

03062
1ej-5

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y POSGRADO
CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNA MUTANTE DE *Neurospora crassa* ALTERADA EN LA REGULACION
POR GLUTAMINA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE MAESTRO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA

PRESENTA

MA. ALICIA GONZALEZ MANJARREZ,

1983.

TESIS CON
FALLA DE CUBRIR



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.

INTRODUCCION

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

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

Los genes estructurales y regulatorios, de las diversas enzimas que participan en la utilización de compuestos nitrogenados, constituyen el circuito catabólico nitrogenado. Las enzimas que participan en este circuito, -

están sujetas a dos tipos de control: represión catabólica nitrogenada e inducción. El primer mecanismo, previene la expresión de la vía en presencia de amonio o de algún producto de su metabolismo (1); aparentemente, la glutamina es la señal metabólica que inactiva a un regulador positivo, que se requiere para la síntesis de las enzimas (1). La represión catabólica nitrogenada constituye un sistema de control general que regula la expresión de muchas de las enzimas que participan en el circuito catabólico nitrogenado, mientras que la inducción es un mecanismo que opera con inductores y genes específicos para cada vía (1).

El modelo del operon propuesto para organismos procaríotes (2), plantea la regulación simultánea de genes contiguos, por un mismo efector. Cada unidad de regulación se denomina operon y está constituida por un sitio promotor, un sitio operador, genes estructurales y un gene regulador.

Jacob y Monod, estudiaron el operon de lactosa de *Escherichia coli*, que determina la producción de β -galactosidasa, enzima responsable de la degradación de lactosa, cuya actividad solamente se detecta, cuando las bacterias

se cultivan en presencia de lactosa, que constituye el inductor de esta vía.

A partir de la cepa silvestre, se aislaron diferentes mutantes que permitieron establecer un modelo de regulación. Desde entonces, el establecimiento de circuitos regulatorios, ha dependido, de la identificación de mutantes regulatorias, y del estudio de sus interacciones.

En eucariotes, pocos genes se han encontrado agrupados en forma de operon; sin embargo, en *Saccharomyces cerevisiae* existen algunos reportes, de mutaciones cis-dominantes constitutivas adyacentes a genes estructurales regulados negativamente (3, 4, 5, 6) y en *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa* se han descrito algunas mutaciones no-inducibles o constitutivas (7, 8, 9, 10).

El estudio de los genes regulatorios que forman parte del circuito catabólico nitrogenado en microorganismos eucariotes, ha sido llevado a cabo fundamentalmente en tres hongos: *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* y *Saccharomycess cereviciae*. En estos organismos, se han identificado dos tipos de mutaciones regulatorias: aquellas que afectan solamente una vía específica, y las que afectan a varias enzimas del circuito catabólico nitrogenado.

CONTROL ESPECIFICO:

a) Nitrato reductasa.- El nitrato es una excelente fuente de nitrógeno, tanto para *Neurospora crassa*, como para -- *Aspergillus nidulans*; este compuesto es transformado en amonio, por acción de la nitrato reductasa y de la nitrito reductasa (11). En *Neurospora crassa*, ambas enzimas - son homodímeros; y la nitrato reductasa posee un cofactor que contiene molibdato (12, 13). En ausencia de amonio y glutamina, la inducción de estas enzimas en *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans* depende de nitrato (14, 15, 16, 17), compuesto que activa la transcripción (18) y -- previene la inactivación de esta enzima "in vivo" (19).

Tanto en *Neurospora crassa* como en *Aspergillus nidu* lans, se han aislado mutantes incapaces de utilizar nitra to como fuente de nitrógeno, el estudio de estas mutantes ha permitido la identificación de algunos genes que afectan la utilización de nitrato.

Los genes *nit-3* y *nit-6* de *Neurospora crassa*, constituyen respectivamente los genes estructurales de la nitrato reductasa y de la nitrito reductasa (20), homólogos a los genes *nia D* y *nia A* de *Aspergillus nidulans* (21).

En *Aspergillus nidulans*, 5 loci llamados genes *cnx*, constituyen un cofactor que contiene molibdeno y que es compartido por la nitrato reductasa y la xantino deshidrogenasa I y II. Este cofactor está constituido por un componente polipeptídico codificado por *cnx H* y un grupo ligado que contiene molibdeno, cuya síntesis está determinada por los genes *cnx* restantes (22, 23). En *Neurospora crassa*, se presenta una situación similar, los genes *nit-1*, *nit-7*, *nit-8* y *nit-9*, son homólogos a los *cnx* de *Aspergillus* y son responsables de la síntesis y ensamble del cofactor de molibdeno (20).

En *Neurospora crassa*, el gene *nit-4* codifica para una proteína regulatoria mediadora de la inducción por nitrato de la nitrato y nitrito reductasas. El producto del gene *nit-4* forma un complejo con el nitrato, que se une a secuencias de reconocimiento específicas en el ADN, adyacentes a los genes estructurales *nit-3* y *nit-6*, permitiendo así su expresión. Mutantes en *nit-4* no tienen actividad de nitrato y nitrito reductasa, pero no presentan alteraciones en la actividad de otras enzimas relacionadas con el metabolismo nitrogenado; por lo tanto, el producto de *nit-4* es un regulador positivo específico

de la vía de utilización de nitrato. En *Aspergillus nidulans*, el producto del gene *nit A* juega un papel análogo al del gene *nit-4* de *Neurospora crassa* (1).

Los genes estructurales de la nitrato y nitrito reductasa de *Aspergillus nidulans* (*nia D* y *nia A*), se encuentran muy ligados, y ambos requieren para su expresión del producto del gene *nia A* y de nitrato; sin embargo, se regulan independientemente y no en forma de operon (1,24, 25, 18).

Tanto en *Neurospora crassa*, como en *Aspergillus nidulans*, se han aislado mutantes, que sintetizan una nitrato reductasa alterada en su estructura, que no presenta actividad biológica y que tiene alterado el control de la síntesis de esta enzima, que ahora se produce constitutivamente (26, 27). El aislamiento de este tipo de mutantes, ha dado lugar al planteamiento de un modelo de regulación autógena (26). Este modelo propone, que el producto del gene *nit-4*, es un inductor que se convierte en represor por la acción de la nitrato reductasa, conversión que la nitrato reductasa no puede efectuar cuando esta se encuentra unida a nitrato (20). Hasta ahora, la evidencia experimental presentada a favor de la autoregulación no demue-

estra de manera definitiva la operación de este tipo de control.

En conclusión, la inducción de la nitrato reductasa, en *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans*, esta sujeta a control positivo por el producto de los genes *nit-4* y *nit A* respectivamente y por nitrato.

En *Neurospora crassa*, este control opera a nivel de transcripción (28).

b) Catabolismo de Purinas,-

En *Aspergillus nidulans* el producto del gene *uap* es un regulador que modula la expresión de por lo menos - - ocho genes no ligados que participan en el transporte y la degradación de purinas (29). Estos son: *nad A*, gene estructural de la adenina deaminasa; *hx A*, que codifica para la xantino deshidrogenasa; *uz Z*, que codifica para urato oxidasa; *al y aa X*, genes estructurales de la alantoinasa y la alantoicasa respectivamente; *xan A*, cuyo producto participa en una vía alterna de degradación de xantina y *uap A*, el gene estructural de la permeasa de xantina y ácido úrico (30,31),

El inductor fisiológico de todas las actividades bajo control de *ua Y* es el ácido úrico y cuando menos, para la urato oxidasa, esta inducción se debe a síntesis "de novo" y se regula a nivel de transcripción (32). Mutantes *ua Y⁻*, no presentan actividad de ninguna de las ocho enzimas bajo su control, y no se han logrado aislar mutantes *ua Y^C* (constitutivas). Estos datos sugieren, que el producto del gene *ua Y* es un regulador positivo (32).

En *Neurospora crassa*, la vía de degradación de purinas es similar a la descrita en *Aspergillus nidulans*; sin embargo, no se ha encontrado un gene regulador semejante a *ua Y*. La mayoría de las enzimas de esta vía, son inducidas por ácido úrico (1).

La alantoína es un producto de la degradación de purinas, que *Saccharomyces cerevisiae* puede utilizar como única fuente de nitrógeno. La vía de degradación de alantoína está compuesta por cuatro enzimas y cuatro sistemas de transporte (33), cuyos genes están localizados en tres regiones diferentes, cada una en diferente cromosoma. La primera región, contiene los genes estructurales de alantoinasa (*DAL-1*), alantoicasa (*DAL-2*), de la permeasa de alantoína (*DAL-4*) y de la hidrolasa de ureidoglicolato (*DAL-3*). La segunda, contiene los genes estructurales ---

para la urea carboxilasa y la hidrolasa de alofanato -- (DUR1-2) que constituyen un solo cistron que codifica -- para una proteína multifuncional, finalmente, la tercera región abarca los genes que participan en el transporte activo de urea (DUR-3) y en su difusión facilitada (DUR-4) (34).

Todas las enzimas (DAL-1, DAL-2, DAL-3, DUR 1-2) y el sistema de transporte activo de urea (DUR-3), son inducidos por alofanato que es el último intermediario de esa vía (35, 36).

Hasta la fecha, se han logrado identificar dos elementos de control, cuya inactivación resulta en una síntesis constitutiva (dal-80) o no-inducible (dal-81), de los cinco productos génicos sujetos a inducción por alofanato (37). Según el modulo de Turoscy y col (38), el producto del gene DAL-80, controla el nivel basal de expresión génica, tal vez como resultado de interacciones con regiones adyacentes a los genes regulados, mientras que el producto del gene DAL-81 es el responsable del proceso de inducción, como resultado de una interacción con el inductor alofanato.

Se ha encontrado un tipo de mutantes en las que el

producto de *DUR 1-2* se expresa constitutivamente, mientras el resto de las actividades no se afectan; el locus mutado presente en estas cepas, se ha denominado *DUR-80* (34), y no se ha establecido si existe alguna interacción entre *DUR-80* y los productos de *DAL-80* y *DAL-81*.

La inducción de la síntesis de las cinco enzimas arriba descritas, requiere síntesis de ARN mensajero y de proteínas "de novo" (34).

c) Catabolismo de Prolina.-

En *Aspergillus nidulans*, los cuatro genes cuyos productos son necesarios para la degradación de prolina, se encuentran agrupados (39). Este sistema consta, de la permeasa de prolina (*prn B*), la prolina oxidasa (*prn D*), la deshidrogenasa del Δ' -pirrolin-5-carboxilato (*prn C*) y del gene *prn A*, que codifica para un regulador de la expresión de *prn B*, *C* y *D* (39). Este agrupamiento de genes se encuentra interrumpido por una región regulatoria central, en la que se han aislado mutantes que funcionan en *cis* (39).

La prolina es el inductor de *prn B*, *C* y *D* (1) y el

producto de *prn A* es un regulador positivo que media esta inducción. Mutantes *prn A^{*}*, carecen de los productos de *prn B*, *C* y *D* (1).

Se ha aislado una mutación *prn^d*, que mapea en la región regulatoria central del sistema, esta mutación resulta en una derrepresión de la síntesis de la permeasa de prolina, que indirectamente aumenta la producción de los productos de *prn C* y *prn D*, al aumentar el transporte de prolina (40). La mutación *prn^d* requiere del producto de *prn A* y de la inducción por prolina (40).

La región regulatoria central, debe tener sitios de reconocimiento para el producto de *prn A* para la RNA - polimerasa, y para los moduladores que regulan la represión catabólica nitrogenada y la represión catabólica de carbono (41), ya que la prolina puede ser utilizada como fuente de carbono y de nitrógeno.

