividad de la GDH-NADP fue baja en el micelio vegetativo y particularmente en el micelio aéreo, se esperó encontrar en ellos una actividad de GOGAT alta. Sin embargo, la actividad de esta enzima fué muy baja en todas las estructuras. En la Fig. 11B, entre las 3 y 15 h de incubación se observa un incremento en la actividad de la enzima en el micelio vegetativo inferior. Debido a ello se midió la actividad de esta enzima a las 18 y 21 h de incubación y no se detectó mayor actividad en ninguno de los tres micelios.

Resumiendo, en el micelio vegetativo inferior se detectaron actividades altas de la GDH-NADP y de la GS. En el micelio vegetativo superior, coincidente con un incremento en la actividad de la GDH-NAD, se detectó una marcada disminución en las actividades específicas de la GDH-NADP y de la GS a lo largo de las primeras 12 h de aerealogénesis. En el micelio aéreo se encontró actividad de la GDH-NAD y una mediana actividad de la GS. La actividad de

Fig. 10. Actividades específicas de las enzimas (A) GDH-NADP y (B) GDH-NAD, durante la aerealogénesis de la cepa *prol-3*. Símbolos: actividad medida en: el micelio vegetativo de 15h de crecimiento en medio líquido (o) (ver el origen), el micelio vegetativo inferior (◻), el micelio vegetativo superior (◼) y en el micelio aéreo (Δ).

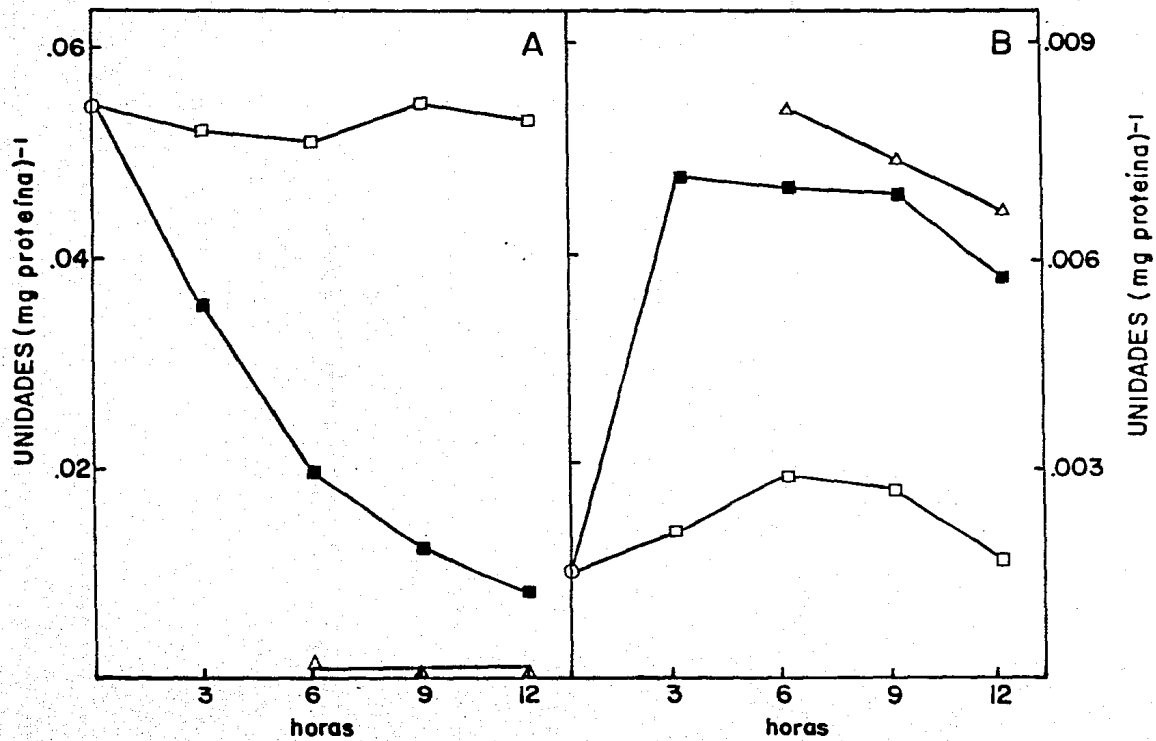
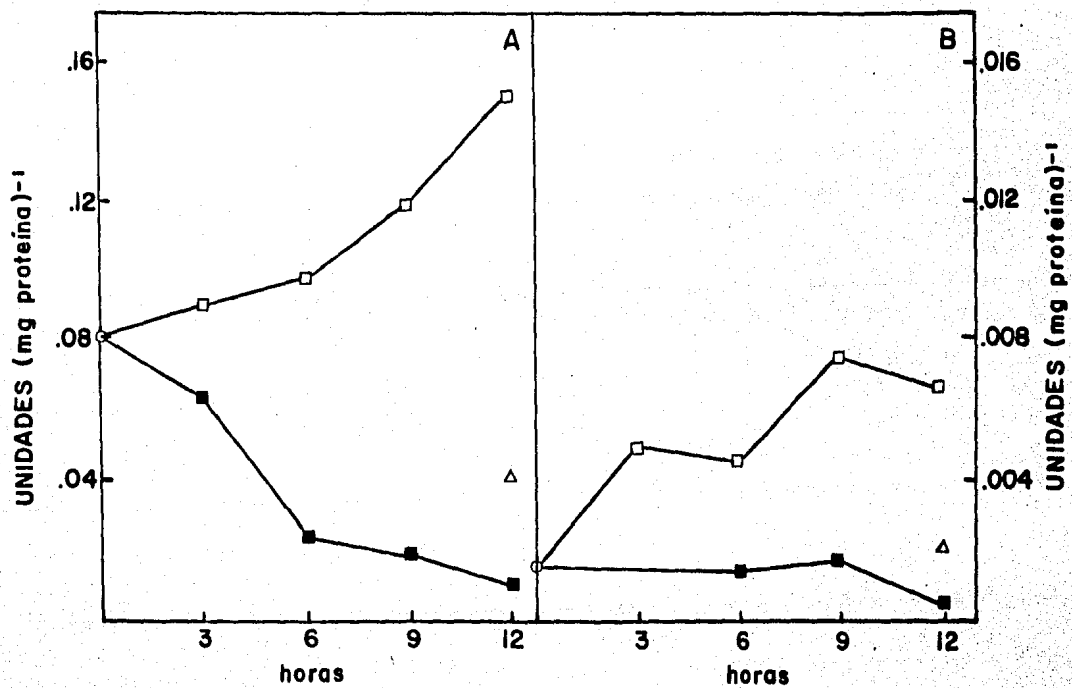


Fig. 11. Actividades específicas de las enzimas (A) GS y (B) GOGAT, durante la aerealogénesis de la cepa *prol-3*. Símbolos: indican lo mismo que en la Fig. 10.



la GOGAT fué baja en las tres estructuras.

VI. FORMAS OLIGOMERICAS E ISOZIMAS DE LA GS DURANTE LA AEREALOGENESIS.

Con el objeto de caracterizar las formas oligoméricas de la GS, los extractos de cada una de las estructuras se centrifugaron en gradientes continuos de sacarosa de 5 a 20%. En la Fig. 12 se presenta la actividad de la GS de las fracciones de dichos gradientes, medida por su ensayo de transferasa. El pico con la máxima actividad detectada en las fracciones 19 y 20 corresponde a la forma oligomérica de un octámero. El pico del tetrámero de GS en nuestras condiciones de corrida migra entre las fracciones 10 y 12. En todas las estructuras analizadas la GS presentó una forma octamérica. En el micelio en fase de crecimiento prestacionaria y en los micelios vegetativos inferior y superior, el corrimiento del pico hacia la izquierda indica la presencia de formas oligoméricas menores.

