

03062
20/1/22



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

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

Centro de Investigación sobre fijación de Nitrógeno

**CARACTERIZACION DE UNA MUTANTE ALTERADA EN LA
ACTIVIDAD DE GLUTAMATO SINTASA DE
Saccharomyces cerevisiae**

T E S I S

Que para obtener el grado de
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
presenta

Lic. en IBB Jorge Luis Felch Mallol

CUERNAVACA, MOR.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1989



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.

C O N T E N I D O

INTRODUCCION

Asimilación de Amonio: Biosíntesis de ácido glutámico y glutamina
Regulación de las Vías de Asimilación de Amonio

OBJETIVOS

MATERIAL Y METODOS

RESULTADOS

I. Análisis Genético de la mutación que confiere el fenotipo GOGAT⁻.

II. Caracterización Bioquímica de las Actividades de GOGAT de las Cepas CN36, CN37, CN38 y CN39.

III. Fenotipo de las cepas S288C, CN36, CN37, CN38 y CN39 en Fuentes Fermentables y no Fermentables de Carbono.

DISCUSION

REFERENCIAS

INTRODUCCION

El nitrógeno es un elemento muy importante para la vida ya que forma parte de muchas moléculas sencillas y de la gran mayoría de las macromoléculas que constituyen a los seres vivos; especialmente de las proteínas y de los ácidos nucleicos. Los microorganismos pueden utilizar una gran variedad de moléculas nitrogenadas como fuentes de nitrógeno celular, siendo las mejores el amonio, el ácido glutámico y la glutamina ya que son aprovechadas directamente por ser donadores universales de nitrógeno. Otros compuestos nitrogenados como nitratos y nitritos, purinas, proteínas y muchos aminoácidos pueden ser usados como fuentes secundarias de nitrógeno. El uso de estos compuestos implica la activación ó síntesis de enzimas que los degradan hasta amonio, el cual es reasimilado mediante la síntesis de ácido glutámico y glutamina, intermediarios metabólicos que distribuyen el nitrógeno para la síntesis de aminoácidos, aminoazúcares, vitaminas, purinas y pirimidinas, compuestos que a su vez, participan en la síntesis de macromoléculas.

ASIMILACION DE AMONIO :

Biosíntesis de ácido glutámico y glutamina

La asimilación de amonio es un proceso mediante el cual se incorpora una molécula de amonio a un esqueleto de carbono. En procariotes y eucariotes sencillos como Escherichia coli, Neurospora, Aspergillus, Candida, y Saccharomyces, el amonio es asimilado principalmente por una enzima llamada glutamato deshidrogenasa biosintética o GDH-NADP. La reacción catalizada por esta enzima es una aminación reductiva del ácido α -cetoglutarico :



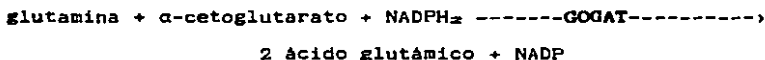
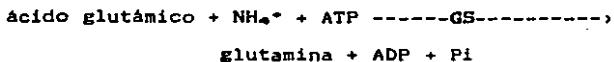
El ácido glutámico producto de la reacción anterior es tomado por la glutamino sintetasa (GS), la cual incorpora otra molécula de amonio para formar glutamina :



Notemos entonces que existen dos enzimas capaces de incorporar amonio a moléculas orgánicas : la GDH-NADP y la GS.

Durante mucho tiempo se pensó que esta era la única vía de asimilación de amonio, pero en 1970 Tempest y col.(1970) demostraron la existencia de una ruta alterna para la síntesis de ácido glutámico. Estudios realizados con Klebsiella aerogenes mostraron que cuando se cultiva a este microorganismo en condiciones de limitación de amonio, la actividad de GDH-NADP dis-

minuye, mientras que la de la GS aumenta considerablemente. Por otro lado, la incubación de extractos libres de células en presencia de α -cetoglutarato, glutamina y NADPH dió como resultado la síntesis de ácido glutámico. Tempest y col. concluyeron entonces que la asimilación de amonio en condiciones de limitación, procede a través de la reacción catalizada por una enzima que denominaron glutamino 2-oxoglutarato amidotransferasa (GOGAT ó glutamato sintasa). Así, la acción coordinada de la GS con la GOGAT resulta en una vía alternativa para la asimilación de amonio :



A partir del descubrimiento de esta nueva ruta para la síntesis de ácido glutámico, otros grupos se avocaron a la búsqueda de esta enzima en otros sistemas (Meers y Tempest, 1970). Sin embargo, en otros microorganismos la regulación de las vías de asimilación de amonio no es tan clara como en el caso de Klebsiella. En algunas bacterias que carecen de la actividad de GDH-NADP como Bacillus, la actividad de GOGAT es constitutiva. En otros sistemas como los vegetales superiores, la GOGAT toma gran importancia, ya que el papel de la GDH-NADP en estos organismos es poco claro y al parecer la principal ruta de asimilación de amonio es la vía GS-GOGAT.

Uno de los retos más interesantes de este sistema es el estudio del papel fisiológico y la regulación coordinada de las dos vías de asimilación de amonio. En un principio se pensó que en todos los microorganismos, al igual que en Klebsiella aerogenes, la vía GS-GOGAT funcionaría en condiciones de limitación de amonio, pero el trabajo de algunos grupos de investigación demostró que la GOGAT puede tener otro papel en estas condiciones (Calderón y Mora, 1985).

REGULACION DE LAS VIAS DE ASIMILACION DE AMONIO

A continuación presentaré algunos aspectos de la regulación de las vías de asimilación de amonio en ciertos organismos donde se han estudiado.

a) Neurospora crassa. Este es uno de los microorganismos donde mejor se han estudiado las vías de asimilación de amonio. Este hongo posee una glutamino sintetasa compuesta por dos monómeros con diferente movilidad electroforética denominados α y

β (Sánchez y col., 1980). Estos monómeros se organizan en formas tetramérica (monómeros α) y octamérica (monómeros β) para así constituir dos enzimas diferentes (Dávila y col., 1980). Estas formas de GS están reguladas por la fuente de nitrógeno.

En N. crassa también se ha descrito una actividad de GDH-NADP; esta enzima es un hexámero compuesto por monómeros idénticos de 452 aminoácidos cada uno (Wootton y col., 1974). Al cultivar este hongo en amonio o en nitrato como fuentes de nitrógeno la actividad de GDH-NADP alcanza sus máximos niveles; por el contrario, su actividad disminuye al utilizar ácido glutámico o glutamina como únicas fuentes nitrogenadas. La regulación en este caso se lleva a cabo a nivel de síntesis de la enzima (Hernández y col., 1983).

La glutamato sintasa de N. crassa se ha purificado a homogeneidad; esta enzima consta de un solo monómero de 200,000 daltones de peso molecular y utiliza NADH en lugar de NADPH en contraste con la enzima bacteriana (Hummelt y Mora, 1980a). El gene estructural (en (am)-2) ha sido identificado por el grupo de Romero y Dávila (1986). Lomnitz y col. (1987) han estudiado la regulación de las vías de asimilación de amonio en este hongo; estos autores han encontrado que las actividades de GDH-NADP y de GOGAT son muy similares tanto en limitación como en exceso de amonio, por lo que han propuesto que la GDH-NADP es la responsable de la asimilación, mientras que la GOGAT podría participar importantemente en el reciclaje de las pozas de ácido glutámico y glutamina. Esta función de la GOGAT adquiere mucha importancia en condiciones de limitación de amonio, donde la GS puede tomar este compuesto muy eficientemente y por lo tanto privar a la célula de ácido glutámico; en esta condición la GOGAT se encarga de rellenar la poza de ácido glutámico a partir de glutamina. Esta propuesta de Lomnitz y col. es la primera que le adjudica a la GOGAT un papel diferente al de la síntesis de ácido glutámico durante la limitación de amonio.