El sistema de los genes *prn A*, *B* y *C* requiere todavía de un buen análisis para establecer si constituye un verdadero operon. Hasta la fecha, no existe ningún ejemplo de un sistema tipo operon en eucariotes. El sistema *His-4* de levadura, y el *arom* de *N. crassa*, que se encuentran entre los mejores estudiados, han resultado ser -

genes únicos, codificadores de polipéptidos grandes con actividades catabólicas múltiples (42). El agrupamiento *qa* que comprende cuatro genes, cuyos productos están implicados en la degradación del ácido quínico, es el más parecido al operon bacteriano. El gene *qa-1* codifica para una proteína regulatoria, que controla positivamente la expresión coordinada de las tres enzimas codificadas por los genes estructurales adyacentes. Mutaciones en el gene *qa-1*, resultan en un fenotipo no-inducible (43).

La vía de degradación de prolina en *S. cerevisiae*, es similar a la de *A. nidulans*; sin embargo, los genes que participan en esta vía no se encuentran agrupados (44). Mutaciones en el gene *put-3* resultan en una síntesis constitutiva de la prolina oxidasa y de la deshidrogenasa del Δ '-pirrolin-5-carboxilato (44). Este gene posiblemente sea el mediador de la inducción de estas enzimas por prolina; sin embargo, a diferencia del gene *prn. A* de *A. nidulans* el producto del gene *put-3* podría funcionar como un represor típico en un sistema de control negativo (44).

d) Catabolismo de Arginina.-

En *Saccharomyces cerevisiae*, la primera enzima de la vía de degradación de arginina, es la arginasa, que convierte a la arginina en ornitina y urea; la ornitina, por acción de la ornitino transaminasa, es a su vez convertida en semialdehído glutámico, que se metaboliza hasta prolina; la urea es transformada a CO_2 y amonio (45, 46).

Se han aislado seis tipos de mutaciones que presentan defectos en la inducción de arginasa. El primer tipo está constituida por la mutación recesiva *Car-80* (antes *carGR*) que resulta en una síntesis constitutiva de arginasa (*CAR1*) y ornitino transaminasa (*CAR-2*) (34). Los siguientes dos tipos son dominantes y cada uno está ligado al gene cuya expresión regula; es decir, la mutación *CAR10⁻* está ligada a *CAR 1* y resulta en la síntesis constitutiva de la arginasa, mientras que la mutación *CAR20⁻* está ligada a *CAR 2* y resulta en la síntesis constitutiva de la ornitino transaminasa (3).

Los tres tipos restantes tienen el mismo fenotipo recesivo, se han designado *arg80*, *arg81* y *arg82*, y resul

tan en la síntesis constitutiva de las enzimas de la biosíntesis de arginina, y en la incapacidad de utilizar -- ornitina o arginina como únicas fuentes de nitrógeno (3). El hecho de que estas tres mutaciones afecten tanto el catabolismo como la biosíntesis de arginina, condujo a Wiame et al (3) a proponer que el producto de estos genes constituye un represor ambivalente trimérico, que se denominó ARGR. Según el modelo de Wiame, en presencia de ornitina o arginina, este represor regula la biosíntesis como un represor clásico e induce el catabolismo, a través de inhibir la acción represora o la síntesis de un aporepresor de las enzimas catabólicas. El hecho de que los productos de los genes ARG80, ARG81 y ARG82 regulen de manera opuesta la biosíntesis y el catabolismo de arginina impide la operación de un ciclo futil de síntesis y degradación de este amino ácido.

Saccharomyces cerevisiae ha desarrollado un mecanismo de regulación peculiar, denominado control epiarginástico, que también excluye la operación simultánea de las vías biosintética y catabólica de arginina. En este organismo, la arginasa es capaz de inhibir a una de las enzimas biosintéticas, la ornitino transcarbamilasa (47,48).

El complejo enzimático así formado, conserva la actividad de arginasa, pero no la de ornitino transcarbamilasa (49).

La vía de degradación de arginina en *N. crassa*, es similar a la de *S. cerevisiae*, la arginina es el inductor de la arginasa (50), mientras que la glutamina reprime esta inducción (51), la ornitina y arginina son inductores de la ornitino transaminasa (52).

En *N. crassa* no se han aislado mutantes regulatorias como las reportadas en *S. cerevisiae*, sin embargo, la compartimentalización juega un papel importante que impide la operación simultánea de la biosíntesis y el catabolismo de arginina.

Weiss y Davis (53), han demostrado que *N. crassa*, distribuye la arginina en dos pozas subcelulares: una poza catabólica metabólicamente inactiva; y una poza vesicular, la acumulación vesicular de arginina es mediada por un sistema de transporte específico (54,55). Dado que la arginina retroinhibe su propia síntesis y es a la vez inductor de su catabolismo (50, 51), la concentración citosólica de arginina, determina la operación de la vía catabólica o de la vía biosintética. Es decir, cuando el

hongo se cultiva en medio mínimo, la concentración citosólica de arginina no es suficiente para inducir a la arginasa, mientras que en presencia de arginina, la concentración de este aminoácido en el citoplasma aumenta hasta 75 veces, induciéndose su catabolismo (53).

Los productos de los genes *nit-4*, *nir-A*, *DAL-80*, *DAL-81*, *uay*, *prnA*, *ARG-80*, *ARG-81* y *ARG-82* descritos anteriormente, representan señales regulatorias específicas. Existen otros genes, que codifican para productos, que regulan simultáneamente la inducción de varias enzimas del circuito catabólico nitrogenado.

CONTROL GENERAL:

Represión catabólica nitrogenada.- Como se explicó anteriormente, la utilización de fuentes de nitrógeno secundarias, es regulada por inducción. En presencia de una fuente de nitrógeno pobre, la síntesis de las enzimas catabólicas apropiadas es inducida; sin embargo, cuando simultáneamente se ofrece una buena fuente de nitrógeno,

esta inducción es reprimida; este fenómeno se conoce como represión catabólica nitrogenada y es una manifestación del uso selectivo de fuentes de nitrógeno de alta calidad.

La nitrato reductasa tanto de *A. nidulans* como de *N. crassa*, muchas de las enzimas de la vía de degradación de purinas, de prolina, de arginina y algunas otras enzimas del metabolismo nitrogenado de *S. cerevisiae*, *A. nidulans* y *N. crassa*, están sujetas a represión catabólica nitrogenada (1,34).

En el inciso anterior, se presentó la participación de diferentes productos génicos en la inducción de diferentes enzimas involucradas en la utilización de compuestos nitrogenados. Los genes *nit-4* y *nirA* de *N. crassa* y *A. nidulans*, afectan la inducción de la nitrato reductasa, pero no la represión catabólica nitrogenada (1).

En *S. cerevisiae* mutantes en el gene *DAL-80*, presentan una síntesis constitutiva de cinco enzimas de la vía de degradación de alantoina, que es reprimible por amonio (1), mutantes en el gene *DAL-81*, que han perdido la capacidad para inducir estas enzimas, aumentan el nivel basal de las mismas cuando estas se cultivan en fuentes de nitrógeno pobres (1). Así mismo, mutantes afectadas en --

genes ARG-80, ARG-81 y ARG-82 que presentan una incapacidad para inducir su arginasa tienen niveles basales de esta enzima, que son reprimibles por amonio (56). Finalmente, los genes *uay* y *prnA* de *A. nidulans* regulan la inducción de las enzimas de las vías de degradación de purinas y prolina respectivamente, sin afectar la represión catabólica (1).

Estudios realizados en *S. cerevisiae* y *N. crassa*, indican que la represión catabólica opera a nivel de la síntesis de ARN mensajero (34, 57, 58, 59).

Uno de los problemas mas controvertidos, ha sido la identificación de los productos que median la represión catabólica nitrogenada.

En *S. cerevisiae*, Wiame y col (60), propusieron a la deshidrogenasa glutámica y al producto del gene URE-2 -- como mediadores de la represión catabólica nitrogenada; posteriormente, estos mismos autores (61) propusieron que los productos de *gln-1* (glutamino sintetasa) y *gln R* mediaban esta represión, y que la glutamina era la señal reconocida por estas moléculas. Hasta la fecha, algunos de estos elementos han sido descartados como mediadores de este control; sin embargo, no existen suficientes datos

que permiten proponer cuales sean los moduladores de este sistema de control en esta levadura.

En *Aspergillus nidulans*, el producto del gene *are A* juega un papel central en la represión catabólica nitrogenada y se han descrito una variedad de mutaciones en *are A* (1). Las mutantes *areA^r*, son incapaces de utilizar una variedad de fuentes de nitrógeno tales como purinas, amino ácidos, amidas, nitratos y nitritos (1).

Mutantes *areA^d* pierden la represión por amonio de ciertas enzimas del circuito nitrogenado; como la nitrato reductasa, la xantino deshidrogenasa y algunas permeasas, todas estas enzimas sin embargo, requieren ser inducidas, lo que demuestra que *areA* solo esta involucrado en la regulación de la represión catabólica (1).

La diferencia entre los alelos *areA^r* y *areA^d* no es clara, ya que una determinada mutante *areA*, puede estar dereprimida para alguna actividad normalmente reprimida por amonio mientras otras actividades se continúan reprimiendo en presencia de amonio; es decir, cada mutante *areA* tiene un fenotipo específico.

Posiblemente el locus *areA*, codifica para una proteína que funciona como un elemento de control positivo

esencial para la síntesis de algunas enzimas del circuito metabólico nitrogenado. Apparently su papel sería el de detectar el contenido de nitrógeno celular reflejado por la presencia de algún metabolito.

El locus *tamA*, también juega un papel central en la represión catabólica, mutantes en este locus, tienen niveles bajos pero detectables de la deshidrogenasa glutámica biosintética y de nitrato reductasa.

Aun cuando *tamA* y *areA* no están ligadas, comparten algunas propiedades; el alelo *Tam A^dI* resulta en la de--represión de enzimas normalmente reprimidas por amonio; mientras que mutantes en el alelo *Tam A^h50* son incapaces de crecer en muchas fuentes de nitrógeno y carecen de varias enzimas reguladas por nitrógeno.

Los productos de *TamA* y *areA*, no representan mecanismos de control adecuado del mismo grupo de enzimas del circuito metabólico nitrogenado, posiblemente codifiquen para subunidades distintas de una proteína reguladora multimérica, o tal vez actúen a niveles diferentes en una secuencia regulatoria.

Ya que las mutantes *AreA^d* están dereprimidas, pero aun requieren de inducción, y las mutantes *nirA^c* sinteti-

san nitrato reductasa constitutivamente, posiblemente -- estas dos señales funcionen independientemente (1).

En *Neurospora crassa*, la glutamina juega un papel -- central en la represión catabólica nitrogenada. Mutantes que carecen de deshidrogenasa glutámica biosintética solamente son reprimidas en presencia de amonio y ácido -- glutámico o glutamina (62); mientras que mutantes que -- carecen de glutamino sintetasa, solamente son reprimidas por glutamina (62). Cuando la glutamino sintetasa se -- inactiva con L-metionina -DL- sulfoximina, solamente la glutamina es capaz de reprimir la síntesis de nitrato -- reductasa (63). Muchos compuestos nitrogenados como el - amonio, el ácido glutámico y algunos otros amino ácidos pueden ser convertidos a glutamina, ejerciendo estos, -- por lo tanto, un papel indirecto de represión.

El efecto represor de glutamina es a nivel de trans -- cripción (58, 59, 62).