Para determinar que isozimas de la GS están presentes durante la aerealogénesis, los extractos de las diferentes estructuras, se inmunoprecipitaron con anti-GS. Los inmunoprecipitados se corrieron en geles de poliacrilamida con SDS y urea. La Fig. 12 muestra la tinción de estos geles con azul de coomasie. La GS en todas las estructuras estuvo compuesta preferencialmente por la isozima β . La relación aproximada de los monómeros β y α , β/α , obtenida del perfil de absorbancia a 680 nm de las bandas del gel; fué de 2.6 en el micelio de crecimiento en fase prestacionaria; en el micelio vegetativo inferior disminuyó durante las primeras 3 h de incubación y después se incrementó hasta alcanzar a las 12 h un valor de 2.1 (Fig. 13A). En el micelio vegetativo superior esta relación fué de 1.5 y en el micelio aéreo de 2.6.

FIG. 12. Formas oligoméricas y monómeros de la GS: A) En el micelio vegetativo de 15 h de crecimiento y a las 12 h de aereologénesis en; B) el micelio vegetativo inferior; C) el micelio vegetativo superior y D) el micelio aéreo. Los extractos de los micelios se corrieron en gradientes continuos de sacarosa o se inmunoprecipitaron, el inmunoprecipitado se analizó mediante electroforésis en geles de poliacrilamida con SDS y urea. En cada figura se muestra la actividad de GS (transferasa) a lo largo del gradiente de sacarosa, y los polipeptidos α y β de los geles teñidos con azul de coomasie.

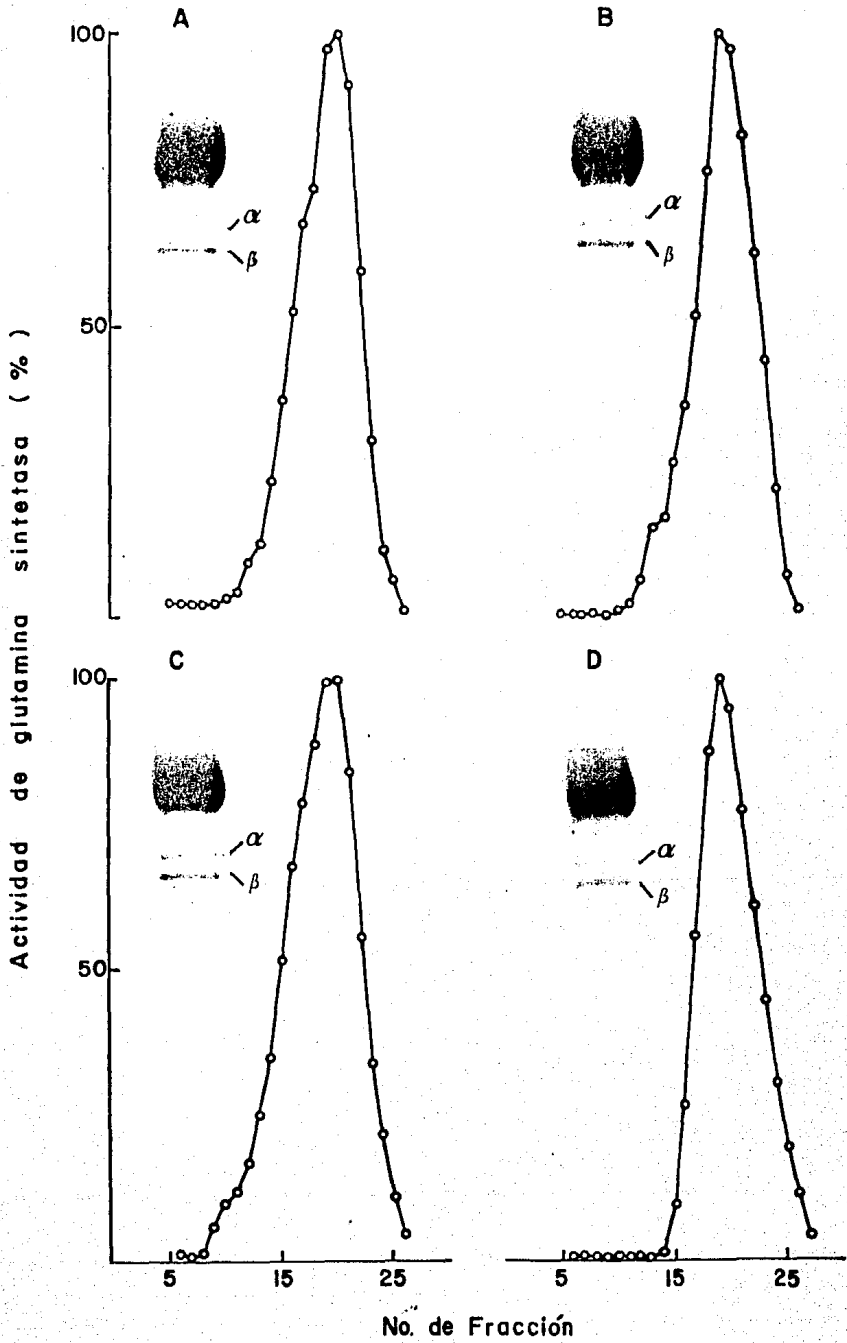
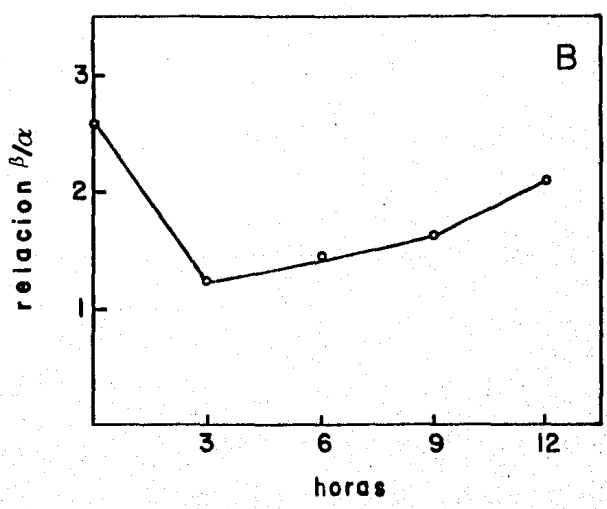
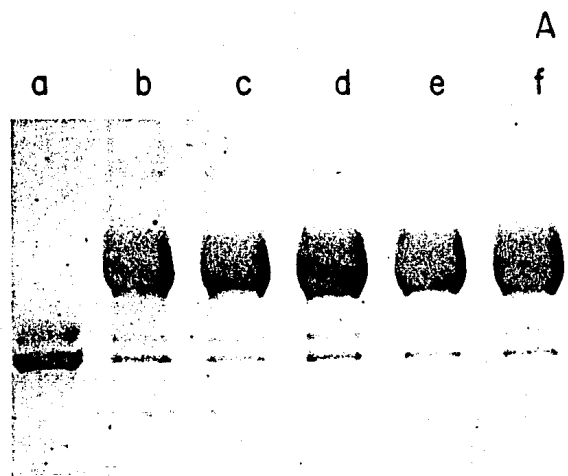


FIG. 13. Relación de los monómeros β y α , (β/α), de la GS en el micelio vegetativo inferior. A) Análisis electroforético de los monómeros de GS inmunoprecipitados de extractos de b) micelio vegetativo a las 15 h de crecimiento en medio líquido y, (c-f), micelio vegetativo inferior de c) 3 h, d) 6 h, e) 9 h y f) 12 h de aereación. En el carril a) se corrió la enzima pura. Los carriles del gel se cortaron y en cada uno se determinó la cantidad relativa de los monómeros α y β midiendo la absorción luminosa de las bandas. La Fig. B muestra la relación β/α obtenida para los distintos carriles.