b) Aspergillus nidulans. Este microorganismo es muy parecido a N. crassa en cuanto a la regulación de las vías de asimilación de amonio. Los niveles de GDH-NADP y GS también son regulados por la fuente de nitrógeno (Pateman, 1969) mientras que la actividad de GOGAT no varía al cultivar al hongo en diferentes fuentes de nitrógeno (Kusan y col., 1987). Estos autores han propuesto que el papel de la GOGAT en A. nidulans es el de sintetizar ácido glutámico en condiciones de limitación de amonio, pero la contribución de cada una de las vías a la poza de ácido glutámico no ha sido estudiada con suficiente detalle.

c) Escherichia coli. Esta bacteria posee una GDH-NADP dependiente constituida por seis cadenas polipeptídicas idénticas con un peso molecular de 50,000 daltones (Sakamoto y col., 1975). La regulación de esta enzima ha sido poco estudiada y su papel en la asimilación de amonio permanece oscuro. Por otro lado, la glutamino sintetasa de E. coli tiene dos formas catalíticamente diferentes que son interconvertibles. Esta enzima está compuesta por doce subunidades, cada una de las cuales está sujeta a adenilación, lo cual disminuye su actividad y la hace más sen-

sible a la regulación alostérica por los productos finales de la reacción (Shapiro y col., 1968; Hening y Ginsburg, 1971). La regulación a nivel de transcripción de la GS en esta bacteria ha sido estudiada con mucho detalle y se sabe que el gen estructural glnA se encuentra en un operón que contiene además dos genes regulatorios: ntrB y ntrC. Además existen otros genes regulatorios llamados ntrA, glnE, glnD, y glnF que intervienen en la regulación de la GS. El producto de ntrA es un factor sigma que reconoce ciertos promotores de genes relacionados con la disponibilidad de amonio y la fijación de nitrógeno (sistema Ntr) (Hirschman J. y col., 1985). Para que el producto de ntrA requiera del producto del gene ntrC que es una proteína susceptible a fosforilación (NR₂) (Pahel G. y col., 1982). A su vez, el gen ntrB (NR₂₂) codifica para una proteína que fosforila a NR₂ para activarlo y lo desfosforila para inactivarlo (Ninfa A y col., 1986). La actividad de NR₂₂ depende de los productos codificados por los genes glnE (proteína PII) y glnD (uridil transferasa). La proteína PII en su estado no uridilado interacciona con NR₂₂ induciendo la desfosforilación de NR₂ y por lo tanto no permite la activación del promotor del gen glnA. El estado funcional de PII depende de la actividad de uridil transferasa, la cual es capaz de sensar los niveles de 2-oxoglutarato, ATP y glutamina. Por otro lado la proteína PII en su estado uridilado estimula al producto de glnE (adenil transferasa) para desadenilar la GS; por el contrario, cuando la proteína PII se encuentra en su estado no uridilado, provoca que la adenil transferasa adenile a la GS y la inactive (Foor F., y col., 1980). Así, la actividad de GS está regulada por un sistema de cascada muy sensible a la disponibilidad de amonio.

Esta bacteria también posee una actividad de GOGAT; la enzima está compuesta por cuatro dímeros, cada uno de los cuales consta de dos subunidades diferentes de 135,000 y 53,000 daltones de peso molecular (Miller y Stadtman, 1972). Los genes estructurales de la subunidad grande y pequeña han sido clonados (Lozoya y col., 1980) y denominados gltB y gltD respectivamente (Garcíarrubio y col., 1983). El grupo de Pahel y col. (1978) ha descrito que mutaciones en el gene gltB afectan la síntesis de GOGAT, y además confieren el fenotipo Ntr⁻ (incapacidad para crecer en limitación de amonio, fuentes orgánicas de nitrógeno como prolina e histidina cuyo catabolismo resulte en la producción de glutámico; también son incapaces de crecer en compuestos nitrogenados cuyo catabolismo conduzca a la obtención de amonio como urea y nitratos) Por otro lado, estas células no pueden desreprimir la GS al ser cultivadas en limitación de nitrógeno (Brenchley y col., 1973). Otros estudios con cepas mutantes en gltB demostraron que están alteradas en el transporte de metilamonio, lo que ha llevado a estos autores a proponer que el transportador de alta afinidad por amonio pudiera estar regulado por el sistema Ntr (Servín-González y Bastarrachea, 1984); esto explicaría el hecho de que mutantes en gltB sean incapaces de crecer en limitación de amonio. Recientemente, Castaño y col. (1988) han establecido la existencia del operón gltBDF el cual consta de los genes que codifican para la subunidad grande y chica de GOGAT y además un tercer gene cuyo

producto parece estar involucrado en la regulación del sistema Ntr. Estos resultados sugieren que el fenotipo pleiotrópico observado en las mutantes glt B es debido a un efecto polar sobre glt E.

Quando se cultiva a E. coli en condiciones de limitación de amonio, la GS aumenta su actividad, mientras que en condiciones de exceso, esta enzima se adenila y se reprime. La actividad de GOGAT es muy similar en cualquiera de las dos condiciones (Miller y Stadtman, 1972). En 1975, Senior realizó estudios sobre las vías de asimilación de amonio que utiliza E. coli cuando se cultiva en exceso y limitación de amonio. Sus resultados indican que esta bacteria utiliza la GDH-NADP para crecer en ambas condiciones por lo que el papel de la GOGAT aún no ha sido determinado en este microorganismo.

d) Bacillus subtilis. Esta bacteria carece de la actividad de GDH-NADP por lo que sólo presenta la vía GS-GOGAT (Freese y col., 1964). En este sistema la actividad de GS no está sujeta a regulación por adenilación; en contraste, la actividad de GS se regula por la fuente de nitrógeno y la enzima es susceptible a la inhibición por productos finales del catabolismo de glutamina y por el aminoácido mismo (Deuel y col., 1970; Deuel y Prusiner, 1974). El grupo de Dean y Aronson (1980) aisló mutantes auxótrofos de ácido glutámico que resultaron estar alteradas en la actividad de GOGAT, demostrando así la operación exclusiva de la vía GS-GOGAT. Otros estudios mostraron que cuando se cultiva a B. subtilis en nitrato o amonio como fuente de nitrógeno, la actividad de GOGAT se desreprime mientras que en ácido glutámico como fuente de nitrógeno esta enzima se reprime (Pan y Coote, 1979). La GOGAT de este microorganismo esta compuesta por dos subunidades, codificadas por los genes glt A y glt B (Deshpande y Kane, 1980); estos genes han sido clonados (Bohannon y col., 1985) y se ha encontrado que las variaciones de la actividad de GOGAT en respuesta a la fuente de nitrógeno se regulan a nivel de transcripción.

e) Bacterias Fijadoras de Nitrógeno. Klebsiella aerogenes es una bacteria diazotrófica capaz de fijar nitrógeno en vida libre. Este es uno de los organismos en donde mejor se han estudiado las vías de asimilación de amonio y es el único caso en el que el papel de la vía GS-GOGAT es claro. La GS de este microorganismo es muy parecida a la de E. coli y su regulación es prácticamente la misma (Bender y col., 1977). Klebsiella posee una GDH que se encuentra regulada por el sistema Ntr en sentido opuesto a la GS y por lo tanto funciona en condiciones de exceso de amonio (Brenchley J. E. y col., 1973). La GOGAT de esta bacteria también es muy parecida a la de E. coli pero su regulación claramente responde a la limitación de nitrógeno (Brenchley y col., 1973).

Azotobacter también es capaz de llevar a cabo la fijación de nitrógeno en vida libre. Esta bacteria carece de la actividad de GDH (Kleiner, 1975) por lo que la única vía de asimilación que presenta es la vía GS-GOGAT. La actividad de GOGAT no es regulable por la fuente de nitrógeno. Este microorganismo tiene dos actividades de GOGAT, una citoplásmica y otra asociada a membrana que varían de acuerdo a la aereación del cultivo (Rockel y col.

1983). Por otro lado la GS de Azotobacter es muy parecida a las de enterobacterias y también está sujeta a regulación por adenilación (Kleinschmidt T. A. y col., 1978).