El gene *nit-2* de *N. crassa*, regula la expresión de varias enzimas del metabolismo nitrogenado (nitrito re-- ductasa, enzimas de la vía de degradación de purinas y - aminoácidos, proteasa extracelular, L-amino ácido oxidasa) (1); mutantes alteradas en el gene *nit-2* son incapaces -

de inducir dichas enzimas (1). Marluff y col (1), han -
propuesto un mecanismo, para explicar la represión cata-
bólica, en el que la glutamina se propone como el metabo-
lito represor, inactivador del producto de *nit-2*; al - -
disminuir la concentración intracelular de glutamina, el
producto del gene *nit-2*, recupera su conformación activa,
que ahora le permite unirse a sitios de reconocimiento en
el ADN, adyacentes a los genes estructurales de las en-
zimas bajo su control, abriéndose la expresión de estos
genes. Este modelo predice, que el producto del gene - -
nit-2 debe tener afinidad por ciertas regiones de DNA y
por glutamina, haciendo uso de esta suposición, se ha lo-
grado purificar la proteína codificada por *nit-2* (64).

Aparentemente, el producto del gene *nit-2* parece ser
el regulador mas importante de la represión catabólica;
sin embargo, se han aislado otras mutantes que afectan -
la regulación de las enzimas del circuito metabólico ni-
trogenado; la mutante MS5 (57) que no reprime la sinte-
sis de algunas enzimas, aún en presencia de una cantidad -
de glutamina intracelular suficiente para reprimir la in-
ducción en una cepa silvestre, y la mutante *en-am1* que -
no es capaz de utilizar una serie de fuentes de nitrógeno
(65).

El modelo de regulación presentado por Marzluff (1), no contempla los productos génicos de MS5 y *en-aml*, seguramente la represión catabólica, tendrá que ser explicada - tomando en cuenta nuevos elementos que desde luego resultará en un sistema mas complejo del que actualmente se presenta.

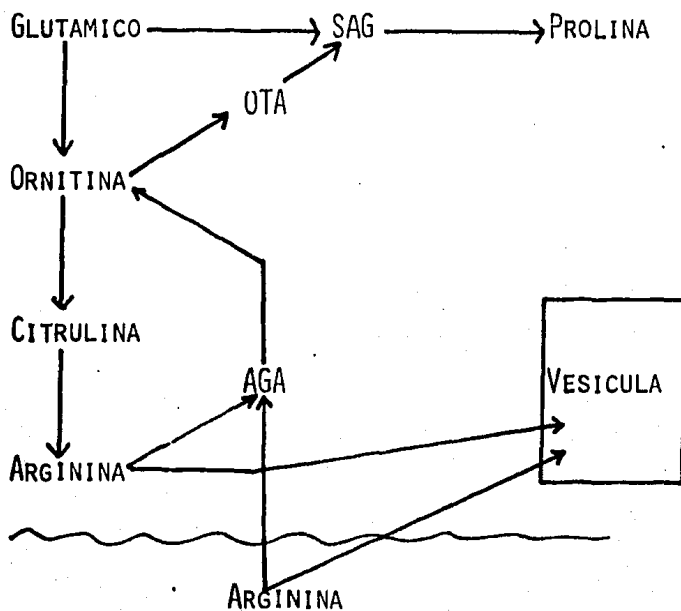


Figura 1.- Representación esquemática del metabolismo de arginina y prolina en *Neurospora crassa*, SAG; semialdehído glutámico, OTA; ornitino transaminasa, AGA; Arginasa.

OBJETIVOS.-

La represión catabólica nitrogenada, constituye un sistema de control, que resulta en una utilización selectiva de fuentes de nitrógeno de alta calidad. En *Neurospora crassa*, la síntesis de muchas enzimas que pertenecen al circuito catabólico nitrogenado es reprimida por glutamina (1); posiblemente al interaccionar esta con el producto del gene *nix-2* actuando como un correpresor (1).

El aislamiento de mutantes cuyas enzimas sean insensibles a la represión por glutamina, puede contribuir a un mejor entendimiento de este mecanismo de regulación.

Si la glutamina reprime la inducción de enzimas que catabolizan fuentes de nitrógeno secundarias, la selección directa de mutantes resistentes a este amino ácido, no es posible.

Un enfoque experimental posible es el que utilizaron Premakumar y col (57); los cuales aislaron mutantes en las que la inducción de la nitrato reductasa, ya no era reprimida por glutamina. A partir de una cepa silvestre, mutagenizada con nitrosoguanidina, rescataron aquellas colonias, que en presencia de glutamina y nitrato, se

teñían con un compuesto indicativo de la presencia de nitrato reductasa. Se encontró que la glutamina ya no reprimía la inducción de la nitrato reductasa, la nítrito reductasa, la histidasa y la acetamidasa.

El objetivo de este trabajo, ha sido el aislamiento y caracterización de mutantes resistentes a glutamina, obtenidas por un método que constituye una alternativa mejor y casi única para aislar este tipo de mutantes.

En *N. crassa* la arginina es degradada por la arginasa obteniéndose ornitina y urea, la ornitina es posteriormente degradada por medio de la ornitino transaminasa hasta semialdehído glutámico, a partir del cual se puede obtener prolina, de tal suerte que la arginina constituye una fuente de prolina, que puede ser utilizada por auxótrofos de prolina (Fig.1). La síntesis de la arginasa, es reprimida por glutamina (51), por lo tanto cuando el cultivo se adiciona de arginina y glutamina, la degradación de la arginina se bloquea y éste aminoácido no puede ser utilizado ni como fuente de nitrógeno ni de prolina, por lo tanto, auxotrofos de prolina no crecen en medios de cultivo adicionados de arginina y glutamina, Ya que el catabolismo de arginina y no el de glutamina resulta en

la obtención no solamente de amonio, sino también de prolina, auxotrofos de prolina cuya arginasa sea resistente al efecto represivo de glutamina sobre la inducción de la arginasa, serán capaces de crecer en medios adicionales de arginina y glutamina, a diferencia de los auxotrofos de prolina en los que la síntesis de la arginasa sigue sujeta a represión por glutamina. A partir de un doble auxotrofo, de arginina y prolina, se aislaron mutantes capaces de crecer en medios de cultivo adicionados de arginina y glutamina. El fenotipo de una de estas mutantes es el siguiente:

- 1) La arginasa y la glutamino sintetasa no están sujetas a represión por glutamina
- 2) Cuando se cultiva en medio mínimo, crece óptimamente, acumulando arginina, alanina, glutámico y glutamina
- 3) La mayor parte de la ornitina acumulada en esta cepa, y un 30% de la glutamina están secuestradas en vesículas.

El aislamiento y caracterización de esta mutante han permitido identificar una asa regulatoria del circuito catabólico nitrogenado constituido por la arginasa, la

glutamino sintetasa y el sistema de transporte vesicular
de amino ácidos.

DISCUSION

Los productos finales del catabolismo de arginina -- que pueden ser utilizados como fuentes de nitrógeno por *Neurospora crassa* son: el amonio, el ácido glutámico y la glutamina, de estos unicamente; la glutamina reprime la inducción de la arginasa (51) y de la glutamino sintetasa (66). La prolina, también es un producto del catabolismo de arginina; por lo tanto, un doble auxotrofo de prolina y arginina puede crecer en medios adicionados de arginina. En presencia de arginina y glutamina, este doble auxotrofo no es capaz de crecer, ya que la glutamina al reprimir la síntesis de arginasa, impide el catabolismo de arginina, y por lo tanto la obtención de prolina. En este trabajo hemos reportado, el aislamiento de una mutante resistente a glutamina [*gln-R*],

El fenotipo *gln-R* es conferido por una mutación regulatoria monogénica que altera la regulación por glutamina de la arginasa, la glutamino sintetasa y la acumulación de amino ácidos.

Weiss y Davis, (67) han estudiado la distribución intracelular de arginina en *Neurospora crassa*, y han --

encontrado, que menos del 5% de este amino ácido se encuentra soluble en el citoplasma, mientras que el resto, se encuentra secuestrado dentro de una vesícula (67). La arginina secuestrada, representa una poza metabólicamente inactiva y la poza citoplásmica es utilizada tanto para síntesis de proteínas como para catabolismo (67).

Cuando el hongo se cultiva en medio mínimo, la concentración citosólica de arginina es tan pequeña, que satisface la K_m de la arginil-tRNA sintetasa, pero no la de la arginasa, y en estas condiciones la poza citosólica solamente es utilizada para síntesis de proteínas. Ahora bien, cuando *Neurospora crassa* se cultiva en presencia de arginina, la poza citosólica de este amino ácido aumenta rápidamente, iniciándose el catabolismo de este compuesto (67).

Se ha demostrado, que el catabolismo de arginina puede ocurrir aún con los niveles basales de arginasa, es decir, en ausencia de inducción de esta enzima y antes de la expansión total de la poza de arginina (67).

El catabolismo de arginina por lo tanto, depende de que la concentración citoplásmica de este amino ácido sea suficiente para satisfacer la K_m de la arginasa. Sin

embargo, la capacidad máxima de esta enzima, va a estar dada además por su cantidad, la que a su vez depende de que su síntesis pueda ser inducida, lo que solamente sucede cuando además de estar alterada la arginina, la concentración de glutamina es lo suficientemente baja como para no reprimir la síntesis de la arginasa ().

La compartimentalización de la arginina representa entonces, un mecanismo primario de control que regula el catabolismo de arginina, ya que en *Neurospora crassa*, la síntesis de las enzimas de las vías biosintéticas y catabólica están muy poco reguladas a nivel de inducción-represión.

Legerton y Weiss (68), encontraron que en condiciones de deprivación de nitrógeno, las pozas de arginina y ornitina desaparecen rápidamente debido a una degradación catalizada por enzimas preexistentes. La movilización de estos amino ácidos, sin embargo, no responde ni a la deprivación de carbono ni a la inhibición de la síntesis de proteínas. Estos autores sugieren que la deprivación de nitrógeno puede alterar específicamente la distribución de arginina y ornitina entre las vesículas y el citoplasma. Dado que la glutamina regula la degradación de compuestos nitrogenados, no es difícil imaginar que este amino ácido, sea también la señal nitroge-

nada que module el contenido vesicular de amino ácidos.

La mutante *gln-R*, es capaz de crecer exponencialmente y acumular al mismo tiempo pozas elevadas de amino ácidos. En amonio acumula pozas de ácido glutámico, glutamina y arginina mayores a las encontradas en la cepa silvestre (Tabla 3), las tablas corresponden a las del artículo *Neurospora crassa* Mutant Impaired in Glutamine Regulation, cuya copia se adjunta, cuando se cultiva en glutamina como única fuente de nitrógeno, acumula pozas mayores de arginina y glutamina (Tabla 1); en ambos casos, aproximadamente el 70% de la arginina y el 30% de la glutamina, se encuentran secuestrados en vesículas (Tabla 6). Así mismo cuando la mutante *gln-R* se cultiva en concentraciones de amino limitantes o en fuentes de nitrógeno secundarias como arginina o nucleósidos, acumula pozas de arginina mayores que la cepa silvestre (tablas 1, 4 y 5).

Tanto la arginasa, como la glutamino sintetasa de la mutante *gln-R* son menos sensibles a represión por glutamina, aun cuando esta cepa tiene un contenido intracelular de glutamina y arginina mayor que la cepa silvestre. Como se dijo anteriormente, en comparación con la cepa silvestre, la mutante *gln-R* tiene una proporción --

mas alta de glutamina en vesículas; sin embargo, la mayor parte de este amino ácido se encuentra soluble y metabólicamente activo para ejercer su efecto represivo (Tabla 6).