VII. VIAS ALTERNAS DE SINTESIS DEL ACIDO GLUTAMICO EN EL MICELIO AEREO.

La ausencia de la actividad de la GDH-NADP y la baja actividad de la GOGAT, registradas en el micelio aéreo, contrastan con la alta poza de glutamato en esta estructura y en las conidias. El 2.4% del peso seco en las conidias es ácido glutámico (91). Debido a estas razones se decidió explorar vías alternas para la síntesis de ácido glutámico en el micelio aéreo. Las siguientes observaciones condujeron a pensar en glutamina como un sustrato para la síntesis del ácido glutámico. a) Para la eficiente formación del micelio aéreo se observó el requerimiento de una poza alta de glutamina en el micelio vegetativo inferior; b) Durante la aerealogénesis, en el micelio vegetativo inferior, se detectó un incremento en la actividad de la GS, y así mismo, se detectó actividad de esta enzima en el micelio aéreo; y c) En el laboratorio se tienen evidencias de que existe un transporte de glutamina del micelio vegetativo inferior hacia el micelio aéreo.

Las vías alternas mediante las cuales se puede sintetizar el glutamato a partir de glutamina son : 1) Como producto de la hidrólisis de glutamina, en una reacción catalizada por una glutaminasa; 2) Mediante una reacción de transaminación a partir de los grupos amino de otros aminoácidos y α -cetoglutarato y 3) Como producto de la transamidación de glutamina.

En el presente estudio unicamente se analizan las primeras dos vías.

La actividad de glutaminasa se buscó en las estructuras generadas por la aerealogénesis, particularmente en el micelio aéreo. Los ensayos se hicieron a diferentes pHs en el rango de 5 a 9, en presencia de conocidos activadores como fostatos, GTP, ATP (84), AMPc y glutamato (85) y a

temperaturas de 30°C y 37°C. Bajo las distintas condiciones ensayadas, en ninguna de las estructuras se detectó actividad de glutaminasa. Tampoco se encontró actividad de esta enzima en los extractos de la cepa silvestre y del auxótrofo de glutamato *am-1*; en *am-1*, cuando se transfirieron por 8 y 4 horas respectivamente, a un medio con glutamina como única fuente de carbono y de nitrógeno. Por otra parte, la glutaminasa de *E. coli*, en presencia y ausencia de extracto de micelio aéreo, dió valores de actividad similares. Con esto verificamos la eficacia de nuestro ensayo y descartamos la presencia de inhibidores en nuestros extractos. Con base en estos resultados concluimos que no hay actividad de glutaminasa en las distintas estructuras ensayadas.

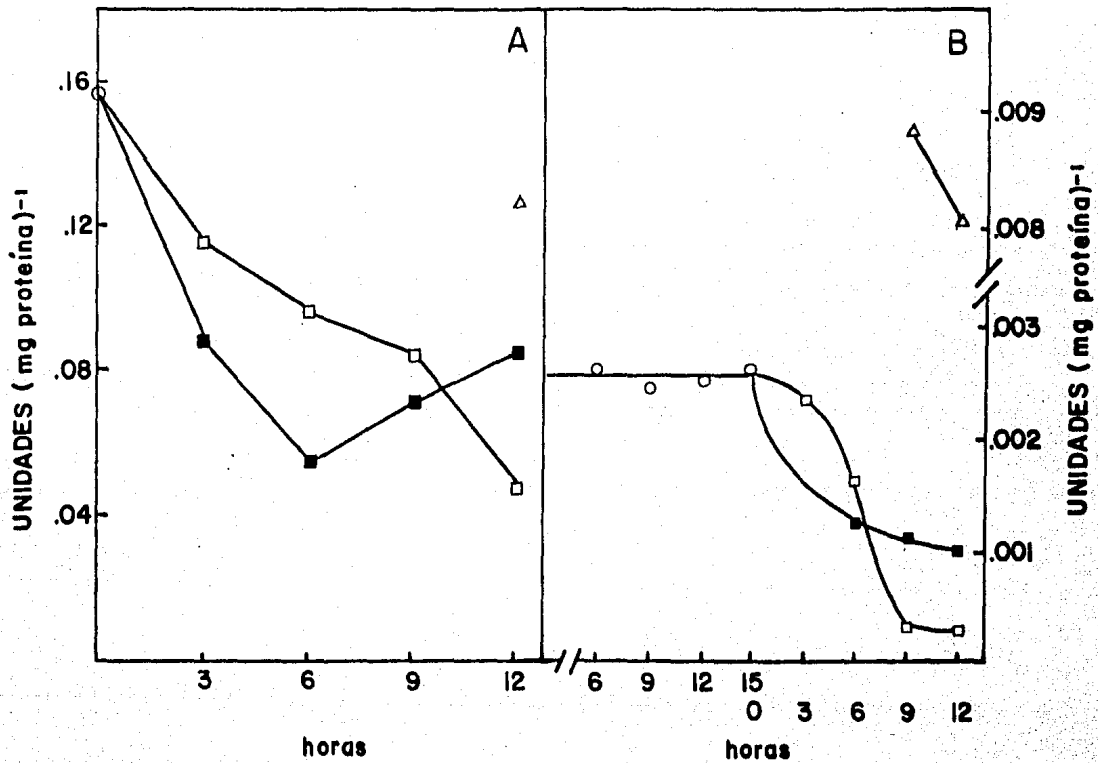
Si el glutamato en el micelio aéreo proviene de transaminaciones, alanina y glutamina podrían ser buenos candidatos para funcionar como donadores de grupos amino, ya que las pozas de estos aminoácidos, que en un principio se encontraron acumuladas en el micelio vegetativo del crecimiento prestacionario, disminuyen en el micelio vegetativo durante la aerealogénesis y se acumulan en el micelio aéreo.

Cuando se midió la actividad de la alanina transaminasa, se encontró alta en el micelio aéreo y un similar valor de actividad se detectó en el micelio vegetativo del crecimiento prestacionario. En los micelios vegetativos inferior y superior la actividad disminuyó a lo largo de la aerealogénesis (Fig. 14A).

La glutamino transaminasa mostró una actividad constante a lo largo del crecimiento vegetativo. Cuando el micelio se colocó en condiciones de aerealogénesis, tanto en el micelio vegetativo inferior como en el superior,

la actividad de esta enzima disminuyó rápidamente (Fig. 14B). Por otro lado en el micelio aéreo se detectó un alto valor de actividad, la cual fue 3 veces más alta que en el micelio en crecimiento vegetativo, y alrededor de 40 veces más alta que en los micelios vegetativos inferior y superior, después de 9 h de aerealogénesis.

Fig. 14. Actividades específicas de las enzimas (A) alanina transaminasa y (B) glutamina transaminasa, durante la aerealogénesis de la cepa *prol-3*. Símbolos: Actividad medida en el micelio vegetativo durante su crecimiento exponencial y prestacionario (o), el resto de los símbolos indican lo mismo que en la Fig. 10.