Azospirillum brasiliense es una bacteria fijadora de nitrógeno que se encuentra asociada a la rizósfera de ciertos pastos, aunque su participación en el establecimiento de una verdadera simbiosis es poco clara (Baldani y Dobereiner, 1980; Patriquin y col., 1983). Este microorganismo presenta las actividades de GS, GOGAT y GDH-NADP; al igual que para otras bacterias, se ha sugerido que la vía GS-GOGAT opera en condiciones de bajo amonio, mientras que la vía GDH-GS funciona en exceso de amonio. Sin embargo, Westby y col. (1987), haciendo experimentos con N_2 , han demostrado recientemente que la vía que contribuye mayormente a la asimilación de amonio es la GS-GOGAT tanto en limitación como en exceso de amonio. Aparentemente el papel de la GDH-NADP en esta bacteria es secundario.

Rhizobium phaseoli forma una asociación simbiótica con el frijol en la cual el nitrógeno fijado por la bacteria es asimilado por la planta; por otro lado la planta provee de fotosintato al bacterioide. R. phaseoli posee dos glutamino sintetetas (GS I y GS II). Bravo y col. (1988), han propuesto un modelo para la regulación de estas enzimas. Cuando el cociente α -cetoglutarato / glutamina disminuye, la GS I se adenila y su actividad decrece; por el contrario, al inactivarse la GS I, la actividad de GS II aumenta. Al adicionar al medio altas concentraciones de amonio la GS II se inactiva, al parecer por otro mecanismo diferente al de adenilación.

En este microorganismo no se ha detectado la presencia de la GDH-NADP (Bravo y col., 1988). La actividad de GOGAT se encuentra regulada por la fuente de nitrógeno y carbono en la que se cultiva esta bacteria. Por otro lado se sabe que la GOGAT de Rhizobium es susceptible a la inhibición competitiva por cetoácidos; sin embargo la importancia fisiológica de esta inhibición no ha sido bien determinada. Notemos entonces que la única vía de asimilación de amonio que tiene Rhizobium phaseoli es la vía GS-GOGAT.

Prácticamente todos los microorganismos fijadores de nitrógeno estudiados hasta la fecha, utilizan la vía GS-GOGAT durante el proceso de fijación de nitrógeno (Brown, 1976; Kleiner y col., 1981; Nagatani y col., 1971; Bravo y Mora, 1988). Por otro lado, existe evidencia de que una GDH activa es incompatible con la fijación de nitrógeno durante la simbiosis (Bravo, Becerril y Mora, 1988; Osburne y Signer, 1980).

Recientemente, el grupo de Kanamori y col. (1987a) han reportado que Bacillus polymyxa utiliza la vía GDH-GS aún cuando este fijando nitrógeno; sin embargo, también se encuentra actividad de GOGAT en estas condiciones aunque su papel no es muy claro. En esta bacteria, los niveles de GOGAT no varían con la fuente de nitrógeno, mientras que las actividades de GS y GDH sí parecen estar reguladas por la fuente nitrogenada. Estos datos han llevado a estos autores a proponer que el hecho de que B. polymyxa no pueda desreprimir la vía GS-GOGAT en condiciones de limitación de amonio le resulta desventajoso cuando la bacteria compete con otros fijadores de nitrógeno. Kanamori y col (1987b)

también han estudiado el caso de Bacillus macerans donde tampoco se utiliza la vía GS-GOGAT cuando el microorganismo fija nitrógeno; sin embargo esta bacteria sólo fija nitrógeno en condiciones de anaerobiosis estricta, por lo que el utilizar la vía GDH-GS podría resultar más económico, ya que la vía GS-GOGAT implica un gasto mayor de ATP.

Resumiendo, en la mayoría de los microorganismos donde se han estudiado las vías de asimilación de amonio, el papel de la vía GS-GOGAT no ha sido aclarado, ya que sólo para el caso de Klebsiella es claro que la vía GS-GOGAT funciona en condiciones de limitación de amonio. Así, en otros microorganismos la vía GS-GOGAT podría tener que ver con la degradación de glutamina, como ha sido propuesto para N. crassa, mientras que la vía GDH-GS parece tener un papel biosintético.

Plantas Superiores. Algunos estudios realizados en leguminosas indican que estas plantas poseen varias isoformas de la enzima glutamino sintetasa; para el caso de frijol, se han descrito la existencia de dos isoformas que se encuentran en tanto en hoja como en raíz. Por otro lado, en hoja existen a su vez varios polipéptidos de GS específicos de este tejido; además, existe otra isoforma específica de nódulo (Lara M. y col., 1985). En estos organismos se han descrito dos actividades de GOGAT independientes, una de ellas utiliza NADH como cofactor y la otra es dependiente de Ferredoxina (Fowler y col., 1974; Lea y Mifflin, 1974). Además de su especificidad por el cofactor, estas enzimas difieren en su estructura, ya que anticuerpos dirigidos hacia la GOGAT Fd-dependiente no cruzan contra la GOGAT-NADH dependiente (A. Suzuki y col., 1982). Por otro lado, la actividad de GOGAT-NADH se ha encontrado asociada a los plástidos de las raíces mientras que la GOGAT Fd-dependiente se encuentra en tejidos fotosintéticos asociada a los cloroplastos (Mifflin y Lea, 1976).

Así, el papel de estas dos enzimas parece ser distinto: la GOGAT-NADH se induce en nódulos de leguminosas paralelamente a la nitrogenasa y a la leghemoglobina, por lo que se piensa que su papel es el de asimilar el nitrógeno fijado por los bacteroides. Por otro lado el grupo de Cullimore y col. (1988) han descrito la existencia de dos actividades de GOGAT NADH-dependientes en nódulos de frijol. Al parecer, una de estas actividades es nódulo específica y se induce al comenzar la fijación de nitrógeno, mientras que la otra enzima parece ser específica de raíz. Las constantes de afinidad de estas dos enzimas por sus substratos son diferentes y es posible separarlas por cromatografía de intercambio iónico, lo que indica que son dos enzimas distintas. Otros estudios llevados a cabo en soya con células en cultivo han demostrado que la actividad de GOGAT-NADH está regulada por la fuente de nitrógeno, mientras que la actividad de GDH no varía al modificar la fuente nitrogenada (Chiu J. y col., 1979).

Así pues, parece claro que la principal vía de asimilación de amonio en plantas superiores es la vía GS-GOGAT, aunque pudiera ser que la GDH tuviera algún papel en raíces no noduladas.

El papel de la GOGAT-Fd dependiente parece ser el de llevar a cabo la reasimilación del amonio producido durante la

fotorespiración. Existen varias evidencias para esta propuesta. Por un lado, Somerville y Ogren (1980) han aislado mutantes de Arabidopsis thaliana incapaces de crecer en condiciones donde se permite la fotorespiración (bajas concentraciones de CO₂). Esta mutante esta afectada en la GOGAT-Fd por lo que no puede reasimilar el amonio generado durante la fotorespiración. Por otro lado, el grupo de Osmond y col. (1982), usando N¹⁵ y siguiendo la marca incorporada a aminoácidos (glutamina y ácido glutámico) han demostrado que la vía GS-GOGAT-Fd está involucrada en la reasimilación de amonio durante la fotorespiración. El mismo grupo (B. Osmond y col., 1982b) reporta que la asimilación de amonio proveniente de la fotorespiración pudiera darse en cloroplasto, donde está localizada la GOGAT-Fd.

Otros resultados indican que la GOGAT-NADH tiene una gran especificidad por sus substratos, especialmente por 2-oxo-glutarato ya que otros cetoácidos como succinico y oxaloacetato inhiben competitivamente su actividad (M. J. Boland y C. B. Court, 1981). Este mismo grupo reporta que la GOGAT-NADH es susceptible de ser inhibida, de manera competitiva también, por NAD (M. J. Boland y A. G. Benny, 1977). La significancia biológica de estas inhibiciones no ha sido explorada.