La mutación *gln-R*, ha afectado por lo tanto la regulación de la arginasa y de la glutamino sintetasa por glutamina, y la distribución subcelular de amino ácidos. Esto sugiere, que la glutamina pudiera ser una de las señales regulatorias que modulan el tráfico de amino ácidos entre la vesícula y el citoplasma. Sin embargo, de ninguna manera es clara la relación que existe entre el papel de la glutamina como regulador de su síntesis y de la síntesis de otras enzimas del circuito catabólico nitrogenado y como regulador del tráfico de amino ácidos entre la vacuola y el citoplasma. Posiblemente, La menor represión de la glutamino sintetasa por glutamina, observada en la mutante *gln-R* pudiera dar como resultado un mayor flujo de nitrógeno que conduzca a la acumulación de glutamina, arginina, alanina y ácido glutámico en exceso de amonio. Es aquí donde hay que tomar en cuenta, que en la mutante *gln-R*, las amino ácidos se pueden acumular en la vesícula, incluyendo a la glutamina, que a su vez puede conducir a que se sobreponga otro mecanismo que module el efecto de

la glutamina en la represión nitrogenada,

Recientemente, Mora y col. (en preparación), han encontrado que una cepa de *Neurospora crassa* (Am-132) que presenta una deleción en el gene estructural de la deshidrogenasa glutámica biosintética y que por lo tanto es un auxotrofo parcial de glutámico, crece mal en nitrato como fuente de nitrógeno, sin embargo acumula una poza muy elevada de ácido glutámico, el que posiblemente este compartamentalizado.

Las mutantes que carecen de deshidrogenasa glutámica biosintética presentan un crecimiento residual en medio mínimo; en esta condición el glutámico se sintetiza a partir de glutamina por medio de la glutamato sintetasa (71). Este crecimiento residual es inhibido por glicina, debido a que este amino ácido, inhibe la actividad de la glutamino sintetasa, afectandose así la síntesis de glutamina, (Hernández and Mora en preparación). A partir de la cepa Am-132, Mora y col. (en preparación), aislaron mutantes-resistentes a glicina (*gli-R*), que ahora son capaces de crecer en presencia de amonio y glicina. A diferencia de la cepa Am-132, las dobles mutantes Am-132; *gli-R*, no acumulan ácidos glutámico y crecen mejor en amonio. El -

fenotipo de las mutantes resistentes a glicina puede atribuirse a una mutación regulatoria de la glutamino sintetasa o a una mutación que altere la regulación de la vesícula.

Esta paradoja nos muestra que la regulación del tráfico del amino ácido entre la vesícula y el citoplasma, es un fenómeno complejo, y posiblemente regulado por diferentes señales metabólicas. El estudio de la mutación *gln-R* nos ha permitido proponer a la glutamina como una de estas señales. Si bien la glutamina puede regular el transporte de la vesícula, a su vez esta puede ser regulada por otras señales que resulten en la compartimentalización de glutamina.

En *Saccharomyces cerevisiae* la compartimentalización de amino ácidos ha sido muy estudiada (69), y se ha encontrado que la distribución subcelular de amino ácidos depende de la fuente de nitrógeno, de la asimilación de amoníaco y de la velocidad de síntesis de proteína; por otro lado, la acumulación vesicular de amino ácidos básicos regula la distribución de las pozas de otro amino ácido (70).

Hummelt *et al* (71), han reportado que en *Neurospora*

crassa, la actividad de la glutamato sintasa, se reprime en presencia de ácido glutámico o glutamina. Como se muestra en la tabla 2, la glutamato sintasa tanto de la mutante *gln-R*, como de la cepa silvestre se encuentran reprimidas en presencia de glutamina; este dato sugiere que, o bien la mutación *gln-R* no afecta la regulación por glutamina de la glutamato sintasa, o que al igual que en otros microorganismos (72) la expresión de la glutamato sintasa es en realidad regulada solamente por el ácido glutámico (71).

La glutamina modula la expresión de una serie de enzimas del metabolismo nitrogenado (1), y podría considerarse como la señal metabólica que regula la represión catabólica nitrogenada; sin embargo, la naturaleza de las macromoléculas que juegan un papel directo en la represión catabólica nitrogenada es poco conocida.

Marzluff *y col* (1) han postulado un mecanismo para explicar la represión catabólica nitrogenada en el que se propone que la glutamina es el metabolito represor que a su vez interacciona directamente con el producto de *nit-2* convirtiéndolo a su forma inactiva. Cuando la concentración celular de glutamina disminuye, el producto de *nit-2*

adquiere una conformación activa uniéndose en el ADN a secuencias de reconocimiento adyacentes a cada gene estructural, induciéndose así su expresión. El producto del gene *nit-2* regula la expresión de los genes estructurales de la nitrato y nitrito reductasa, de las enzimas de las vías catabólicas de purinas y de algunos amino ácidos, de una proteasa extracelular, y de la L-aminoácido oxidasa (1). Recientemente hemos encontrado, que el producto de *nit-2* regula también la expresión de la glutamino sintetasa, previniendo su inducción cuando el hongo se cultiva en ácido glutámico como única fuente de nitrógeno o en la limitación de amonio; en esta última condición sin embargo, la actividad de la glutamato sintasa de la mutante *nit-2* es el doble de la encontrada en la cepa silvestre, posiblemente este aumento en la síntesis de glutamato sintasa compense la baja inducción de la síntesis de glutamino sintetasa. La inducción de la glutamato sintasa no es afectada por la mutación *nit-2* este dato sugiere nuevamente que la expresión de la glutamato sintasa no está regulada por glutamina. (Mora y González en preparación). Al igual que otros autores, hemos encontrado que la inducción de la deshidrogenasa glutámica biosintética también

es regulada por el producto del gene *nct-2* encontrándose una inducción menor de esta enzima en exceso de amonio - (73).

Existen otras dos mutantes, la *en-am1* y la *MS5* distintas de la *nct-2* que ejercen su efecto sobre algunas enzimas del metabolismo nitrogenado (65,57). La mutante *en-am1*, presenta una síntesis constitutiva tanto de la prolina oxidasa como de la L-amino ácido oxidasa es decir en esta mutante estas enzimas se sintetizan en ausencia de inductor; sin embargo en presencia de los inductores específicos la actividad de estas enzimas disminuye (65).

Por otro lado, recientemente se ha reportado que la mutación *MS5*, impide la represión por glutamina de algunas de las enzimas del circuito catabólico nitrogenado (63). El gene *MS5⁺*, podría codificar para un represor específico de este circuito,

Se han descrito entonces, tres genes que pueden estar involucrados en la regulación del metabolismo nitrogenado [*nct-2*, *en-am1*, *MS5*]. Es posible que tanto la mutación *MS5* como la *en-am1*, mas que afectar directamente la síntesis de un producto regulario, afectan la distribución sub celular de metabolitos; este aspecto de la regulación del

metabolismo nitrogenado, ha sido poco estudiado y la mutación *gln-R*, es la primera descrita en *Neurospora crassa* - que afecta esta distribución.

Hemos iniciado el estudio de las relaciones entre la mutación *gln-R* y las otras mutaciones descritas. Hasta -- ahora hemos encontrado que la mutación *gln-R* y la *nit-2* - no son alélicas. El análisis de la fisiología de dobles - mutantes *gln-R; nit-2*, *glnR; MS5*, y *gln-R; en-am1*, seguramente permitirá plantear de manera mas clara el papel regulatorio de la mutación *gln-R*.

En relación a la regulación coordinada de diversas en zimas es de gran interés el sistema de control general de amino ácidos de levadura, regula la expresión de genes no ligados en algunas de las vías biosintéticas de amino áci dos (73). La deprivación de amino ácidos, da como resulta do la derrepresión de algunas de las vías biosintéticas ~ de amino ácidos (74). Existen mutantes regulatorias que ~ resultan en una síntesis constitutiva de las enzimas que participan en este circuito, Recientemente se ha encontra do, que la secuencia 5'-TGACTC-3" es necesaria para la -- derrepresión de la síntesis del RNAm del gene *HIS-4* de -- *Saccharomyces cerevisiae*, posiblemente esta región del -- DNA, media la regulación de la transcripción de este ~

circuito. Supuestamente, existen secuencias nucleotídicas similares en la región 5' de todos los genes sujetos a este control (74). Es factible que un sistema similar sea el responsable de la síntesis de los transcritos correspondientes al circuito metabólico nitrogenado en *Neurospora crassa*.

Por último en la mutante *gln-R*, al igual que en condiciones de no crecimiento (75), se requiere resintetizar glutamina para la biosíntesis de arginina, ya que dobles mutantes portadoras de la asimilación de amonio en ácido glutámico (*am-1*) o en glutamina (*gln-1b*), acumulan menos arginina que la cepa *gln-R* cuando la glutamina es la única fuente de nitrógeno (Fig. 2).

Al igual que en condiciones de no crecimiento (76), la mutante *gln-R* acumula aminoácidos en presencia de una buena fuente de carbono (Tabla 3), esto apoya el del ciclo de la glutamina propuesto por Espín y col (75) durante el cual la glutamina se degrada y resintetiza. Las ventajas que representa el degradar y resintetizar glutamina por este ciclo, son que el carbono y el nitrógeno se utilicen para sintetizar amino ácidos en general y arginina y/o glutamina en particular.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Marzluff, G.A. Microbiol. Rev. 45: 437-461.1981
- 2.- Jacob, F. and J. Monod. J. Mol. Biol. 3: 318-356.1961
- 3.- Wiame, J.M. en Current Topics in Cellular Regulation 4: (edit. Horecher, B.L. and Stadman, E.R.) 1-38. Academic Press, New York, 1971.
- 4.- Thuriaux, P., F. Ramos, A. Pierard, M. Grenson, and J. M. Wiame. J. Mol. Biol. 67: 277-287. 1972
- 5.- Douglas, H.C. and D.C. Hawthorne. Genetics. 54: 911-916. 1966.
- 6.- Toh-e, A. and Y. Oshima. J. Bact. 120:608-617.1974.
- 7.- Pateman, J.A., and D.J. Cove. Nature. 215: 1234-1237. 1967.
- 8.- Scazzochio, C., F.B. Holl, and I. Foguelman. Eur. J. Biochem. 36: 428-445.1973.
- 9.- Scazzochio, C., and H.N. Arst. Nature. 274: 177-179. 1978.
- 10.- Valone, J.A., M.E. Case., and N.H. Giles. Proc. Natl. Acad. Sci. 68: 1555-1559. 1971.
- 11.- Nason, A. Bact. Rev. 26: 16. 1962.
- 12.- Garret, R.H. and A. Nason. J. Biol. Chem. 244: 2870-2882. 1969.
- 13.- Nicholas, D.J.D. and A. Nason. J. Biol. Chem. 211: 183-197. 1954.

- 14.- Kinsky , S.C. J. Bacteriol. 82: 898-904.1961.
- 15.- Nason, A. and H. J. Evans. Methods. Enzymol. 2:411-415. 1955.
- 16.- Schloemer, R.H. and R.H. Garrett. J. Bacteriol.118: 270-274. 1974.
- 17.- Cove, D.J. Biochim. Biophys. Acta. 113: 51-56. 1966.
- 18.- Sorger, G.J. and J. Davies. Biochem. J. 134: 673-685. 1973.
- 19.- Subramanian, K.N. and G.J. Sorger. J. Bacteriol.110: 538-546. 1972.
- 20.- Tomsett, A.B. and R.H. Garret. Genetics 95: 649-660. 1980.
- 21.- Tomsett, A.B. and D.J. Cove. Genet. Res. 34: 19-32. 1979.
- 22.- Cove, J.D. Biol. Rev. 54: 291-327. 1979.
- 23.- Scazzocchio, C. Molybdenum containing enzymes. p. - 487-515. W. Coughlan (ed.), Pergamon Press, Oxford.
- 24.- Arst, H.N. Jr., K.N. Rand, and C.R. Bailey. Mol. - Gen. Genet. 174: 89-100.
- 25.- Rand, K.N. and H.N. Arst. Molec. Gen. Genet. 155: 67-75. 1977.
- 26.- Cove, D.J. and J.A. Pateman. J. Bacteriol.97: 1374-1378. 1969.