DISCUSION

Consideramos que el sistema de Stine y Clarck para la obtención del micelio aéreo (13) ofrece varias ventajas para el estudio de la esporulación asexual de *N. crassa*: a) la separación de la fase de crecimiento vegetativo y la fase de conidiación. Cuando el micelio vegetativo es privado de nutrientes deja de crecer vegetativamente y degrada sus proteínas; b) la sincronización en la aparición, el crecimiento y la conidiación del micelio aéreo; c) la posibilidad de separar fácilmente las estructuras producidas durante la diferenciación: micelio vegetativo inferior y superior y micelio aéreo; d) la obtención de cantidades adecuadas de estas estructuras para su análisis bioquímico; e) la rapidez del proceso de diferenciación. A diferencia de la conidiación en cultivos sólidos o en cultivos estacionarios, que tarda alrededor de 3 días, la conidiación en el sistema de Stine Clarck sólo toma el tiempo utilizado en el crecimiento vegetativo del micelio, de 12 a 15 h, más 15 h de privación de nutrientes, en total aproximadamente 30 h; f) la viabilidad de las conidias obtenidas a juzgar por el alto porcentaje de germinación, el crecimiento vegetativo con un tiempo de duplicación semejante al del micelio crecido a partir de conidias obtenidas de medio sólido, y la formación de micelio aéreo y conidias con una eficiencia similar a la del micelio vegetativo producido por las conidias provenientes de medios sólidos (13 y datos del laboratorio).

Dado que la conidiación en este sistema ocurre en total ausencia de nutrientes, ofrece la posibilidad de analizar el crecimiento y conidiación

del micelio aéreo a expensas del micelio vegetativo. Esta peculiaridad del sistema nos ha llevado a preguntarnos acerca de cual ó cuales son los constituyentes del micelio vegetativo que participan como fuentes de carbono y nitrógeno para la formación del micelio aéreo. Cuando se analizó la participación del glucógeno como una posible fuente de carbono, se observó que un alto contenido de glucógeno en el micelio vegetativo, (arriba del 4% del peso seco), retardó alrededor de 2 a 3 h la aparición del micelio aéreo. El crecimiento del micelio aéreo en este cultivo fué más lento que en los cultivos con moderado y bajo contenido de glucógeno (menos del 1.4% del peso seco del micelio vegetativo) (Fig. 3A). En los cultivos con moderado y alto contenido de glucógeno se observó una rápida glucogenólisis durante las primeras 3 y 6 h de incubación, respectivamente (Fig. 3B). La cantidad de glucosa producida durante la degradación del glucógeno, en el cultivo con un alto contenido de éste, podría activar la vía glicolítica y debido a ello es probable que el retraso observado en la iniciación de la aerealogénesis se deba a un efecto de represión catabólica de glucosa sobre la conidiación. Turian y Bianchi (6) han presentado evidencias sugiriendo que durante la conidiación de *N. crassa* existe un cese en la actividad de la vía glicolítica. En *S. cerevisiae* se ha observado que la glucosa reprime la esporulación y que fuentes de carbono gluconeogénicas como acetato y etanol la favorecen (92 y 93). En los cultivos con alto glucógeno, después de 6 a 7 h de incubación, aún restando un contenido de glucógeno relativamente alto, éste fué catabolizado a una velocidad mucho mejor que durante las primeras horas de la aerealogénesis (Fig. 3B). La razón por la que el glucógeno deja de catabolizarse durante la aerealogénesis requiere

de un análisis más detallado. Durante la formación del cuerpo fructífero en *D. discoideum* a partir de amibas con un alto contenido de glucógeno ocurre también una situación semejante (94). Por otra parte la degradación de glucógeno es dispensable para la aerealogénesis, ya que el micelio vegetativo con bajo contenido de glucógeno sostuvo eficientemente la producción del micelio aéreo (Fig. 3A).

Además de la glucogenólisis se observó una disminución considerable en el contenido inicial de proteínas a lo largo de toda la aerealogénesis. En otros sistemas de esporulación como en *S. cerevisiae* (23), *B. subtilis* (25) y durante la formación del cuerpo fructífero de *D. discoideum* (26), se ha observado un acentuado catabolismo de proteínas durante el proceso de diferenciación. La velocidad de degradación de la proteína del micelio vegetativo fue esencialmente la misma en los micelios con alto, moderado o bajo contenido de glucógeno (Fig. 3C). Cabe señalar que desconocemos hasta que punto sean válidas estas comparaciones, ya que el micelio con alto contenido de glucógeno proviene de un cultivo en fase de crecimiento estacionario y los otros dos de cultivos en fase de crecimiento exponencial. También en *D. discoideum* la degradación de proteínas es la misma en amibas con distintos contenidos iniciales de glucógeno (94). La magnitud del catabolismo de proteínas fué independiente de la cantidad de micelio vegetativo que se puso a formar micelio aéreo en cultivos que producen alrededor de 4.5 a 5 mg de proteína de micelio aéreo. Considerando que el contenido de carbono en la proteína y en el glucógeno es de un 40%,

(descontando las descarboxilaciones del catabolismo de los aminoácidos que ocurren fuera del ciclo de Krebs y que representan alrededor del 3%) se derivan 2.2, 8.3 y 23 veces más esqueletos de carbono de la degradación de proteínas que de la glucogenólisis en los cultivos con alto, moderado y bajo contenido de glucógeno respectivamente. Durante las primeras 9 h de la aereologénesis en el cultivo con moderado contenido de glucógeno se detectó una importante excreción de NH_4^+ , probablemente derivado del catabolismo protéico (Fig. 3D).

Cuando se marcaron preferencialmente las proteínas del micelio vegetativo, se detectó una disminución del 70% de la marca en proteínas (Tabla 1), lo cual indica, como es de esperarse, que el recambio de proteínas en el sistema es mayor que el detectado como disminución en el contenido de proteínas (Fig. 3C). Los esqueletos de carbono derivados del catabolismo de proteínas fueron utilizados principalmente: como fuente de energía, mediante su oxidación a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, para síntesis de pared del micelio vegetativo y para síntesis del micelio aéreo (Tabla 1). En estas condiciones durante las primeras 9 h de la aereologénesis se observó una rápida liberación de CO_2 radioactivo, que coincidió con el crecimiento del micelio aéreo. En las siguientes 6 h, el crecimiento del micelio aéreo y la liberación de CO_2 declinaron (Fig. 4). Asumiendo que el recambio de pared es mínimo (95) y que toda la radioactividad de la fracción soluble, glucógeno y ácidos nucleicos del micelio vegetativo fuera oxidada y liberada como CO_2 , por lo menos un 60% de la radioactividad detectada en CO_2 debió provenir de la marca inicialmente incorporada a proteínas. Y si toda la marca en las fracciones mencionadas fuera incorporada

en la pared o en el micelio aéreo, al menos un 42% y 18% de la marca detectada al final de la aerealogénesis en pared y micelio aéreo, respectivamente, debió provenir de la marca inicialmente incorporada en proteínas. Estos porcentajes son estimaciones mínimas y probablemente el porcentaje real sea cercano al 100%. El hecho de que una considerable proporción de la marca, proveniente de la degradación de proteínas, se incorpore en la pared celular, sugiere que durante la aerealogénesis se canaliza un importante flujo de esqueletos de carbono a través de la vía gluconeogénica. En *D. discoideum* la proteína se utiliza como fuente de energía (94) y también durante la esporulación sexual de *Aspergillus nidulans*, en algunas condiciones la degradación de proteínas es la principal fuente de carbono y energía (96).