Saccharomyces cerevisiae. Este hongo posee una deshidrogenasa glutámica biosintética NADP dependiente cuyo gen estructural ha sido denominado GDH1. Cepas mutantes en este gen crecen con un tiempo de duplicación una hora mayor que el de la cepa silvestre en exceso de amonio como fuente de nitrógeno (Drillien y Lacroute, 1972). Este crecimiento residual se debe a la operación de la vía GS-GOGAT (J. Folch, 1986) y no a la presencia de GDH-NAD como habian propuesto Grenson y col. en 1974. La actividad de GDH-NADP en esta levadura se regula por la fuente de nitrógeno y carbono; cuando se cultiva a S. cerevisiae en amonio como fuente de nitrógeno, la actividad de esta enzima alcanza sus valores máximos, mientras que al adicionar ácido glutámico al medio de cultivo la actividad se reprime (Roon y Even, 1978). Por otro lado, Mazon (1978) ha encontrado que al deprivar a la levadura de glucosa, la actividad de GDH-NADP disminuye debido a una degradación de la enzima. El grupo de González y col. (1985b) ha reportado que mutantes alteradas en aconitasa son incapaces de inducir la actividad de GDH-NADP debido a la baja poza de ácido α -cetoglutárico que presentan; esto sugiere que el propio α -cetoglutárico o bien otro intermediario del ciclo de Krebs es un modulador positivo de esta enzima (González y col. 1985b). Cuando la concentración intracelular de amonio aumenta, la GDH-NADP se reprime probablemente para preservar la poza de α -cetoglutárico (Bogonez y col. 1985).

La glutamino sintetasa de S. cerevisiae está compuesta de diez a doce monómeros de peso molecular de 43,000 daltones (Mitchell y Magasanick, 1983a) y el gen estructural ha sido clonado complementando una mutante de levadura alterada en la actividad de GS (González y col., 1984). La GS de esta levadura esta regulada por la fuente de nitrógeno (Dubois y Grenson, 1974) y se ha demostrado que su inducción corresponde a una síntesis de novo (Mitchell y Magasanick, 1984). Estos mismos autores han propuesto un sistema de inactivación irreversible probablemente

proteolítico. Se han identificado tres sistemas regulatorios que controlan la producción de GS en S. cerevisiae: el primero de ellos responde a los niveles de glutamina y depende del producto del gene Gln 3; el segundo pertenece al sistema de control general de aminoácidos que acopla la desrepresión de varias enzimas biosintéticas en respuesta a una privación de aminoácidos y está mediado por el gene GCN 4; por último, el tercer sistema responde a la limitación de purinas (Mitchell y Magasanick, 1984).

En Saccharomyces cerevisiae se ha descrito la presencia de la actividad de GOGAT (Roon y col., 1974). Por otro lado, Meister y col. purificaron la enzima a homogeneidad y reportan que está constituida por dos subunidades con pesos moleculares de 169,000 y 61,000 daltones. La actividad de GOGAT en esta levadura no varía en respuesta a la fuente de nitrógeno por lo que el papel de la vía GS-GOGAT en S. cerevisiae es poco claro.

Recientemente, se ha obtenido una mutante alterada en la actividad de glutamato sintasa en Saccharomyces cerevisiae (J. Folch, 1986). Esta mutante fue obtenida a partir de una cepa mutante en el gene estructural de GDH y es un auxótrofo total por ácido glutámico. El análisis genético realizado con esta cepa sugiere que, además de la mutación en GDH, es portadora de dos mutaciones que anulan la actividad de GOGAT; cada una de las mutaciones por separado no es suficiente para generar el carácter GOGAT⁻.

Estudios llevados a cabo con cepas provenientes de las cruces utilizadas para el análisis genético, demuestran que la GOGAT no es necesaria para el crecimiento en limitación de amonio, como han propuesto otros autores, ya que una cepa GDH⁺, portadora de las dos mutaciones que generan el carácter GOGAT⁻, es capaz de crecer en condiciones de limitación de amonio utilizando a la vía GDH-GS para la síntesis de ácido glutámico y la asimilación de amonio (J. Folch, 1986).

Así pues, parece ser que la GOGAT en S. cerevisiae tiene otro papel distinto al de asimilar amonio en condiciones de limitación de nitrógeno. Este trabajo pretende averiguar cual es el papel de la vía GS-GOGAT en Saccharomyces cerevisiae.

OBJETIVOS

Como se ha mencionado en la INTRODUCCION, la vía de asimilación GS-GOGAT se ha descrito en un gran número de organismos pero su papel en muchos de ellos no ha sido aclarado.

En S. cerevisiae también se ha descrito la operación de la vía GS-GOGAT e inclusive se ha purificado esta última enzima (Roon y col., 1974, 1978), sin embargo su papel en la asimilación de amonio es poco claro. Como parte de mi Tesis de Licenciatura obtuve una mutante de S. cerevisiae alterada en la actividad de glutamato sintasa que presenta una auxotrofia total por ácido glutámico. He propuesto en mi Tesis que esta cepa es portadora de dos mutaciones que, juntas, dan como resultado la carencia de GOGAT. Así pues, los objetivos del presente trabajo son los siguientes:

- 1.- Demostrar que la cepa mutante en GOGAT es efectivamente portadora de dos mutaciones.
- 2.- Determinar de que modo contribuyen cada una de las mutaciones para generar el fenotipo GOGAT -.
- 3.- Analizar las condiciones en donde funcione la vía GS-GOGAT para determinar su papel en Saccharomyces cerevisiae.

MATERIAL Y METODOS

CEPAS: Las cepas usadas en este trabajo son: la cepa S288C (MAT α , suc 2, gal 2 cup 1); la cepa D587-4B (MAT α , his 1) y la cepa D585-11C (MAT α , lys 1) que provienen de los laboratorios de Cold Spring Harbor, Nueva York, E. U.. Las demás cepas fueron obtenidas en nuestro laboratorio del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la U.N.A.M.

MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO : Para el crecimiento en precultivos se utilizó medio YPD (extracto de levadura 1%, peptona de caseína 2%, y glucosa al 2% como fuente de carbono) o medio mínimo, según se indica en el texto. El medio mínimo (MM) se preparó siguiendo la fórmula de Difco Yeast Nitrogen Base con vitaminas, sales y elementos traza; como fuente de carbono se añadió glucosa al 2% y como fuente de nitrógeno sulfato de amonio 40 mM. Para los crecimientos en etanol o acetato basta substituir la glucosa por cualquiera de estos compuestos, también a una concentración del 2%. Los requerimientos de auxotrofia se añadieron a una concentración del 0.1%, salvo el ácido glutámico, cuya concentración final fue de 0.1%.

Para los crecimientos en condiciones de limitación de amonio se preparó un medio idéntico al MM pero sin sulfato de amonio (SN). A este medio se le inyectó una solución de cloruro de amonio al 0.008% a un ritmo de 0.85 ml /hr.

Las células se incubaron a 30° C y el crecimiento se siguió midiendo la densidad óptica del cultivo a 650 nm de longitud de onda o bien en un aparato Klett-Sumerson.

Para las determinaciones de las actividades enzimáticas el tiempo de cultivo y la velocidad de agitación se variaron de acuerdo a cada experimento. Estos parámetros se indican en el texto o en los pies de figura.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE GOGAT : El extracto celular se preparó colectando las células por filtración usando filtros Millipore tipo RAWP 1.2. Las células se resuspendieron en buffer de extracción de GOGAT: Fosfato de potasio 0.1M pH 7.5 y β -mercaptoetanol al 0.5%. Para medir la reacción se prepara el siguiente coctel :

Fosfato de potasio 0.1M -----	0.87 ml
NADH 20 mM -----	0.05 ml
α -cetoglutarato 0.01M -----	0.05 ml
extracto -----	0.02 ml
Glutamina 50 mg/ml -----	0.02 ml

Como control se usó la misma mezcla de reacción adicionada

de 0.2ml de una una solución de azaserina 25 mM. La reacción se arranca con la solución de glutamina y se sigue el decaimiento de NADH midiendo absorbancia a 340 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro. Para determinar la actividad de GOGAT a los diferentes pH's se usan los diferentes buffers ajustados a los pH's correspondientes. Así mismo, la solución de α -cetoglutarato debe estar ajustada al pH correspondiente.