- 27.- Tomsett, A.B., and R.H. Garret. Mol. Gen. Genet. 184: 183-190. 1981.
- 28.- Premakumar, R., G.J. Sorger, and D. Gooden. 1978. - Biochim. Biophys. Acta. 519: 275-278. 1978.
- 29.- Scazzocchio, C., N. Sdrin., and G. Ong. Genetics - - 100: 185-208. Feb. 1982.
- 30.- Philippides, D., and C. Scazzocchio. Mol. Gen. Genet. 181: 107-115. 1981.
- 31.- Scazzocchio, C. Mol. Gen. Genet. 125: 147-155. 1973.
- 32.- Winther, M.D., D. Phillipides, H.M. Sealy-Lewis, C. Scazzocchio, R.A. Kockington, and R.W. Davies. - - Heredity 44: 288. 1980.
- 33.- Cooper, T.G. Trends. Biochem. Sci. 5: 332-334. 1980.
- 34.- Cooper, T.G., En The Molecular Biology of the yeast *Saccharomyces*. Metabolism and gene expression. (Eds. J.N. Strathern, E. W. Jones. J.B. Broach). p. 39. 1982.
- 35.- Cooper, T.G., and R.P. Lawther. Proc. Natl. Acad. - Sci. 70: 2340-2344. 1973.
- 36.- Whitney, P. A., T.G. Cooper, and B. Magasanik. J. Biol. chem. 248: 6203-6209. 1973.
- 37.- Chisholm, G. and T.G. Cooper. Mol. Cell. Biol. 2: 1088-1095. 1982.

- 38.- Turoscy, V. and T.G. Cooper. J. Bact. 151: 1237-1246. 1982.
- 39.- Arst, H.N. Jr., D.W. MacDonald. Nature 254:26-31. 1975.
- 40.- Arst, H.N. Jr., D.W. MacDonald, and S.A. Jones. J. Gen. Microbiol. 116: 285-294. 1980.
- 41.- Arst, H.N. Jr., and D.W. MacDonald. Mol. Gen. Genet. 163: 17-22. 1978.
- 42.- Giles, N.H. Am. Natur . 112: 641-657. 1978.
- 43.- Case, M.E. and N.H. Giles. P.N.A.S. 72: 553-557. 1975
- 44.- Brandriss, M.C. and B. Magasanik. J. Bacteriol. 140: 498-503. 1979.
- 45.- Middelhoven, W.J. Biochim Biophys. Acta. 93: 650. 1964.
- 46.- Brandriss, M.C. and B. Magasanik. J. Bacteriol. 143: 1980.
- 47.- Bechet, J., and J. M. Wiame. Biochem. Biophys. Res. Commun. 21: 226-234. 1965.
- 48.- Messenguy, F., and J.M. Wiame. FEBS. Lett. 3: 47-49. 1969.
- 49.- Pennicks, M. Eur. J. Biochem. 58: 533-538. 1976.
- 50.- Castañeda, M., J. Martuscelli and J. Mora. Biochem. Biophys. Acta. 141: 276. 1967.
- 51.- Vaca, G. and J. Mora. J. Bacteriol. 131: 719. 1977.

- 52.- Davis, R.H., M.B. Lawless, and L.A. Port. J. Bacteriol 102: 290. 1970.
- 53.- Weiss, R.L. J. Bacteriol 126: 1173. 1977.
- 54.- Drainas, C. and R.L. Weiss. J. Bacteriol 150: 779-784. 1982.
- 55.- Cybis, J. and R.H. Davis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 60: 629-634. 1974.
- 56.- Wiame, J.M. Proceedings of the third International Specialized Symposium on Yeasts Helinski (ed H. Soumalalien and C. Waller) part II: p. 307. 1973.
- 57.- Premakumar, R., G. J. Sorger, and D. Gooden. J. Bacteriol. 144: 542-551. 1979.
- 58.- Wang, L.C., and G.A. Marzluf, Mol. Gen. Genet. 176: 385-392.
- 59.- Sánchez, F., M. Campomanes, C. Quinto, W. Hansberg, J. Mora, and R. Palacios. J. Bacteriol. 136: 880-885. 1978.
- 60.- Grenson, M. and C. Hou. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48: 749. 1972.
- 61.- Dubois, E., S. Vissers, M. Grenson, and J. M. Wiame. Biochem. Biophys. Res. Commun. 75: 223. 1977.
- 62.- Premakumar, R., G.J. Sorger, and D. Gooden. J. Bacteriol. 137: 1119-1126. 1979.

- 63.- Premakumar, R., G.J. Sorger, and D. Gooden. J. Bacteriol. 143: 411-415, 1980,
- 64.- Grove, G. and G.A. Marzluf. J. Biol. Chem. 256: 463-470. 1981,
- 65.- Chambers, J.A.A. and S.A. Wilkins. Current Genetics, 6: 87-90. 1982,
- 66.- Vichido, I., Y. Mora, C. Quinto, R. Palacios, and J. Mora, J. Gen. Microbiol. 106: 251. 1978.
- 67.- Weiss, R.L. and R.H. Davis, J. Bacteriol. 129: 866, 1977.
- 68.- Legerton, T.L. and R.L. Weiss, J. Bacteriol. 138: 909, 1979,
- 69.- Wiemben, A. and M. Durr, Arch, Microbiol. 101: 45, 1974,
- 70.- Messenguy, T., D. Colin and J.P. Ten Have. Eur. J. Biochem. 108: 439. 1980,
- 71.- Hummelt, G. and J. Mora, Biochem, Biophys, Res, Commun. 96: 1688-1694. 1980.
- 72.- Dendinger, S.M., L.G. Patil and J.E. Brenchley. J. Bacteriol. 141: 190-198, 1980,
- 73.- Dantzing, A.H., F.L. Weigmann and A. Nason, J. Bacteriol. 137: 1333-1339, 1979,
- 74.- Donahue, T.F., R.S. Davis, G. Lucchini, and G. R. Fink, Cell. 32: 89-98, 1983,

75.- Espín, G., R. Palacios and J. Mora, J. Gen. Microbiol.
115: 59, 1979.

76.- Mora, Y. , G. Espín, K. Willms, and J. Mora, J. Gen.
Microbiol. 104: 241, 1978.

Neurospora crassa Mutant Impaired in Glutamine Regulation

ALICIA GONZÁLEZ, MINERVA TENORIO, GERARDO VACA,[†] AND JAIME MORA*
Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México,
Cuernavaca, Morelos, México

Received 8 November 1982/Accepted 11 April 1983

The final products of the catabolism of arginine that can be utilized as nitrogen sources by *Neurospora crassa* are ammonium, glutamic acid, and glutamine. Of these compounds, only glutamine represses arginase and glutamine synthetase. We report here the isolation and characterization of a mutant of *N. crassa* whose arginase, glutamine synthetase, and amino acid accumulations are resistant to glutamine repression (*gln*^r). This mutant has a greater capacity than the wild type (*gln*^s) to accumulate most of the arginine and some of the glutamine in osmotically sensitive compartments while growing exponentially. Nonetheless, the major part of the glutamine remains soluble and metabolically available for repression. We propose that the lower repression of glutamine synthetase by glutamine in this mutant could be a necessary condition for sustaining the higher flow of nitrogen for the accumulation of amino acids observed in ammonium excess and that, if glutamine is the nitrogen signal that regulates the arginine accumulation of the vesicle, the *gln*^r mutant has also escaped this control. Finally, in the *gln*^r mutant, some glutamine resynthesis is necessary for arginine biosynthesis and accumulation.

Glutamine is one of the final products of inorganic nitrogen assimilation and of nitrogen catabolism; in addition, it is a donor of nitrogen for macromolecular synthesis. Evidence has been presented indicating that glutamine regulates nitrogen catabolism in fungi by repressing various enzymes, such as allantoinase in *Saccharomyces carlsbergensis* (35), several amidases and histidase in *Aspergillus nidulans* (21), arginase, glutamine synthetase, nitrate reductase, and glutamate synthase in *Neurospora crassa* (4, 11, 12, 20, 34, 37), and allantoinase, urea amidolyase, catabolic NAD glutamic dehydrogenase (10), and glutamine synthetase in *Saccharomyces cerevisiae* (24). Some of these studies have shown that ammonium and glutamic acid, through their conversion to glutamine, are effective repressors of nitrogen catabolism. Glutamine apparently exerts its repressive effect at the transcriptional level, since its addition prevents the accumulation of translatable mRNA for nitrate reductase (29), uricase (40), and glutamine synthetase (31). In this regard, it has been found that, in *N. crassa*, the *nit-2* control gene encodes a DNA-binding protein that interacts with glutamine and which is postulated to play a major role in the expression of the genes involved in nitrogen assimilation (18).

Mutations that impair the repressive effect of glutamine on nitrate reductase, nitrite reductase, histidase, and acetamidase have been reported in *N. crassa* (30).

We describe here the isolation and characterization of a *N. crassa* mutant whose arginine catabolism is resistant to glutamine repression. The results will show that the arginase and glutamine synthetase of this mutant are less sensitive to repression by glutamine and that during exponential growth this strain accumulates glutamine, arginine, and other amino acids.

MATERIALS AND METHODS

Stocks. All stocks came from the collection of J. Mora and from the Fungal Genetics Stock Center at the Humboldt State University Foundation, Arcata, Calif. The basic stocks were the 74-A and 73-a wild types; the *arg-5* auxotrophic strain, which lacks *N*-acetyl- γ -semialdehyde transaminase (D. H. Morgan, *Neurospora* Newsl. 8:8, 1965) and grows on ornithine, citrulline, or arginine; the *prol-3* strain, which is unable to synthesize proline and grows on proline, ornithine, and arginine (39); the *gln-1b* strain, which grows only on glutamine (5); and the glutamic acid dehydrogenase-deficient mutant *am-1* (17). Other double and triple mutants were obtained from the appropriate crosses.

Growth conditions. *N. crassa* was grown on liquid minimal medium of Vogel (38), supplemented with 1.5% sucrose and 25 mM NH₄NO₃. In some experiments the carbon and nitrogen sources were substituted as stated in the text. Fed-batch ammonium-limited cultures of *N. crassa* were achieved as previously

[†] Present address: Instituto Mexicano del Seguro Social, Unidad de Investigación Biomédica, Guadalajara, Jalisco, México.

reported (25). Conidia were harvested from slants, supplemented with 1.5% sorbose and 5 mM glutamine as sole nitrogen source, which had been incubated in the dark for 3 days at 29°C followed by 2 days under incandescent light at 25°C.

Cultures were started by inoculating conidia into Florence flasks containing the various media. Incubation was carried out for 12 h at 25°C with continuous bubbling of hydrated air.

Mutagenesis and mutant selection. A heavy suspension of spores of the *arg-5;prol-3* strain was suspended in an aqueous solution of 0.01% *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine and incubated with shaking in the dark at 25°C for 1 h. Under these conditions 10% survival was obtained. After the mutagenic treatment, conidia were centrifuged for 10 min at 2,000 rpm, washed twice, and resuspended in sterile water. Samples from this suspension were plated on germination media containing glucose and fructose (0.05% each) and 1% sorbose as carbon sources and arginine (100 µg/ml) and glutamine (500 µg/ml) as nitrogen sources. Plates were incubated at 29°C. Parental spores failed to germinate; rare colonies which appeared after day 2 of incubation were isolated and transferred to slants of the same medium containing sorbose as the only carbon source. Spot testing, crosses, and progeny analysis were carried out as previously reported (32).