El catabolismo protéico en el micelio vegetativo es una importante fuente de carbono y energía para la formación del micelio aéreo. Así mismo, el nitrógeno utilizado en dichos procesos pudiera derivar de los aminoácidos provenientes de la degradación de proteínas, así como de los aminoácidos acumulados en el micelio vegetativo durante el crecimiento exponencial y prestacionario. Durante la aerealogénesis, no obstante el marcado catabolismo de proteínas, los niveles de las pozas de aminoácidos bajaron (Fig. 5A, B y D). La velocidad de utilización de glutamina y de alanina fue mucho mayor que la de los otros aminoácidos (Fig. 5D). En *S. cerevisiae* también se ha observado que los niveles de las pozas de glutamina y glutamato bajan considerablemente al inicio de la esporulación (41).

En el micelio aéreo la mayoría de los aminoácidos se encontraron acumulados, especialmente glutamato y glutamina (Fig. 5C). En las conidias de *N. crassa* el glutamato constituye el 2.4% de su peso seco y se ha propuesto que, durante la germinación de las conidias, el catabolismo de glutamato

genera el poder reductor para la activación del metabolismo celular (91). También en las esporas de bacterias del género *Bacillus*, el glutamato es el aminoácido más acumulado, y en *B. megaterium*, la poza de glutamato baja rápidamente durante los primeros 30 seg de la germinación (97). Estos resultados sugieren que la acumulación de glutamato durante la esporulación puede ser un proceso indispensable para la germinación de las esporas o conidias.

Cuando se probó la eficiencia para formar micelio aéreo de cultivos privados de prolina, glutamato, alanina, arginina, glutamina o triptofano, sólo en los privados de glutamina y arginina la formación del micelio aéreo se inhibió en un 75 y 25%, respectivamente; la privación de los otros aminoácidos no tuvo ningún efecto inhibitorio sobre la formación del micelio aéreo (Fig. 6). Estos resultados sugieren que para la aereologénesis se requiere una poza alta de glutamina y probablemente también de arginina. La glutamina durante la aereologénesis, tiene otra función aparte de la de donar el nitrógeno para la síntesis de glutamato, arginina, triptofano, histidina, glucosamina, guanosina y adenosina, ya que la adición de estas aminas al cultivo privado de glutamina no restauró el crecimiento del micelio aéreo como lo hizo la glutamina (Fig. 9). Aunque no se midieron las pozas de guanosina y adenosina, se sabe que *N. crassa* si transporta estos compuestos (98). En el escaso micelio aéreo producido por el cultivo privado de glutamina, no se acumularon las pozas de aminoácidos, no obstante que éstas se mantienen acumuladas en el micelio vegetativo inferior (Figs. 8A y B), sugiriendo una posible relación entre la poza de glutamina y la movilización

de aminoácidos. La disminución del nivel de las pozas de aminoácidos en el micelio vegetativo inferior, así como su acumulación en el micelio aéreo, podrían deberse a una rápida utilización de éstos en el micelio vegetativo y/o a su transporte hacia el micelio aéreo en crecimiento. En el laboratorio se tienen datos que sugieren la existencia de un transporte de glutamina del micelio vegetativo inferior hacia el micelio aéreo. Si durante la aerealogénesis se marca la poza de glutamina del micelio vegetativo, al final de la aerealogénesis la marca se distribuye preferencialmente hacia el micelio vegetativo superior y el micelio aéreo (Jesús Aguirre, resultados no publicados).

Ya que es probable que durante la aerealogénesis la distribución de la glutamina entre las diferentes estructuras tenga un papel importante, se midieron las enzimas que participan en la síntesis de glutamina y algunas enzimas relacionadas a la utilización de glutamina.

En el micelio inferior se detectaron actividades altas de la GDH-NADP y de la GS (Figs. 10A y 11A). También durante la esporulación de *S. cerevisiae*, se ha detectado una actividad alta de la GDH-NADP y un incremento en la actividad de la GS (41). En el micelio vegetativo inferior la forma oligomérica de la GS correspondió a la de un octámero compuesto preferencialmente por la isozima β (Fig. 12). Por otra parte en este micelio se detectó una actividad muy baja de la GOGAT (Fig. 11B) y prácticamente no se encontró actividad de la GDH-NAD (Fig. 10B). Estos resultados indican que en el micelio vegetativo inferior el amonio se asimila mediante las enzimas GDH-NADP y GS octamérica compuesta preferencialmente por los monómeros β . Esta vía funciona durante el crecimiento en condiciones donde el amonio se encuentra

en exceso, lo cual contrasta con las condiciones de deprivación de carbono y de nitrógeno en las que se induce la aerealogénesis en nuestro sistema experimental.

En *N. crassa* se ha visto que la actividad de la GDH-NADP es alta cuando se crece al organismo en buenas fuentes de carbono como glucosa, sacarosa o fructuosa y bajo estas condiciones la GDH-NAD está reprimida (55). En exceso de amonio la actividad de la GDH-NADP es alta (53). En el micelio vegetativo inferior la actividad alta de la GDH-NADP así como la ausencia de actividad de la GDH-NAD (Figs. 10 A y B), sugieren la presencia de carbono y amonio intracelulares en este micelio. Por otro lado, se ha observado que en ausencia de fuentes de carbono y de nitrógeno la GS octamérica de *N. crassa* se degrada rápidamente (61). En el micelio vegetativo inferior esto no parece ocurrir; por el contrario, la actividad de la GS se incrementó 2 veces con respecto a la presente durante el crecimiento prestacionario (Fig. 11A). Sin embargo, la disminución en la relación de los polipeptidos β y α de la GS, β/α , durante las primeras 3 h de incubación (Fig. 13), sin aumento considerable en la actividad de la GS durante ese tiempo (Fig. 11A), pudiera interpretarse como una degradación del polipeptido β y una concomitante síntesis del polipeptido α . Después de las primeras 3 h, la relación β/α se incrementó hasta alcanzar una relación similar a la inicial (Fig. 13). Esto podría tomarse como indicación de que después de las 3 h ya existe suficiente amonio y esqueletos de carbono dentro de la célula.

Las actividades enzimáticas detectadas y el hecho de que se haya observado una importante degradación de proteínas y de glucógeno, así como la excreción de amonio al medio, hacen pensar de que el micelio vegetativo

inferior tiene suficiente amonio y esqueletos de carbono intracelulares, que le permiten mantener e inclusive aumentar la síntesis de glutamina.

En el micelio vegetativo superior, se detectó una actividad muy baja de la GDH-NADP, mediana actividad de la GS y no se encontró actividad de la GOGAT. Debido a estos resultados se puede concluir que la capacidad de este micelio para asimilar amonio es muy limitada.