PURIFICACION DE GLUTAMATO SINTASA : Se preparó el extracto en buffer de extracción de GOGAT y se precipitó con sulfato de amonio al 40% de saturación. La pastilla se resuspendió en buffer de extracción de GOGAT y se dializó toda la noche. El extracto se pasó por una columna de intercambio iónico de DEAE-sephacel; la enzima se eluyó con un gradiente lineal de cloruro de potasio de 0 a 500 mM (200ml) y se colectaron fracciones de un mililitro. Aquellas fracciones con actividad se recuperaron; una vez dializado el extracto se pasó por una columna de sepharosa azul. La enzima pura se eluyó con 30 ml de una solución de NADH 0.1 mM. La electroforesis se llevó a cabo siguiendo el método de Laemmli y col. (Laemmli, 1970). Esta parte del trabajo se realizó con la colaboración del Dr. Miguel Lara, en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la U.N.A.M.

CRUZAS Y DISECCION DE TETRADAS : Las cruza se llevaron a cabo estritando las diferentes cepas una encima de otra en placas de YPD. Después de 48 hrs. de incubación a 30 grados C se transfirió la cruz a medio de esporulación según fórmula de Fink (1970) en donde se incubó de 3 a 5 días hasta ver la aparición de ascas.

Las tétradas de las diferentes cruza se trataron con una solución de gluculasa al 0.2% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se tomó una asada de la suspensión y se colocó sobre una capa de agarosa al 2%. La separación se llevó a cabo con un micromanipulador con aguja de vidrio.

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

DETERMINACION DE PROTEINA : La proteína de los extractos celulares se cuantificó de acuerdo al método de Lowry (Lowry y col., 1951) usando albúmina bovina como estándar.

RESULTADOS

I. ANALISIS GENETICO DE LA MUTACION QUE CONFIERE EL FENOTIPO GOGAT-

Como se ha mencionado en la introducción, el análisis genético llevado a cabo con la cepa CN33 (GDH⁻ GOGAT⁻) (Fig.1) sugiere fuertemente que esta cepa es portadora de dos mutaciones que provocan el fenotipo de auxotrofia por ácido glutámico dado que los resultados del análisis de la progenie de esta cepa muestran la aparición de patrones de segregación 3:1, 4:0 y 2:2 (Tabla 1). Para confirmar estos resultados se midió la actividad de GOGAT en 15 tétradas provenientes de la cruce CN33 x D585-11C (Fig. 1). En todos los casos se encontró que en las segregantes 3:1, tres de las cepas mantienen la actividad de GOGAT mientras que la restante carece de ella. Así mismo, las cuatro cepas de las tétradas que presentan patrón de segregación 4:0 muestran todas actividad de GOGAT. (Datos no mostrados). No se dió el caso de obtener patrones de segregación inversos, es decir, tres cepas auxótroficas y una protótrofica ó cuatro cepas auxótroficas.

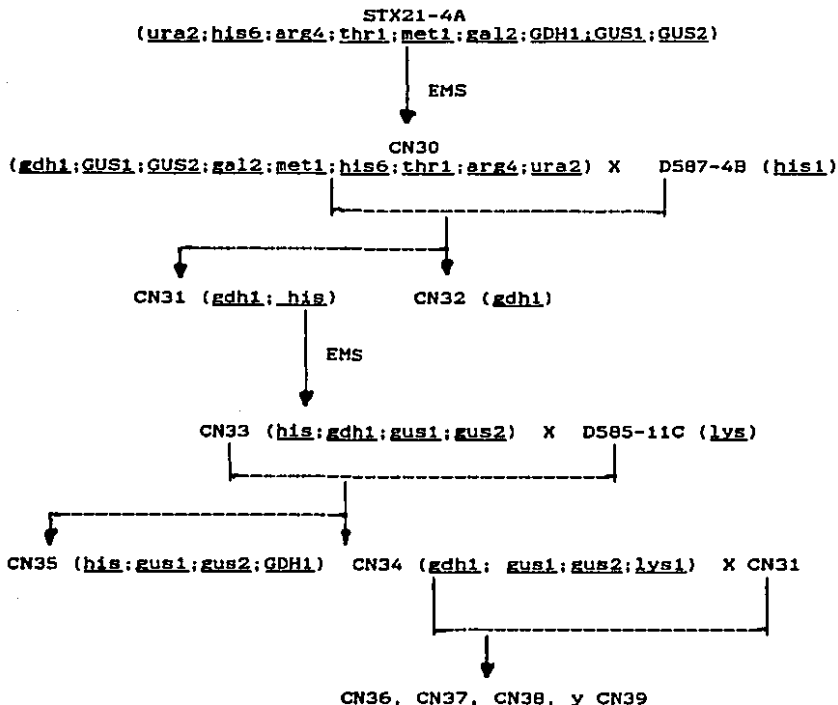
Para demostrar que el patrón de segregación obtenido de la cruce CN31 x CN34 (Fig.1) se debe a dos mutaciones, decidimos trabajar con las cepas CN36, CN37, CN38, y CN39 (Fig.1), todas provenientes de la misma tétrada que presenta un patrón de segregación 3:1 (combinación B de la Tabla 1). Así, se hicieron diferentes cruces para analizar la progenie y determinar que cepas eran portadoras de las mutaciones sencillas y cual tenía los dos alelos silvestres; esto debido a que los datos de actividad enzimática sólo muestran que la cepa CN39 es la portadora de dos mutaciones ya que carece de la actividad de GOGAT (Fig.2).

De diez tétradas analizadas de la cruce de la cepa CN36 x CN39, cuatro presentan un patrón de segregación 2:2, cinco segregan 3:1 y la restante lo hace 4:0, lo cual indica que la cepa CN36 conserva los dos alelos silvestres ya que en la cruce se dan otra vez todas las posibilidades de segregación de la Tabla 1. Toda la progenie de la cruce de la cepa CN38 x CN39 presenta un patrón de segregación 2:2 lo que demuestra que la cepa CN38 es portadora de una mutación sencilla. Por otro lado, al cruzar las cepas CN38 x CN37 se obtiene un patrón de segregación esperado para una cruce en la que los dos padres son portadores de una mutación sencilla, es decir, tres presentan segregación de 2:2 cinco lo hacen 3:1 y dos 4:0. Así, queda claro que la cepa CN36 es portadora de dos alelos silvestres, la cepa CN39 de dos alelos mutados y las cepas CN37 y CN38 son portadoras de un alelo mutado y uno silvestre (combinación B de la Tabla 1).

Por otro lado, todos los diploides formados en las cruces son capaces de crecer en MM, lo que indica que las mutaciones son recesivas frente al alelo silvestre.

Una vez conocido el número de mutaciones presente en cada cepa, procedimos a realizar un análisis bioquímico de las actividades de GOGAT presentes en las cepas CN36, CN37, CN38, y CN39.

Figura 1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*



ver texto para el fenotipo de las cepas CN36, CN37, CN38 y CN39

II. CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LAS ACTIVIDADES DE GOGAT PRESENTES EN LAS CEPAS CN36, CN37, CN38, Y CN39.

Como se menciona en el inciso anterior, la evidencia genética hasta ahora presentada, demuestra la presencia de dos mutaciones en la cepa CN33; para llevar a cabo un estudio bioquímico de estas mutaciones se escogieron las cepas CN36, CN37, CN38, y CN39, ya que presentan un patrón de segregación 3:1 (combinación B de la Tabla 1) y por lo tanto las mutaciones están separadas en dos de ellas: CN37 y CN38. La Figura 2 muestra una curva de actividad de GOGAT medida a diferentes pH's. Los extractos fueron obtenidos de las cepas CN36, CN37, CN38 y CN39 cultivadas en MM en condiciones de microaerofilia. Como se puede ver en la Figura 2A, la cepa CN36 (que es portadora de dos alelos silvestres), presenta dos actividades con pH's óptimos diferentes: una a pH 6.5 (GOGAT A) y otra a pH 7.0 (GOGAT B), mientras que las cepas CN37 y CN38 presentan actividad sólo a uno de los dos pH's óptimos, una sólo a pH 6.5 (CN38, Fig.2A) y la otra sólo a pH 7.0 (CN37, Fig.2B). La cepa CN39 sólo presenta niveles muy bajos de actividad a todo lo largo del rango de pH's (Fig.2B). Hasta aquí los datos concuerdan con la evidencia genética de que las cepas CN37 y CN38 son portadoras de sólo una mutación y por lo tanto sólo retienen una de las actividades de GOGAT.