Determination of glutamine synthetase, arginase, and glutamate synthase activities. Glutamine synthetase activity was measured by the transferase assay, following the method of Ferguson and Sims (16), in cell-free extracts obtained as previously described (28). Units of activity were expressed as micromoles of γ -glutamyl hydroxamate produced per minute at 30°C. Preparation of cell-free extracts and measurement of in vitro arginase and glutamate synthase were done as previously reported (19, 34).

Determination of amino acid pools. Samples were prepared by homogenizing mycelium with 80% (vol/vol) ethanol. The homogenates were boiled for 10 min, cooled, and filtered through membrane filters (type RAWP 047; Millipore Corp., Bedford, Mass.). The filtrates were lyophilized and the samples were resuspended in lithium citrate buffer (pH 2.88). The sorbitol present in the fractions obtained during spheroplast fractionation was eliminated as follows: samples were precipitated with 1 volume of 10% trichloroacetic acid and centrifuged, and the supernatant was neutralized. A 1-ml portion was passed through a column (5 by 70 mm) of Dowex-50W resin 50X8-400 (200 to 400 mesh, hydrogen form) and eluted with 0.35 N sodium citrate (pH 8.0). The amino acids were separated with an Aminco amino acid analyzer and quantified in an Aminco ratio fluorometer after coupling with *o*-phthalaldehyde. Arginine was extracted from filtered conidia with 2 ml of 5% trichloroacetic acid. After centrifugation, arginine was determined in the supernatant fluid by the method of van Pilsom et al. (36).

Protein determination. Samples of mycelium were collected on membrane filters (type HA, 0.45 µm; Millipore Corp.) and washed with 2 volumes of distilled water. The suspended samples were then precipitated with 2 ml of 5% trichloroacetic acid and centrifuged for 5 min at 2,000 rpm, and the pellets were suspended in 1.0 N NaOH. Protein was determined by

the method of Lowry et al. (26), using bovine serum albumin as a standard.

Preparation and fractionation of spheroplasts. Procedures for the preparation of spheroplasts and the fractionation of *Neurospora* mycelium were as reported by Weiss and Davis (42).

Chemicals. Amino acids, *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, and methionine-*DL*-sulfoximine were obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. Only L-amino acids, sterilized by filtration, were used.

RESULTS

Genetic and phenotypic analyses. The *prol-3* strain of *N. crassa* grows well when the medium is supplemented with proline, arginine, or ornithine (34). Through the concerted action of arginase (3, 6) and ornithine transaminase (7), arginine and ornithine are catabolized to glutamic acid semialdehyde, an intermediate which this strain is unable to synthesize via the normal biosynthetic pathway. Glutamine, by repressing arginase induction, prevents the catabolism of arginine and, consequently, the growth of the *prol-3* mutant. A similar effect of glutamine was found in the *arg-5;prol-3* mutant, a double mutant unable to synthesize arginine or proline (34). This double auxotroph was used as the parental strain for mutant selection because it does not grow at all in minimal medium in contrast to the *prol-3* mutant, which is leaky under this condition. Several *arg-5;prol-3* glutamine-resistant (*gln^r*) mutants were selected for their capacity to grow on arginine in the presence of glutamine. One of these mutants was crossed with the 74-A wild-type strain; ascospore analysis of the progeny carrying the *prol-3* mutation yielded clones of which 50% were sensitive to glutamine (*gln^s*) and 50% were resistant to this amino acid (*gln^r*). Similar results were obtained when the eight ascospores of one particular ascus from the cross *arg-5;prol-3;gln^r* × 74-A were analyzed; progeny were obtained as follows: prototrophic, *arg-5;prol-3;gln^s*, and *arg-5;prol-3;gln^r*. One of the prototrophs, when crossed with an *arg-5;prol-3;gln^s* strain, yielded *prol-3* mutant progeny nearly half of which were *gln^r* (48%). A cross between the *arg-5;prol-3;gln^s* strain and wild-type 74-A did not yield *prol-3;gln^r* progeny. These results indicate that, in strains carrying the *prol-3* mutation, a single mutation (*gln^r*) was responsible for allowing growth on arginine in the presence of glutamine. In an otherwise wild-type background this new mutation is cryptic; i.e., it leads to growth in minimal medium which matches the growth of the wild-type 74-A. The *gln^r* mutation was identified in the prototrophic strain because it conferred resistance to 10 mM methionine sulfoximine in minimal medium, as opposed to the wild-type strain 74-A which was phenotypically

26 using bovine serum

of spheroplasts. Proce-
of spheroplasts and the
spheroplasts were as report-

N-ethyl-N'-nitro-N-ni-
ne-DL-sulfoximine were
al. Co., St. Louis, Mo.
by titration, were used.

RESULTS

analyses. The *prol-3*
cell when the medium
ine, arginine, or ornithine
concerted action of
inosyltransaminase (7),
autolyzed to glutamate
intermediate which this
size via the normal
enzyme, by repressing
its catabolism of
y, the growth of
ect of glutamine was
nutritive, a double mu-
tation in arginine or proline
phenotype was used as the
selection because it
minimal medium in
medium which is leaky
mutant *arg-5:prol-3* glutamate
mutants were selected for
arginine in the pres-
ence of these mutants was
wild-type strain; acco-
rdingly, strains carrying the *prol-3*
mutant which 50% were
leaky and 50% were re-
pressed (*prol-3*). Similar results
in ascospores of one
strain *arg-5:prol-3:gln⁺*
mutant were obtained
arg-5:prol-3:gln⁺, and
in prototrophs, when
prol-3 strain, yielded
yields of which were
repressed the *arg-5:prol-3*
prol-3 did not yield
results indicate that,
in titration, a single
mutant is able for allowing
presence of glutamine.
across this new
leaky to growth in
which the growth of
mutation was iden-
tified because it con-
tains arginine sulfoxi-
mine as opposed to the
wild-type phenotypically

sensitive to 1.0 mM methionine sulfoximine. Glutamine and methionine sulfoximine resistance (*ms^r*) segregated as a single gene in all crosses analyzed. In addition, the *gln⁺* mutation confers sensitivity to ammonium (*am^s*). This means that auxotrophic strains carrying the *gln⁺* mutation fail to grow in spotting plates when, in addition to the amino acid that they require, ammonium is present. This effect has been shown in the triple mutant *arg-5:prol-3:gln⁺* and in the double mutants *prol-3:gln⁺* and *am-1:gln⁺*, which require arginine, proline, and glutamate, respectively. Subsequent analysis was carried out in the prototrophic *gln⁺* strain.

As further evidence supporting the idea that one gene mutation was responsible for the *am^s gln⁺ ms^r* phenotype, spontaneous ammonium-resistant mutants (*am^r*) were isolated from the strain *arg-5:prol-3:gln⁺ am^s*. The selection was done in the presence of small amounts of arginine (20 µg/ml) and ammonium excess (25 mM). Seventy percent of the ammonium-resistant strains were also found to be *gln⁺* and *ms^r*, and the frequency of reversion was 10⁻⁶.

Effect of glutamine on the induction of arginase, glutamine synthetase, and glutamate synthase. The lack of glutamine repression on arginine catabolism was tested by measuring the activity of arginase in the wild-type strain 74-A (*gln⁺*) and in a prototrophic *gln⁺* strain. Arginase was induced in 74-A with arginine as sole nitrogen source (Table 1); it was partially repressed by 1 mM glutamine and totally repressed by 5 mM glutamine. Similar concentrations of glutamine presented to the *gln⁺* strain had a lower repressive effect, even though intracellular concentrations of glutamine were higher than those found in the wild-type strain (Table 1). When the *gln⁺* mutant strain was grown in arginine alone or with glutamine as nitrogen source, arginine also accumulated in higher amounts than in the wild-type strain (Table 1).

In contrast to the wild type, in which glutamine represses the synthesis of glutamine synthetase as a result of lowering the concentration of mRNA specific for this enzyme (31), the

glutamine synthetase of the *gln⁺* strain is less sensitive to glutamine. The *gln⁺* strain has a four- to sixfold higher activity of glutamine synthetase and a higher glutamine pool than the *gln⁺* strain (Table 2). No difference was observed in the oligomeric state and monomer composition of glutamine synthetase between the wild type (22) and the *gln⁺* strain.

In the wild-type strain a high activity of GO-GAT is present when *N. crassa* is grown in ammonium-limited cultures, and this enzyme is repressed by glutamine (20). Similar induction and repression were also observed in the *gln⁺* mutant (Table 2).

Amino acid accumulation. The *gln⁺* mutant grows as well as the wild-type strain of *N. crassa* in NH₄NO₃ (25 mM) as nitrogen source; however, the mutant accumulates glutamic acid, glutamine, alanine, and arginine under this condition (Table 3). As in nongrowing cells (13), the amino acid accumulation found in the *gln⁺* mutant was dependent on a good carbon source; when glycerol was substituted for sucrose, no accumulation was observed (Table 3).

In fed-batch ammonium-limited cultures, the *gln⁺* strain, unlike the wild type, showed a 3-h lag phase, during which it accumulated a small amount of arginine (Table 4). Only after growth had initiated did the arginine content decrease. When growth ceased, the arginine content increased again (Fig. 1). In glutamine as nitrogen source, the mutant strain accumulated glutamine and arginine (Table 4). If arginine was used as nitrogen source, both the *gln⁺* and the wild-type strains grew poorly, but only the mutant accumulated this amino acid (Table 4). When adenosine was used as nitrogen source, the *gln⁺* strain accumulated arginine whereas the wild type had no detectable levels (Table 5).

The intracellular distribution of arginine and glutamine was also determined under different growth conditions. It was found that a considerable amount of the arginine accumulated (50 to 60%) by the *gln⁺* strain in ammonium and in glutamine was also sequestered in vesicles, as previously reported for the wild-type strain (27,

TABLE 1. Arginase activity and arginine and glutamine content of *gln⁺* and *gln⁺* strains

| Nitrogen source ^a | Arginase ^b | | µmol/mg of protein | | | |
|------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | | Arginine | | Glutamine | |
| | <i>gln⁺</i> | <i>gln⁺</i> | <i>gln⁺</i> | <i>gln⁺</i> | <i>gln⁺</i> | <i>gln⁺</i> |
| Gln, 5 mM | 0.192 | 0.314 | 0.40 | 0.250 | 0.050 | 0.260 |
| Arg, 1 mM | 1.502 | 1.512 | 0.60 | 0.960 | 0.050 | 0.070 |
| Arg, 1 mM; Gln, 1 mM | 0.552 | 1.238 | 0.460 | 0.910 | 0.060 | 0.160 |
| Arg, 1 mM; Gln, 5 mM | 0.280 | 0.664 | 0.400 | 0.750 | 0.100 | 0.220 |

^a Gln, Glutamine; Arg, arginine.

^b Activity expressed as micromoles of urea produced per minute per milligram of protein at 25°C.

TABLE 2. Enzyme activities and glutamine content of *gln⁺* and *gln⁻* strains

| Nitrogen source | Glutamine synthetase sp act ^a | | Glutamate synthase sp act ^b | | Glutamine (μmol/mg of protein) | |
|---|--|------------------------|--|------------------------|--------------------------------|------------------------|
| | <i>gln⁺</i> | <i>gln⁻</i> | <i>gln⁺</i> | <i>gln⁻</i> | <i>gln⁺</i> | <i>gln⁻</i> |
| | Glutamine, 1 mM | 0.019 | 0.080 | ND ^c | ND | 0.017 |
| Glutamine, 5 mM | 0.017 | 0.090 | 0.0005 | 0.0005 | 0.050 | 0.260 |
| Glutamine, 10 mM | 0.014 | 0.090 | ND | ND | 0.070 | 0.170 |
| Ammonium limited | ND | ND | 0.0140 | 0.0170 | ND | ND |
| NH ₄ NO ₃ , 25 mM | 0.05 | 0.060 | ND | ND | 0.010 | 0.470 |

^a Expressed as micromoles of γ-glutamyl hydroxamate produced per minute per milligram of protein at 30°C.