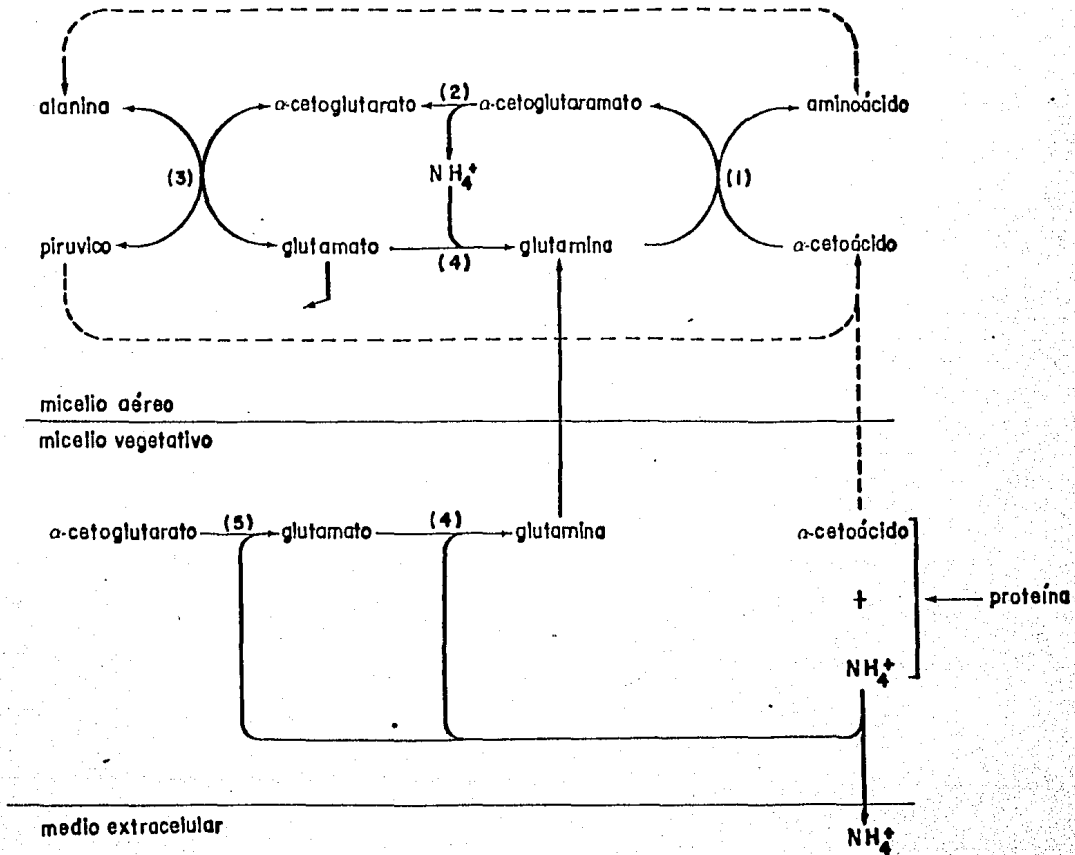
En el micelio aéreo no existe el funcionamiento de una vía de asimilación de amonio como tal, aunque en él se encontró una mediana actividad de la GS (Fig. 11 A). No se detectaron actividades de las enzimas GDH-NADP y GOGAT (Figs. 10 A y 11 B). Estos resultados y el hecho de que la cepa *am-1; en am-1*, que carece de las actividades de la GDH-NADP y de la GOGAT, produjo un abundante micelio aéreo (Fig. 6) señalan que no se requiere la actividad de estas enzimas para la aerealogénesis. La ausencia de las actividades de la GDH-NADP y GOGAT contrasta con la acumulación de glutamato encontrada en el micelio aéreo (Fig. 5 C). El transporte de glutamato del micelio vegetativo inferior hacia el micelio aéreo podría explicar la acumulación de este aminoácido. Sin embargo esto es poco probable ya que la cepa *am-1; en am-1*, con un nivel bajo en la poza de glutamato (Tabla 2 y Fig. 7) formó abundante micelio aéreo (Fig. 6) en el cual además se encontró una poza alta de este aminoácido (Fig. 7A y B). Alternativamente la síntesis de glutamato pudiera efectuarse a partir de glutamina. La vía directa mediante la cual glutamina puede dar glutamato es por la acción de una glutaminasa. Dado que la intensiva búsqueda de esta actividad enzimática resultó infructuosa, pensamos que probablemente no exista actividad de

glutaminasa en *N. crassa*.

En el micelio aéreo se encontró una actividad alta de la glutamina transaminasa (Fig. 14B). Esta enzima cataliza la transaminación irreversible de un α -cetoácido con glutamina. En *N. Crassa* (Calderón, J., Morett, E., y Mora, J. Manuscrito en preparación) al igual que en otros sistemas como en hígado (99), riñón (100) y cerebro (101), se ha visto que la glutamina transaminasa, esta acoplada a la ω -amidasa, y catabolizan la glutamina hasta α -cetoglutarato y amonio. Espín et al (102), han propuesto que en *N. crassa* esta vía participa en la degradación y resíntesis de la glutamina en un ciclo en donde el amonio asimilado por la célula en glutamina es distribuido, mediante la glutamina transaminasa, hacia otros aminoácidos. En ausencia de la GDH-NADP y de la GOGAT o cuando la glutamina es la fuente de nitrógeno, mediante la acción acoplada de la glutamina transaminasa y la ω -amidasa se puede sintetizar el ácido glutámico, si el α -cetoglutarato proveniente de la degradación de glutamina es transaminado con un aminoácido. En las condiciones de crecimiento en donde glutamina se utiliza como fuente de nitrógeno, como en el caso de la *gln-1b*, se observa una disminución en la poza de alanina; este mismo efecto se observó en la cepa *am-1*; *en am-1* cuando se creció en glutamina y alanina como fuentes de nitrógeno (Tabla 2). Por otra parte la *am-1*; *en am-1* crece en MM-sacarosa más alanina con un tiempo de duplicación (3.06 h) muy similar al observado cuando se crece en MM-sacarosa con glutamato más alanina (2,9, h). La disminución de la poza de alanina en estas condiciones podría explicarse si el glutamato es sintetizado a partir de la transaminación de alanina y el α -cetoglutarato

proveniente de la degradación de glutamina. En el micelio aéreo se encontró una actividad alta de alanina transaminasa (Fig.14A).

Con base en estos resultados se propone que en el micelio aéreo el glutamato puede sintetizarse mediante la siguiente vía:



ENZIMAS QUE PARTICIPAN EN LA VIA:

- (1) Glutamina transaminasa.
- (2) ω -amidasa.
- (3) Alanina transaminasa.
- (4) Glutamina sintetasa.
- (5) Glutamato deshidrogenasa.

En la primera reacción la glutamina del micelio aéreo (transportada desde el micelio vegetativo inferior) transamina con un α -cetoácido mediante la enzima glutamina transaminasa para producir un aminoácido y α -cetoglutaramato; en la segunda reacción, el α -cetoglutaramato es desamidado por la ω -amidasa para producir α -cetoglutarato y amonio, y en la tercera reacción el α -cetoglutarato es transaminado por la alanina transaminasa produciendo glutamato y piruvato. Esta vía metabólica explicaría la síntesis y acumulación del glutamato en el micelio aéreo, el requerimiento de una poza alta de glutamina para la aerealogénesis y por otra parte, mediante la glutamina transaminasa, podrían adecuarse las pozas de aminoácidos a las requeridas en el micelio aéreo y posteriormente en las conidias.

CONCLUSIONES

Hasta donde conozco este es el primer trabajo encaminado a determinar cual o cuales son las fuentes de esqueletos de carbono y energía que, en ausencia de nutrientes extracelulares, utiliza el micelio vegetativo para su diferenciación en micelio aéreo. Así mismo, es el primer trabajo en el que se analizan las vías de asimilación de amonio en las estructuras resultantes de la aerealogénesis: micelios vegetativos (inferior y superior) y micelio aéreo. Las conclusiones que de este trabajo surgen son las siguientes:

- 1) El glucógeno del micelio vegetativo se degrada durante las primeras horas de la aerealogénesis, Esta degradación no es indispensable para la eficiente formación del micelio aéreo.
- 2) Durante la aerealogénesis hay un importante catabolismo de proteínas en el micelio vegetativo. La magnitud de este catabolismo es independiente del contenido de glucógeno del micelio vegetativo.
- 3) El catabolismo de proteínas del micelio vegetativo, constituye una fuente de esqueletos de carbono y energía para la formación del micelio aéreo.
- 4) Para la eficiente formación del micelio aéreo se requiere una alta poza de glutamina y posiblemente de arginina en el micelio vegetativo, no así de otros aminoácidos como prolina, glutamato, triptofano y alanina. La función

de la glutamina es otra que la de donar nitrógeno para la síntesis de arginina, triptofano, histidina, asparagina, guanosina, adenosina y glucosamina.