Buscando una mejor caracterización bioquímica de estas actividades enzimáticas se probaron diferentes cetooácidos como inhibidores de la actividad de GOGAT de acuerdo con los resultados obtenidos por Mora y col. (1987). En la Figura 3 se muestran las curvas de inhibición por isocitrato de las actividades de GOGAT medidas a los dos pH's óptimos; los extractos se obtuvieron de las cepas CN36, CN37 y CN38 cultivadas en MM en condiciones de microaerofilia. Como se observa, la actividad detectada a pH 6.5 de las cepas CN36, CN37 (actividad residual) y CN38 es sensible a la inhibición por isocitrato (Fig. 3A), mientras que la actividad a pH 7.0 de las cepas CN36, y CN37 es resistente (Fig. 3B). Es de notarse que la actividad de GOGAT B (pH 7.0) de la cepa CN38 es sensible a la inhibición por isocitrato en contraste con la de las cepas CN36 y CN37. Esto último pudiera indicar que la cepa CN38 es portadora de una mutación estructural que hace más sensible la actividad de pH 7.0 a la inhibición por isocitrato. Estos datos sugieren que las actividades medidas a pH 6.5 y a pH 7.0 corresponden a dos entidades proteicas diferentes.

La GOGAT de S. cerevisiae ha sido purificada a homogeneidad por el grupo de Roon y col. (1974). Sin embargo estos autores sólo reportan la existencia de dos subunidades que no tienen actividad por separado. Posiblemente las condiciones de cultivo de estos autores no sean permisivas para la expresión de las dos actividades aquí descritas (ver el siguiente inciso y DISCUSION). Con el objeto de caracterizar mejor nuestro sistema, decidimos purificar la GOGAT de S. cerevisiae a partir de la cepa CN36 cultivada en condiciones de microaerofilia, ya que esta cepa

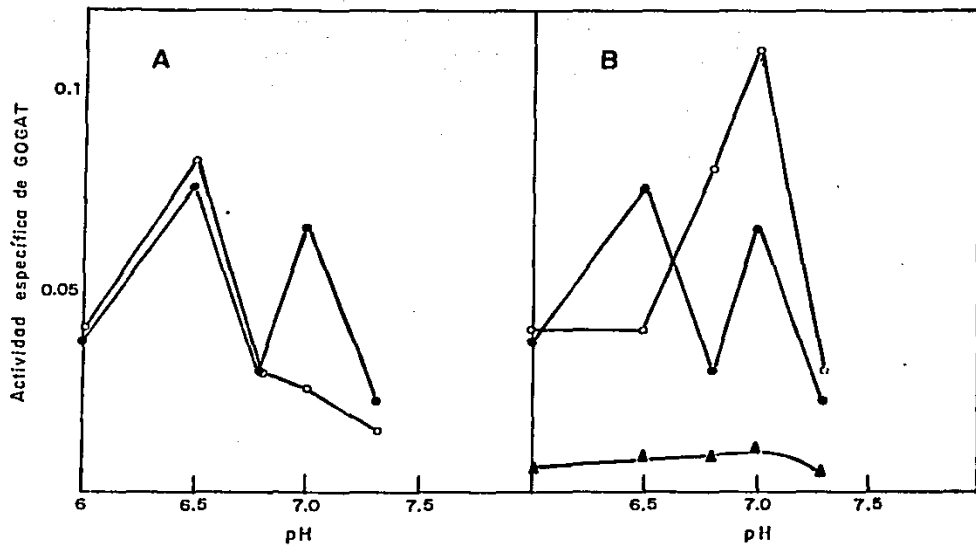


Figura 2.- Actividad de Glutamato Sintasa medida a diferentes pH's. Los extractos se obtuvieron de cultivos microaerofílicos de las cepas CN36 (●) y CN38 (○) (panel A); y CN36 (●), CN37 (○) y CN39 (▲) (panel B).

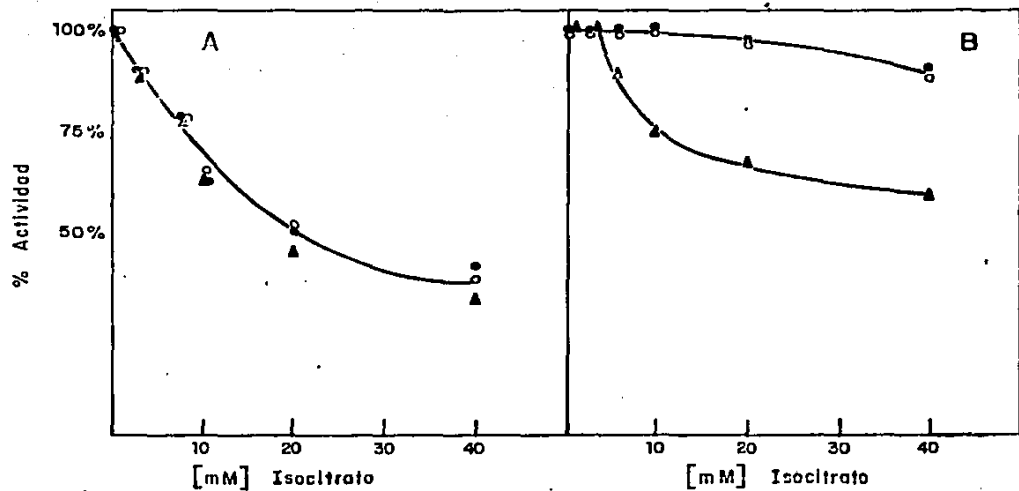


Figura 3.- Inhibición de la actividad de Glutamato Sintasa por isocitrato. Panel A, actividad determinada a pH 6.5 de las cepas CN36 (●), CN37 (○) y CN38 (▲). Panel B, actividad determinada a pH 7.0 de las cepas CN36 (●), CN37 (○) y CN38 (▲).

presenta claramente las dos actividades de GOGAT ya descritas (Fig. 2A).

El extracto celular se preparó como se describe en MATERIAL Y METODOS y se precipitó con sulfato de amonio al 40% de saturación; después de dializarlo, se pasó por una columna de intercambio iónico de DEAE-sephacel. Después de lavar la columna con buffer de extracción + PMSF, se eluyó la enzima con un gradiente lineal de cloruro de potasio de 0 a 500 mM (200 ml). Se colectaron 150 fracciones de 1.25 ml aproximadamente y se midió la actividad de la enzima. La actividad se encontró en diez fracciones que fueron mezcladas y dializadas toda la noche. Después de la diálisis la enzima se pasó por una columna de sepharosa azul. La sepharosa azul es un colorante de estructura muy parecida al NADH, que es sustrato de la GOGAT, por lo que la enzima se une a la columna mientras que otras proteínas pasan de largo. La columna se lavó hasta no detectar absorbancia a 280 nm de longitud de onda lo cual es indicativo de que las proteínas inespecíficas han abandonado por completo la columna. La actividad de GOGAT se eluyó con una solución 0.1mM de NADH, ya que el sustrato, al ser más afin por la enzima que el colorante, compete por el sitio de unión y despegga la proteína; la Tabla 2 muestra los diferentes pasos de purificación de la actividad de glutamato sintasa obtenida de la cepa CN36.

La Fig.4 muestra el análisis electroforético de la enzima pura obtenida de la cepa CN36. Como se puede ver, sólo una banda de alto peso molecular se enriquece, pero aún se observa una banda muy tenue por debajo de la banda enriquecida. Dado que la enzima ha sido purificada 6,200 veces (Tabla 2), lo más probable es que la banda de bajo peso molecular sea un producto de degradación de la enzima pura. El patrón de pH's óptimos obtenido con esta preparación es muy similar al obtenido con extractos crudos, es decir, se encuentran los dos picos de pH óptimo (datos no mostrados). Por otro lado, purificaciones de GOGAT obtenidas de las diferentes cepas mutantes muestran el mismo patrón electroforético (datos no mostrados). Estos datos parecen indicar que la banda de alto peso molecular está compuesta por las dos actividades de GOGAT dado que cabe la posibilidad de que existieran dos enzimas de peso molecular semejante. Por este motivo, se recortó la banda de alto peso molecular para la obtención de anticuerpos de modo de llevar a cabo un análisis por electroforesis de doble dimensión tipo O'farrel revelando las proteínas por medio de los anticuerpos. Actualmente se espera la obtención de los anticuerpos.