^b Expressed as micromoles of NADH oxidized per minute per milligram of protein.

^c ND, Not determined.

41) (Table 6). On the other hand, only 12% of the glutamine present in the wild-type strain under both conditions was found in the vesicles. In contrast, 30% of the glutamine accumulated by the *gln⁻* strain was found to be compartmentalized (Table 6).

Glutamine utilization for arginine accumulation. We have previously reported that conidia of auxotrophic mutants of *N. crassa* accumulated arginine and other amino acids, when deprived of the amino acid they require, in the presence of ammonium or glutamine as nitrogen source (13). The presence of mutations that impaired the synthesis of glutamate (*am1*) and *en-am-1*) and glutamine (*gln-1* and *gln-1b*) in conidia deprived of amino acids prevented the utilization of the nitrogen atoms of exogenous glutamine for the synthesis and accumulation of

TABLE 3. Amino acid content of *gln⁺* and *gln⁻* strains in NH₄⁺^a

| Amino acid | μmol/mg of protein | |
|---------------|------------------------|------------------------|
| | <i>gln⁺</i> | <i>gln⁻</i> |
| Glutamic acid | 0.017 | 0.350 (0.047) |
| Glutamine | 0.010 | 0.470 (0.037) |
| Alanine | 0.023 | 0.900 (0.032) |
| Lysine | ND ^b | 0.090 (ND) |
| Histidine | ND | 0.020 (0.020) |
| Arginine | 0.050 | 0.290 (0.020) |

^a Strains were grown in minimal medium with 25 mM NH₄NO₃ as nitrogen source and 1.5% sucrose as carbon source except in the last column (in parentheses) in which 1.5% glycerol was used.

^b ND, Not detected.

TABLE 4. Amino acid content of the *gln⁻* strain in different nitrogen sources

| Amino acid | μmol/mg of protein in given nitrogen source | | | |
|---------------|---|---|------------------|-----------------|
| | NH ₄ (25 mM) | NH ₄ ⁺ limited ^a | Glutamine (5 mM) | Arginine (1 mM) |
| Glutamic acid | 0.350 | 0.041 | 0.090 | 0.090 |
| Glutamine | 0.470 | 0.008 | 0.260 | 0.060 |
| Alanine | 0.900 | 0.009 | 0.019 | 0.040 |
| Lysine | 0.090 | ND ^b | 0.020 | ND |
| Histidine | 0.020 | ND | 0.020 | 0.030 |
| Arginine | 0.290 | 0.120 | 0.260 | 1.600 |

^a Fed with 0.03 μmol of NH₄Cl/mg per h.

^b ND, Not detected.

arginine (13). Likewise, the arginine accumulation of the *gln⁻* strain, growing exponentially in the presence of glutamine, was partially prevented by the *am-1* and *gln-1b* mutations (Fig. 2).

DISCUSSION

It has been shown that one of the products of arginine catabolism, glutamine, represses both arginase (34) and glutamine synthetase (37). The catabolism of arginine leads also to proline therefore, a double auxotroph of proline and arginine can be grown solely by supplying arginine. The presence of glutamine will prevent such growth because it represses arginase. We have isolated mutants which are resistant to glutamine under these conditions (*gln^r*).

The *gln⁻* mutation is a monogenic regulatory mutation which impairs the regulation by glutamine of arginase, glutamine synthetase, and amino acid accumulation; it leads to less repression by glutamine of the enzymes mentioned, in spite of higher intracellular glutamine and arginine content than found in the wild-type strain (Table 1). Although compared with the wild-type strain a higher proportion of the glutamine was found in vesicles, the major part of the glutamine was still soluble in the *gln⁻* strain and metabolically available for repression (Table 6). Glutamine synthetase is repressed similarly by glutamine in the *gln⁻* strain and in the wild-type strain (Table 2). Arginine follows a different distribution pattern, since the major part is sequestered in vesicles (Table 6). Weiss and Davis have extensively studied the intracellular distribution of arginine in *N. crassa*, and they have found that a large fraction of this amino acid is sequestered within a vesicle (43).

The *gln⁻* mutation was responsible for the accumulation of glutamic acid, glutamine, alanine, and arginine during exponential growth on ammonium as nitrogen source (Table 3). As compared with the wild-type strain, the *gln⁻* mutant accumulates more arginine when grown

content of the *gln⁺* strain in
different sources

| NH ₄ ⁺ concn. | μg protein in given nitrogen source | |
|--|--|--------------------|
| | Glutamine (5 mM) | Arginine (1 mM) |
| 1.0% | 0.090 | 0.090 |
| 1.008 | 0.260 | 0.060 |
| 1.009 | 0.019 | 0.040 |
| ND | 0.020 | ND |
| ND | 0.020 | 0.030 |
| 1.120 | 0.260 | 1.600 |

NH₄⁺ 1 ml per h.

the arginine accumula-
tion is exponential in
the wild-type strain,
it was partially prevent-
ed in the *gln⁺* strain
(Fig. 2).

DISCUSSION

One of the products of
the *gln⁺* mutation, argi-
nase, represses both
the *gln⁺* mutation and
the *gln⁺* mutation. The
gln⁺ mutation also to proline
biosynthesis of proline and
arginine. The addition
of arginine will prevent
the repression of arginase.
We have shown that
strains which are resistant to
the *gln⁺* mutation.

The *gln⁺* mutation is
regulatory by glutamine
synthetase, and
it leads to less repres-
sion of the *gln⁺* mutation, in
the presence of glutamine and argi-
nase. In the wild-type strain
the arginine pool is
regulated with the wild-type
strain. The glutamine was
the main nitrogen source of the
gln⁺ strain and metaboli-
sm of arginine (Table 6). Gluta-
mine is repressed similarly by glutamine
synthetase in the wild-type strain
and the *gln⁺* strain. It is a different distribu-
tion of arginine in the wild-type strain
and the *gln⁺* strain. The arginine
pool is sequestered in the
gln⁺ strain and Davis have
shown that the arginine pool
distribution and they have found
that the arginine pool is seque-
stred in the *gln⁺* strain.

The *gln⁺* mutation is
responsible for the
accumulation of arginine,
glutamine, alanine,
lysine, and histidine on
arginine (Table 3). As
mentioned above, the *gln⁺*
strain, the *gln⁺* strain
accumulates arginine when grown

GROWTH

ARGININE

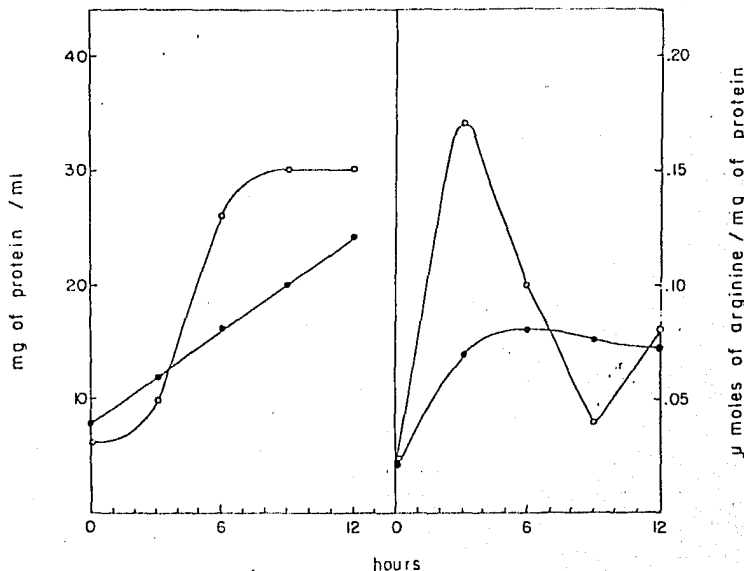


FIG. 1. Growth and arginine pool of strain 74-A (*gln⁺*) (●) and the *gln⁺* strain (○) grown in fed-batch cultures.

in arginine as nitrogen source (Table 1) and more
glutamine and arginine when grown in glutamine
as nitrogen source (Table 1). Also the arginine
accumulation observed in the *gln⁺* strain grown
in arginine is not decreased if glutamine is added
to the medium (Table 1). In the presence of other
nitrogen sources such as nucleosides or limiting
ammonia, only arginine was accumulated (Tables
4 and 5).

TABLE 5. Amino acid content of *gln⁺* and *gln⁺*
strains grown in adenosine (1 mM) as nitrogen
source

| Amino acid | μmole/mg of protein | |
|---------------|------------------------|------------------------|
| | <i>gln⁺</i> | <i>gln⁺</i> |
| Glutamic acid | 0.093 | 0.073 |
| Glutamine | 0.100 | 0.050 |
| Alanine | 0.037 | 0.021 |
| Lysine | 0.100 | 0.050 |
| Histidine | 0.050 | 0.080 |
| Arginine | ND* | 0.220 |

* ND, Not detected.

As mentioned above, auxotrophic strains carry-
ing the *gln⁺* mutation are ammonium sensitive;
at present, this is not understood.

What is the relation between the regulation by

TABLE 6. Intracellular distribution of arginine
(Arg) and glutamine (Gln) in the *gln⁺* and *gln⁺* strains

| Distribution in given fraction | μmol/200 mg of protein | | | |
|---|------------------------|------|------------------------|-------|
| | <i>gln⁺</i> | | <i>gln⁺</i> | |
| | Arg | Gln | Arg | Gln |
| Growth condition: NH ₄ ⁺ (25 mM) | | | | |
| Whole cells | 11.0 | 25.0 | 52.0 | 160.0 |
| Spheroplasts | 7.5 | 9.0 | 36.0 | 104.0 |
| 15,000 × g pellet | 3.0 | 1.0 | 16.0 | 31.0 |
| 15,000 × g supernatant | 4.0 | 7.5 | 14.0 | 68.0 |
| Growth condition: Gln (5 mM) | | | | |
| Whole cells | 13.0 | 38.0 | 53.0 | 150.0 |
| Spheroplasts | 7.0 | 16.0 | 43.0 | 117.0 |
| 15,000 × g pellet | 4.3 | 1.3 | 18.0 | 31.0 |
| 15,000 × g supernatant | 2.3 | 13.0 | 15.0 | 68.0 |

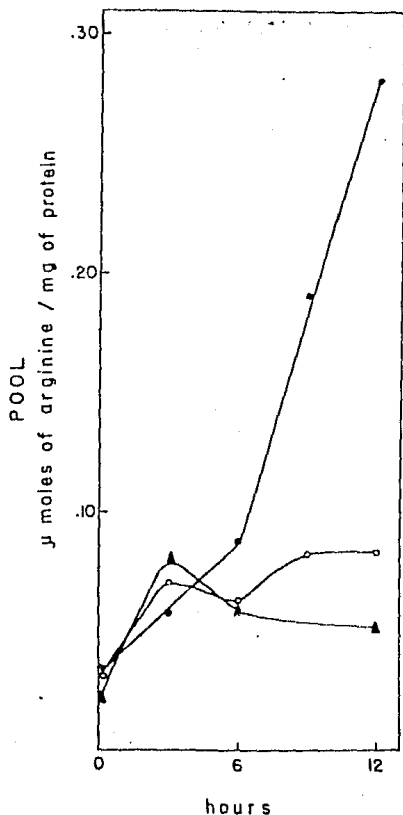


FIG. 2. Arginine pool of strains *gln*⁺ (●), *gln*⁺ *am*-1 (○), and *gln*⁺ *gln*-1*b* (▲) grown in glutamine as nitrogen source.

glutamine of nitrogen catabolism and glutamine synthesis and, on the other hand, the accumulation of amino acids, mainly arginine? The lower repression of glutamine synthetase by glutamine in the *gln*⁺ strain may account for the higher flow of nitrogen that leads to the accumulation of glutamine and arginine as well as alanine and glutamic acid, under ammonium excess. Evidence has been presented indicating that the arginine content of the vesicle is regulated by nitrogen (23) and the energy charge (9). Glutamine could be one of the regulatory signals which mediate this control. The *gln*⁺ mutation has disrupted the "nitrogen control" of vesicle content, as judged by the accumulation of arginine and glutamine in nitrogen excess and of

arginine in nitrogen-limited conditions. Furthermore, the inability of glutamine to stop arginine accumulation in *gln*⁺ ammonium limited cultures may lead to inhibition of growth (Fig. 1).