- 5) En el micelio vegetativo inferior el amonio es asimilado mediante las enzimas GDH-NADP y GS octamérica compuesta preferencialmente por monómeros β . No obstante la privación de nutrientes a la que se somete el micelio durante la aerealogénesis, en el micelio vegetativo inferior hay suficiente amonio y α -cetoglutarato para mantener esta vía.
- 6) En vista de las bajas actividades de las enzimas GDH-NADP y GS, detectadas en el micelio vegetativo superior, se concluye que en este micelio la capacidad para fijar amonio es limitada.
- 7) En el micelio aéreo no existe una vía de asimilación de amonio como tal, ya que únicamente se detectó en éste actividad de la GS y no se encontró actividad de las enzimas GDH-NADP y GOGAT. Por esta razón es probable que el micelio aéreo reciba el amonio asimilado en el micelio vegetativo inferior. La glutamina y probablemente otros compuestos orgánicos (arginina) podrían servir como acarreadores de nitrógeno del micelio vegetativo inferior al micelio aéreo. En el micelio aéreo, el nitrógeno amino de la glutamina se distribuiría a través de la glutamina transaminasa a otros cetoácidos.
- 8) En *N. crassa* no se detectó la actividad de glutaminasa bajo todas nuestras condiciones de ensayo, por lo cual se propone que en el micelio aéreo y en

aquellas condiciones en donde la glutamina es fuente de nitrógeno el ácido glutámico se sintetiza mediante las enzimas glutamina transaminasa, ω -amidasa y alanina transaminasa.

PERSPECTIVAS

Este trabajo constituye una exploración inicial en la fisiología de la esporulación en *N. crassa* y como tal quedan múltiples preguntas que requieren de estudios mas detallados para poderlas contestar. Algunas de éstas son las siguientes:

- a) ¿Qué relación guarda la disminución en la poza de glutamina con los procesos de aerealogénesis y conidiación de *N. crassa*? ¿Podría esta disminución ser captada como una medida de la disponibilidad de nutrientes para la célula y constituir, *per se* o través de otro compuesto nitrogenado, la señal que abre el programa de esporulación?
- b) ¿Constituye el catabolismo de proteínas un punto de regulación importante para la aerealogénesis? ¿Es un proceso indispensable? ¿Dentro de esta degradación existe selectividad? ¿Se inducen proteinasas específicas de la aerealogénesis?.
- c) ¿Es mediante el transporte selectivo de algunos metabolitos (por ejemplo glutamina y arginina) como el micelio vegetativo nutre al micelio aéreo?
- d) Por otra parte, aún resta analizar y efectuar experimentos que apoyen y comprueben que la síntesis de glutamato en el micelio aéreo se lleva a cabo mediante las enzimas glutamina transaminasa, ω -amidasa y alanina transaminasa.

REFERENCIAS

1. Seale, T. (1973) *J. Bacteriol.* 113; 1015-1025.
2. Schmit, J.C., y Brody, S. (1976) *Bacteriol. Rev.* 40; 1-41
3. Metzberg, R.L. (1972) *Annu. Rev. Genet.* 6; 111-132.
4. Gross, S.R. (1969) *Annu. Rev. Genet.* 3; 395-424.
5. Davies, R.H. (1972) *Science* 178; 835-840.
6. Turian, G., y Bianchi, D.E. (1972) *Bot. Rev.* 38; 119-154.
7. Nelson, R.E., Selitrennikoff, P.E., y Siegel, R.W. (1976) *Dev. Biol.* 50; 122-133.
8. Stine, G.J. (1969) The cell cycle. En: *Gene-Enzyme Interactions*. (G. Padilla, G.L. Whitson, e I. L. Cameron, eds.). Academic Press Inc. New York. Citado en la referencia 2.
9. Anderson, J.G. y Smith, J.E. (1971) *J. Gen. Microbiol.* 69; 185-197.
10. Zeidler, G., y Margalith, P. (1972) *Can. J. Microbiol.* 18; 1685-1690.
11. Cortat, M., y Turian, G. (1974) *Arch. Microbiol.* 95; 305-309.
12. Stine, G.J., y Clark, A.M. (1967) *Can. J. Microbiol.* 13; 447-453.
13. Siegel, R.W., Matsuyama, S.S., y Urey, J.C. (1968) *Experientia* 24; 1179-1181.
14. Smith, J.E. Anderson, J.G., Deans, S.G., y Berry, D.R. (1981) *Biochemistry of microcycle conidiation*. En: *Biology of conidial fungi*, 2. (Cole, G.T., y Kendrick, B. eds.) Academic Press Inc. New York.
15. Ton That, T.C., y Turian, G. (1978) *Arch. Microbiol.* 116; 279-288.
16. Sargent, M.L., y Woodward, D.O. (1969) *J. Bacteriol.* 97; 861-866.
17. Feldman, J.F., y Hoyle, M.N. (1976) *Genetics* 82; 9-17
18. Dieckman, C., y Brody, S. (1980) *Science* 207; 896-898.

19. Nelson, R.E., Seletrennikoff, C.P., y Siegel, R.W. (1975) *J. Bacteriol.* 122; 695-709.
20. Urey, J.C. (1971) *Develop. Biol.* 26; 17-27.
21. Matsuyama, S.S., Nelson, R.E., y Siegel, R.W. (1974) *Develop. Biol.* 41; 278-287.
22. Seletrennikoff, C.P., Nelson, R.E., y Siegel, R.W. (1974). *Genetics* 78; 679-690.
23. Betz, H., y Weisser, U. (1976) *Eur. J. Biochem.* 70; 385-395.
24. Correa, J.V., Lemos, E.M., y Lodi, W.R. (1978). *Develop. Biol.* 66; 470-479.
25. Mount, D.W., (1980). *Annu. Rev. Genetics* 14; 279-319.
26. North, M.J. (1982) *Microbiol. Rev.* 46; 308-340.
27. Betz, H. (1977) Protein degradation and sporulation in yeast. En: *Cell differentiation in microorganisms, plants and animals* (L. Nover, y K. Mothes, eds.) VEB Gustav Fisher Verlag-Jena y North Holland Publishing Co. Amsterdam.
28. Betz, H., y Weisser, U. (1976) *Eur. J. Biochem.* 62; 65-76.
29. Mechler, B., y Wolf, D.H. (1981) *Eur. J. Biochem.* 121; 47-52.
30. Wolf, D.H., y Ehmann, C. (1979) *Eur. J. Biochem.* 98 ; 375-384.
31. Wolf, D.H., y Ehmann, C. (1981) *J. Bacteriol.* 147; 418-426.
32. Firtel, R.A., y Brackenbury, R.W. (1972) *Develop. Biol.* 27; 307-321.
33. North, M.J. (1982) *Exp. mycol.*, en prensa. Citado en la referencia 26.
34. North, M.J. y Harwood, J.M. (1979) *Biochim. Biophys. Act.* 566; 222-233.
35. Fong, D., y Bonner, T.J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76; 6481-6485.
36. Kerjan, P., Keryer, E., y Szulmájster, J. (1979) *Eur. J. Biochem.* 98; 353-362.