Los datos hasta aquí presentados sugieren que Saccharomyces cerevisiae posee dos actividades de glutamato sintasa con pH's óptimos diferentes y distinta sensibilidad a inhibidores; sin embargo, no ha sido posible separar estas actividades por ninguno de los métodos empleados (cromatografía en DEAE-sephacel y electroforesis en gel nativo de acrilamida) por lo que probablemente se trate de una sola enzima, sujeta a modificación, lo que genere las diferencias en pH óptimo y sensibilidad a inhibidores. A continuación presentaré algunos datos fisiológicos que apoyan esta hipótesis.

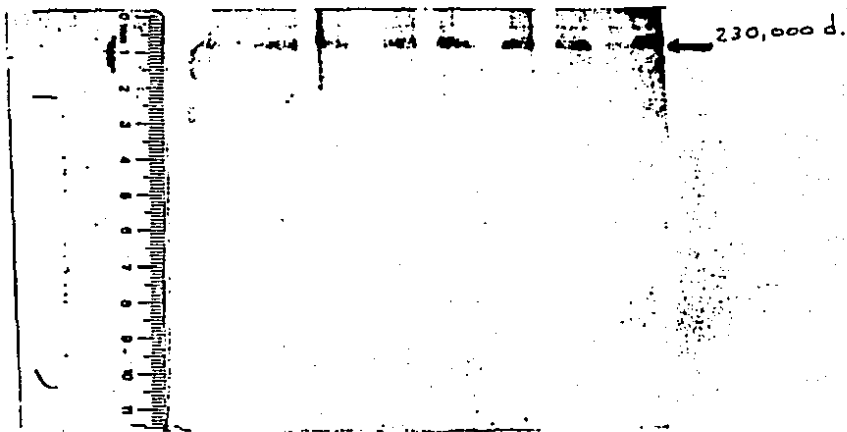


Figura 4 .- Electroforésis en gel de acrilamida en condiciones nativas de la glutamato sintasa pura obtenida de la cepa CN36. Todos los carriles presentan la misma muestra.

TABLA 2. Purificación de la Glutamato Sintasa de la cepa CN36

Paso de Purificación	Proteína Total	Unidades Totales	Actividad Específica	Factor de Purificación
Extracto crudo	654.24 mg	18.64 U.	0.0284 a	1
DEAE-Sephacel	32.0 mg	14.14 U.	0.441	15.5
Sepharosa Azul	0.020 mg	3.53 U.	176.5	6,214

a Unidades por miligramo de proteína.

III. FENOTIPOS DE LAS CEPAS S288C, CN36, CN37, CN38 Y CN39 EN FUENTES FERMENTABLES Y NO FERMENTABLES DE CARBONO

Algunos investigadores han propuesto que el papel de la GOGAT es el de ser la enzima responsable de la síntesis de ácido glutámico en condiciones de limitación de amonio. Sin embargo, como se mencionó en la introducción, una cepa que carece de la actividad de GOGAT (CN35, ver Fig.1) pero que conserva la actividad de GDH-NADP es perfectamente capaz de crecer en limitación de amonio (ver DISCUSION). Así, parece ser que la GOGAT en este microorganismo tiene un papel distinto al de asimilar amonio cuando este se encuentra en concentraciones limitantes.

La asimilación de amonio es un proceso en el cual convergen el metabolismo de nitrógeno y el de carbono ya que el amonio proveniente del medio o del catabolismo de compuestos nitrogenados es incorporado a un esqueleto de carbono. Por este motivo es muy importante que ambos metabolismos estén regulados coordinadamente. Los datos presentados anteriormente sugieren que la regulación de la glutamato sintasa en *S. cerevisiae* no responde a la limitación de nitrógeno, por lo que decidimos explorar la posibilidad de que la fuente de carbono tuviera un papel importante en la regulación de esta enzima.

La Figura 5 muestra una curva de crecimiento de las cepas S288C, CN36, CN37, CN38 y CN39 en etanol (panel A) y glucosa (panel B) como fuentes de carbono (ambos experimentos llevan sulfato de amonio como fuente de nitrógeno). Como se observa en el panel B, la cepa CN36 pese a ser GDH⁻, es capaz de crecer en esta condición gracias a la presencia de las actividades de GOGAT A y B (Fig.2A). Las cepas CN37 (portadora sólo de la GOGAT B) y CN38 (portadora de la GOGAT A) presentan un crecimiento similar entre ellas aunque menor que el de la cepa CN36. La cepa CN39 es incapaz de crecer en ninguna de las dos condiciones.

La Figura 5A muestra el crecimiento de las mismas cepas en etanol como fuente de carbono; como se observa, el crecimiento de la cepa silvestre (S288C) es idéntico al de la cepa CN36, descartando así el funcionamiento de la GDH-NADP en estas condiciones; además, el grupo de Bogonez y col. (1985) han reportado que la actividad de GDH-NADP de una cepa silvestre cultivada en acetato como fuente de carbono está reprimida. Las cepas CN37 y CN39 son incapaces de crecer cuando se cultivan en una mala fuente de carbono como etanol (Fig.5A), lo que sugiere que la actividad de GOGAT pH 6.5 es indispensable para el crecimiento en estas condiciones; en contraste, la cepa CN38 (que es portadora de la GOGAT pH 6.5) sí es capaz de sostener el crecimiento en etanol como fuente de carbono. Sin embargo, vale la pena notar que el crecimiento que presenta esta cepa no es igual al de la cepa silvestre.

Pasemos ahora a la DISCUSION, donde presentaré un modelo que explica estos datos.

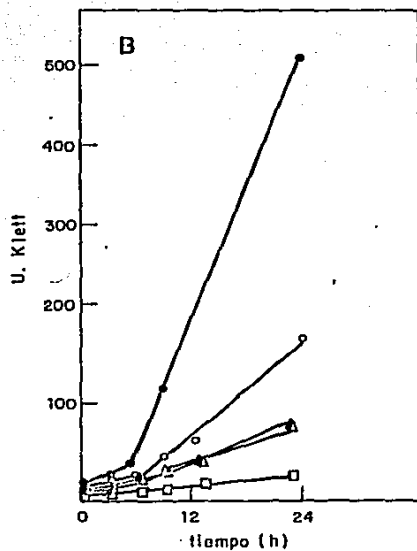
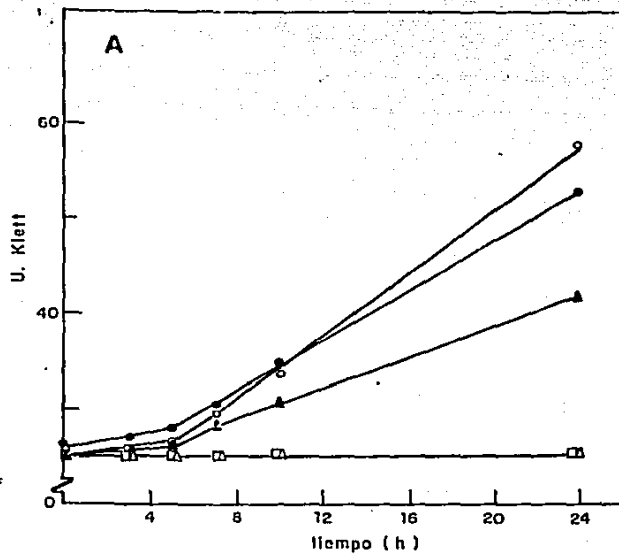


Figura 5.- Crecimiento de las cepas S280C (●), CN35 (○), CN37 (▲), CN38 (△), y CN39 (□) en etanol (Panel A) y glucosa (Panel B) como fuentes de carbono.