In relation to the other nitrogen regulatory mutants of *N. crassa* reported we have found that *gln*⁺ is not allelic to *nit*-2 and that the latter mutation, as also happens with other nitrogen-regulated enzymes (15), impairs the induction of glutamine synthetase (Gonzalez and Mora, in preparation).

In the *gln*⁺ mutant, as in nongrowing cells (14), some glutamine resynthesis is necessary for arginine biosynthesis. This is suggested by a decrease in the accumulation of arginine, when glutamine is the nitrogen source, if mutations are present that impair the assimilation of ammonium into glutamate or glutamine (Fig. 2). The *gln*⁺ phenotype greatly resembles what happens in nongrowing cells of *N. crassa* (27), which also accumulate amino acids in the presence of a good carbon source (Table 3) and support the role of the glutamine cycle that has been proposed, in which glutamine is degraded and resynthesized (14). The advantages of such a cycle would be that the carbon and nitrogen could be used to synthesize amino acids in general, as well as for the synthesis and accumulation of arginine or glutamine or both in particular.

Accumulation of amino acids has been found to occur in the mycelium of *N. crassa* (1, 2) and in *S. cerevisiae* (33), where a metabolic block in a particular biosynthetic pathway such as arginine, histidine, or tryptophan leads to a derepression of the enzyme levels in these pathways. In *S. cerevisiae* a similar derepression is observed in leaky mutants of these amino acid pathways (8).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Miguel Lara and Dale Noel for critically reading the manuscript and to Lourival Possani for help in some of the amino acid determinations.

This work was supported in part by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and Fondo de Estudios e Investigaciones Ricardo J. Zebada.

LITERATURE CITED

1. Carlsdot, M., and R. F. Jones. 1974. Cross-pathway regulation: tryptophan-mediated control of histidine and arginine biosynthetic enzymes in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 119:889-892.
2. Carlsdot, M., R. F. Jones, and A. C. Wesseling. 1974. Cross-pathway regulation: histidine-mediated control of histidine, tryptophan, and arginine biosynthetic enzymes in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 119:893-898.
3. Castañeda, M., J. Martuscelli, and J. Mora. 1967. The catabolism of L-arginine by *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta* 141:276-282.
4. Dávila, G., M. Lara, J. Guzmán, and J. Mora. 1980. Relation between structure and function of *Neurospora crassa* glutamine synthetase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92:134-140.
5. Dávila, G., F. Sánchez, R. Palacios, and J. Mora. 1978.

ited conditions. Further, it is necessary to stop arginine metabolism in limited cultures of growth (Fig. 1).

her nitrogen regulatory point we have found that the induction of the latter mutants with other nitrogen-regulating agents, such as the induction of Gonzalez and Mora, in

in nongrowing cells (14), this is necessary for the synthesis of arginine, when the source, if mutations are present, is the regulation of ammonification (Fig. 2). The *gln1* mutation, which also occurs in the presence of a block in the support of the cycle that has been proposed is degraded and re-arranged of such a cycle to a nitrogen could be used in general, as well as accumulation of both in particular.

has been found in *N. crassa* (1, 2) and in a metabolic block in the pathway such as arginine leads to a decrease in these pathways. In these pathways, the depression is observed of these amino acid

REFERENCES

at Dale Noel for critically reading this manuscript. Financial support was provided by grants from Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CONACYT) and Fondo de Investigación Científica y Tecnológica (CONICET).

RECEIVED

1982. Cross-pathway regulation of histidine and arginine biosynthesis in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 147:1111-1117.

and A. C. Wessling. 1974. Histidine-mediated control of arginine biosynthesis in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 119:893-898.

and J. Mora. 1967. The regulation of arginine biosynthesis in *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta* 14:1-10.

and J. Mora. 1980. Regulation of arginine biosynthesis in *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96:1688-1694.

and J. Mora. 1978. Regulation of arginine biosynthesis in *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83:159-171.

Genetics and physiology of *Neurospora crassa* glutamine auxotrophs. *J. Bacteriol.* 134:693-698.

6. Davis, R. H., M. B. Lawless, and L. A. Port. 1970. Arginineless *Neurospora*: genetics, physiology, and polyamine synthesis. *J. Bacteriol.* 102:299-305.

7. Davis, R. H., and J. Mora. 1968. Mutants of *Neurospora crassa* deficient in ornithine-L-transaminase. *J. Bacteriol.* 96:383-388.

8. Dillorge, J., F. Messigny, and J. M. Wiame. 1975. The regulation of arginine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. The specificity of arg R⁺ mutations and the general control of amino acid biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 59:231-239.

9. Drainas, C., and R. L. Weiss. 1982. Energy requirement for the mobilization of vacuolar arginine in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 150:779-784.

10. Dubois, E., S. Vissers, M. Grewson, and J. M. Wiame. 1977. Glutamine and ammonia in nitrogen catabolite repression of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75:233-239.

11. Dunn-Coleman, N. S., and R. H. Garrett. 1980. The role of glutamine synthetase and glutamine metabolism in nitrogen metabolite repression, a regulatory phenomenon in the lower eukaryote *Neurospora crassa*. *Mol. Gen. Genet.* 179:25-32.

12. Dunn-Coleman, N. S., A. B. Tomsett, and R. H. Garrett. 1979. Nitrogen metabolite repression of nitrate reductase in *Neurospora crassa*: effect of the *gln1* locus. *J. Bacteriol.* 139:697-700.

13. Espin, G., and J. Mora. 1978. Effect of the deprivation of amino acids on conidia of *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 104:233-240.

14. Espin, G., R. Palacios, and J. Mora. 1979. Glutamine metabolism in nitrogen-starved conidia of *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 115:59-68.

15. Facklam, T. J., and G. A. Marzluf. 1978. Nitrogen regulation of amino acid catabolism in *Neurospora crassa*. *Biochem. Genet.* 16:343-354.

16. Ferguson, A. R., and A. P. Sims. 1974. The regulation of glutamine metabolism in *Candida utilis*: the role of glutamine in the control of glutamine synthetase. *J. Gen. Microbiol.* 80:159-171.

17. Fincham, J. R. S. 1950. Mutant strains of *Neurospora crassa* deficient in aminating ability. *J. Biol. Chem.* 182:61-71.

18. Grove, G., and G. A. Marzluf. 1981. Identification of the product of the major regulatory gene of the nitrogen control circuit of *Neurospora crassa* as a nuclear DNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* 256:463-470.

19. Hummel, G., and J. Mora. 1980. NADH-dependent glutamine synthetase and nitrogen metabolism in *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92:127-133.

20. Hummel, G., and J. Mora. 1980. Regulation and function of glutamate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96:1688-1694.

21. Hynes, M. J. 1974. Effects of ammonium, L-glutamate, and L-glutamine on nitrogen catabolism in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 120:1116-1123.

22. Lara, M., L. Blanco, M. Campomanes, E. Calva, R. Palacios, and J. Mora. 1982. Physiology of ammonium assimilation in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 150:105-112.

23. Legerton, T. L., and R. L. Weiss. 1979. Mobilization of sequestered metabolites into degradative reactions by nutritional stress in *Neurospora*. *J. Bacteriol.* 138:909-914.

24. Legrain, C., S. Vissers, E. Dubois, M. Legrain, and J. M. Wiame. 1982. Regulation of glutamine synthetase from *Saccharomyces cerevisiae* by repression, inactivation and proteolysis. *Eur. J. Biochem.* 123:611-616.

25. Linde-Larsen, J., M. Lara, B. Resconi, and J. Mora. 1977. Regulation of glutamine synthetase in fed-batch cultures of *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78:1234-1240.

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

27. Mora, Y., G. Espin, K. Williams, and J. Mora. 1978. Nitrogen accumulation in mycelium of *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 104:241-250.

28. Palacios, R. 1976. *Neurospora crassa* glutamine synthetase. Purification by affinity chromatography and characterization of subunit structure. *J. Biol. Chem.* 251:4787-4791.

29. Premakumar, R., G. J. Surger, and D. Gooden. 1979. Nitrogen metabolite repression of nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 137:1119-1126.

30. Premakumar, R., G. J. Surger, and D. Gooden. 1980. Physiological characterization of a *Neurospora crassa* mutant with impaired regulation of nitrate reductase. *J. Bacteriol.* 144:542-551.

31. Sánchez, F., M. Campomanes, C. Quinto, W. Hansberg, J. Mora, and R. Palacios. 1978. Nitrogen source regulates glutamine synthetase mRNA levels in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 136:880-885.

32. Sánchez, S., L. Martiñez, and J. Mora. 1972. Interactions between amino acid transport systems in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 112:276-284.

33. Schorch, A., J. Mozzari, and R. Hutter. 1974. Regulation of tryptophan biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mode of action of 5-methyltryptophan-sensitive mutants. *J. Bacteriol.* 127:1131-1140.

34. Vaen, G., and J. Mora. 1977. Nitrogen regulation of arginase in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 131:719-725.

35. Van de Palle, K. W. 1973. Ammonium repression in a mutant of *Saccharomyces carlsbergensis* lacking NADP-dependent glutamate dehydrogenase activity. *FEBS Lett.* 32:265-266.

36. van Pilsom, J. F., R. P. Martin, E. Kito, and J. Hess. 1956. Determination of creatine, creatinine, arginine, guanidinoacetic acid, guanidine and methyl-guanidine in biological fluids. *J. Biol. Chem.* 222:225-236.

37. Vichido, I., Y. Mora, C. Quinto, R. Palacios, and J. Mora. 1978. Nitrogen regulation of glutamine synthetase in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 106:251-259.

38. Vogel, H. J. 1964. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *Am. Nat.* 98:435-446.

39. Vogel, H. J., and D. M. Bonner. 1954. On the glutamate proline-ornithine inter-relation in *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 40:688-694.

40. Wang, L. C., and G. A. Marzluf. 1979. Nitrogen regulation of uricase synthesis in *Neurospora crassa*. *Mol. Gen. Genet.* 176:385-392.

41. Weiss, R. L. 1973. Intracellular localization of ornithine and arginine pools in *Neurospora*. *J. Biol. Chem.* 248:5409-5413.

42. Weiss, R. L., and R. H. Davis. 1973. Intracellular localization of enzymes of arginine metabolism in *Neurospora*. *J. Biol. Chem.* 248:5403-5408.

43. Weiss, R. L., and R. H. Davis. 1977. Control of arginine utilization in *Neurospora*. *J. Bacteriol.* 129:866-873.