37. Maurizi, M.R., Brabson, J.S., y Switzer, R.L. (1978) *J. Biol. Chem.* 253; 5585-5593.
38. Meyer, E., y Switzer, R.L. (1979) *J. Biol. Chem.* 254; 5397-5402.
39. Chen, Y-S. E., y Aronson, A.I. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74; 1254-1258.
40. Piñon, R. (1977) *Exp. Cell. Res.* 105; 367-378.
41. Delavier-Klutchko, C., Durieu Trautmann, O., Allemand, P., y Taulitzki, J. (1980). *J. Gen. Microbiol.* 116; 143-148.
42. Freese, B.E., Chu, M.I., y Freese, E. (1982) *J. Bacteriol.* 149; 840-851
43. Schaeffer, P., Millet, J. y Aubert, J.P. (1965). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 54; 704-711.
44. Ryv, J.I., y Tkayanagi, S. (1979) *J. Bacteriol.* 139; 652-656.
45. Bott, K.F., Reysset, G., Gregoire, J., Islert, D., y Aubert, J.P. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79; 996-1003.
46. Elmerich, C., y Aubert, J.P. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46; 892
47. Elmerich, C., y Aubert, J.P. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55; 837-842.
48. Rysset, G. y Aubert, J.P. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65; 1237-1241.
49. Roon, R.R., Eve, H.L., y Larimore, F. (1974) *J. Bacteriol.* 118; 89
50. Newlon, M.C. (1979) *Molec. Gen. Genet.* 176; 297-300.
51. Lara, M., Blanco, L., Campomanes, M., Calva, E., Palacios, R., y Mora, J. (1982) *J. Bacteriol.* 150; 105-112.
52. Austen, B.M., Habberland, E., Nyc, J.F., y Smith, E.L. (1977) *J. Biol. Chem.* 252; 8142-8149.

53. Hernández, G. (1980) Regulación de la deshidrogenasa glutámica biosintética de *N. crassa*. Tesis de licenciatura. Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M. U.A.C.P. y P. del C.C.H.
54. Sanwal B., D., y Lata, M. (1962) Arch. Biochem. Biophys. 97; 582-588.
55. Kapoor, M., y Grover, A.K. (1970) Can. J. Microbiol. 16; 33-40.
56. Vichido, I., Mora, Y., Quinto, C., Palacios, R., y Mora, J. (1978) J. Gen. Microbiol. 106; 251-259.
57. Limon-Lason, J., Lara, M., Reséndiz, B., y Mora J. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 78; 1234-1240
58. Quinto, C., Mora, J., y Palacios, R. (1977) J. Biol. Chem. 252; 8724-8727.
59. Sánchez, F., Campomanes, M., Quinto, C., Hansberg, W., Mora J., y Palacios, R. (1978) J. Bacteriol. 136; 880-885.
60. Hansberg, W., Espín, G., Palacios, R., y Sánchez, F. (1979) Develop. Biol. 73; 68-75.
61. Mora, Y., Chavez, O., y Mora, J., (1980) J. Gen. Microbiol. 118; 455-463.
62. Palacios, R., (1976) J. Biol. Chem. 251; 4787-4791.
63. Sánchez, F., Calva, E., Campomanes, M., Blanco, L., Guzmán, J., Saborio, J.L., y Palacios, R. (1980) J. Biol. Chem. 255; 2231-2234
64. Mora, J., Dávila, G., Espín, L., Gonzalez, A., Guzmán, J., Hernández, G., Hummelt, G., Lara, M., Martínez, E., Mora, Y., y Romero, D. (1980) Glutamine metabolism in *Neurospora crassa*. En: Glutamine: metabolism, enzymology y regulation. (J. Mora, y R. Palacios, eds.) Acad. Press Inc. New York.
65. Dávila, G., Sánchez, F., Palacios, R., y Mora, J. (1978) J. Bacteriol. 134; 693-698.
66. Dávila, G., Lara, M., Guzmán, J., y Mora, J. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 92; 134-140.

67. Hummelt, G., y Mora, J. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92; 127-133.
68. Hummelt, G., y Mora, J. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96; 1688-1694.
69. Mora, Y., Espín, G., Willms, K., y Mora, J. (1978) *J. Gen. Microbiol.* 104; 241-250
70. Vogel, H.J. (1964) *Am. Nat.* 98; 435-446.
71. Takahara, H., y Matzuda, J. (1976) *Agr. Biol. Chem.* 40; 1699-1703.
72. Werner, W., Rey, H.G., y Wielinger, Z., (1970) *Analyt. Chem.* 252; 224.
73. Mora, J., Salceda, R., y Sánchez, S. (1972) *J. Bacteriol.* 110; 870-877.
74. O' Farrel, P.H. (1975) *J. Biol. Chem.* 250; 4007-4021.
75. Mahadevan, P.R., y Tatum, E.L. (1965) *J. Bacteriol.* 90; 1073-1081.
76. Handerson, L.E., Oroszan, S., y Konigsberg, W. (1979) *Anal. Biochem.* 93; 153-157.
77. Ferguson, A.R. y Sims, A.P. (1971) *J. Gen. Microbiol.* 69; 423-427.
78. Fincham, J.R.S. (1957) *Biochem. J.* 65; 721-723.
79. Boland, M.J., y Benny, A.G. (1977) *Eur. J. Biochem.* 79; 355-362.
80. Kupchik, H.Z., y Knox, W.E. (1970) *Earch. Biochem. Biophys.* 136; 178-186.
81. Prusiner, S., y Milner, L. (1970) *Anal. Biochem.* 37; 429-438.
82. Weil-Malherbe, H. (1969) *J. Neurochem.* 16; 855-864.
83. Cook, W.R., Hoffman, J.H., y Bernlohr, R.W. (1981) *J. Bacteriol.* 148; 365-367.
84. Weil-Malherbe, H. (1972) *J. Neurochem.* 19; 2257-2267.

85. Prusiner, S., y Stadtman, E.R. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45; 1474-1481.
86. Kuamme, E., Olsen, B.E. (1979) *FEBS Lett.* 107; 33-36.
87. Lowry, O.H. Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., y Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193; 265-275.
88. Palacios, R., Campomanes, M., y Quinto, C. (1977). *J. Biol. Chem.* 252; 3028-3034.
89. Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227; 680-685.
90. Ronzio, R.A. y Meister, A. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 59; 164-170.
91. Schmit, J.C., y Brody, S. (1975). *J. Bacteriol.* 124; 232-242.
92. Croes, A.F. (1967) *Planta* 76; 227-237.
93. Roth, R., y Halvorson, H.O. (1969) *J. Bacteriol.* 98; 831-832.
94. Hames, D. y Ashworth, J.M. (1974) *Biochem. J.* 142; 301-315.
95. Trinci, A.P.J., y Righelato, R.C. (1970) *J. Gen. Microbiol.* 60; 239-249.
96. Zonneveld, B.J.M. (1980) *Exp. Mycol.* 4; 140-146.
97. Foerester, H.F. (1972) *J. Bacteriol.* 111; 437-442.
98. Magill, J.M., y Magill, C.W. (1975) *J. Bacteriol.* 124; 149-151
99. Cooper, A.J.L., y Maister, A. (1972) *Biochemistry* 11; 661-671.
100. Cooper, A.J.L., y Maister, A. (1974) *J. Biol. Chem.* 249; 2554-2561.
101. Cooper, A.J.L., y Meister, A. (1977) *J. Neurochem.* 28; 771-778.
102. Espín, G., Palacios, R., y Mora, J. (1979) *J. Gen. Microbiol.* 115; 59-68.