DISCUSION

El estudio de segregación llevado a cabo con la cruce CN34 x CN31 sugiere que la cepa CN33 es portadora de una doble mutación. El hecho de que el patrón de segregación que presenta esta cruce sea predominante 3:1 (cinco tétradas de diez analizadas) podría explicarse de dos maneras. Una posibilidad es que un fenómeno de conversión génica fuera el responsable de la aparición de segregantes 3:1; sin embargo se sabe que la frecuencia de conversión génica es de una en diez tétradas analizadas y dado el elevado número de tétradas con patrón de segregación 3:1 que se obtienen, es poco probable que se trate de un fenómeno de conversión génica. La otra posibilidad es que la cepa CN33 sea portadora de dos mutaciones necesarias para abatir la actividad de GOGAT, en cuyo caso se dan todas las posibilidades de segregación que se muestran en la Tabla 1.

Para demostrar que en efecto esta última posibilidad es la correcta, se cruzaron las cepas pertenecientes a una tétrada que presentó un patrón de segregación 3:1 entre ellas mismas. Asumiendo que la cepa CN36 sea portadora de los dos alelos silvestres, al cruzarla por una cepa como la CN39 (que carece de la actividad de GOGAT y por lo que debemos asumir que es portadora de las dos mutaciones) es de esperarse que el patrón de segregación de la progenie sea de nuevo 2:2, 3:1 y 4:0 ya que todas las posibilidades de recombinación de la Tabla 1 pueden darse. El análisis de segregación de la progenie de esta cruce muestra que efectivamente este es el caso, por lo que queda demostrado que la cepa CN36 es portadora de dos alelos silvestres y la cepa CN39 de dos alelos mutados. Por el contrario, la cruce de las cepas CN38 x CN39 genera un patrón de segregación 2:2 lo cual indica que la cepa CN38 es portadora de sólo un alelo silvestre; solamente las dos cepas que hereden este alelo tendrán actividad de GOGAT. Dados estos datos, es de esperarse que la cepa CN37 sea portadora de una sola mutación, de modo que al cruzarla por la cepa CN38 que es portadora de la otra mutación, el patrón de segregación obtenido vuelve a ser 2:2, 3:1, y 4:0, lo que demuestra que las cepas CN37 y CN38 son portadoras de una sola mutación cada una. Los resultados obtenidos al analizar la progenie de estas cruces apuntan de manera muy convincente que la cepa CN33 efectivamente es portadora de dos mutaciones y que ambas son necesarias para generar el fenotipo GOGAT-.

El hecho de que tanto la cepa CN37 como la cepa CN38 presenten actividad de GOGAT y además sean necesarias dos mutaciones para abatir por completo la actividad de GOGAT en Saccharomyces cerevisiae, sugiere la presencia de dos actividades de GOGAT en este microorganismo o bien la existencia de un sistema regulatorio para GOGAT. Analicemos ahora la caracterización bioquímica llevada a cabo con las diferentes cepas mutantes.

En la Figura 2 se muestra la actividad de GOGAT medida a distintos pH's. La cepa CN36, que es portadora de dos alelos silvestres, presenta actividad de GOGAT a dos pH's óptimos dife-

rentes: 6.5 (GOGAT A) y 7.0 (GOGAT B). Por otro lado, las cepas mutantes CN37 y CN38 solamente presentan actividad a uno de los pH's óptimos encontrados; la cepa CN37 carece de la actividad de GOGAT A pero conserva la GOGAT B. La cepa CN38 retiene la actividad de GOGAT A; sin embargo, en esta cepa es posible detectar el pico de actividad de pH 7.0 cuando se usan extractos dializados para hacer la curva de actividad vs. pH (Anaid Antaramián, comunicación personal). Las cepas CN36 y CN37 presentan el mismo patrón independientemente de si se dializa o no el extracto. Una posibilidad es que la cepa CN38 sea portadora de una mutación que resulte en la acumulación de algún inhibidor de la enzima. Sin embargo, es de notarse que la GOGAT B de esta cepa es más sensible a la inhibición in vitro por isocitrato que la de la cepa silvestre. Este dato sugiere que la cepa CN38 es portadora de una mutación estructural que ha afectado la sensibilidad de la enzima a inhibidores. La cepa CN37 parece ser portadora de una mutación regulatoria que le impide expresar la actividad de GOGAT A (ver más adelante).

La inhibición de la actividad de GOGAT por isocitrato sugiere que las actividades de GOGAT A y GOGAT B se deben a dos formas diferentes de la enzima, ya que su respuesta al inhibidor es muy diferente cuando se mide a los distintos pH's óptimos. Esto mismo sugiere que las constantes de afinidad de las dos formas enzimáticas por sus substratos son diferentes, ya que la inhibición por cetoácidos, al igual que en otros sistemas, muy probablemente sea competitiva.

Hasta aquí los resultados obtenidos apuntan a la presencia de dos entidades protéicas distintas con actividad de GOGAT en Saccharomyces cerevisiae.

Con objeto de analizar si estas dos actividades corresponden a dos enzimas independientes, decidimos llevar a cabo una purificación de la glutamato sintasa de la cepa CN36, ya que esta cepa presenta los dos picos de pH óptimo.

La Tabla 2 muestra los distintos pasos de purificación de la GOGAT de la cepa CN36. Al purificar la enzima de esta cepa por métodos de intercambio iónico (DEAE-sephacel) y afinidad (Sepharosa azul), no es posible separar dos proteínas distintas. El patrón electroforético muestra sólo una banda de 230,000 daltones (aprox.) de peso molecular. Ahora bien, aún cabe la posibilidad de que existan dos glutamato sintasas independientes con un peso molecular semejante. Otra posibilidad es que las diferencias de pH óptimo y de sensibilidad a los inhibidores estén dadas por una modificación en una sola enzima, es decir, que realmente sólo se fabrique una GOGAT pero que esta sea susceptible de ser modificada dependiendo de las condiciones del medio. Esta modificación sería la responsable de el ligero cambio en el pH óptimo de la enzima y de las diferencias de sensibilidad al isocitrato, que bien pudieran reflejar un cambio significativo en las demás propiedades cinéticas de la enzima.

Para analizar con más detalle estas posibilidades sería conveniente obtener anticuerpos contra la enzima pura de la cepa CN36 y llevar a cabo un análisis electroforético de doble dimensión tipo O'farrel revelando las proteínas por medio de los anticuerpos (Western). Este tipo de análisis me permitirá distin-

guir si se trata de dos enzimas independientes o de una sola modificada; si este es el caso, se podrá saber si la modificación es en la subunidad grande o pequeña de la enzima. Actualmente me encuentro en el proceso de obtención de los anticuerpos.

El papel de la GOGAT en S. cerevisiae no ha sido aclarado, ya que su actividad es muy baja y no varía al modificar la fuente de nitrógeno; sin embargo, muchos investigadores asumen que, al igual que en otros sistemas, esta enzima lleva a cabo la síntesis de ácido glutámico en condiciones de limitación de amonio. Los datos presentados en mi Tesis de Licenciatura (J. Folch, 1986) descartan que este sea el papel de la GOGAT en este microorganismo, ya que las distintas cepas mutantes crecen con el mismo tiempo de duplicación que la cepa silvestre en condiciones de limitación de nitrógeno. Además, una cepa portadora de las dos mutaciones que abaten la actividad de GOGAT, pero que es portadora de una GDH-NADP silvestre, es capaz de crecer con el mismo tiempo de duplicación que la cepa silvestre en condiciones de limitación de nitrógeno. La actividad específica de GDH-NADP en esta cepa es hasta tres veces más alta que la que presenta la cepa silvestre. Probablemente la sobresíntesis de esta enzima compensa su baja afinidad por amonio y le permite llevar a cabo la asimilación de amonio, aunque este compuesto se encuentre a bajas concentraciones.

Así, parece que el papel de la GOGAT en levadura no es el de llevar a cabo la asimilación de amonio en condiciones de limitación de nitrógeno. Como ya se mencionó en los RESULTADOS, decidimos explorar el efecto de fuentes no fermentables de carbono en las diferentes cepas mutantes, ya que el metabolismo de carbono y el de nitrógeno deben de estar regulados coordinadamente y la asimilación de amonio es el proceso mediante el cual se unen estos dos metabolismos.

En la Figura 5 se muestran los crecimientos de las distintas cepas mutantes y la cepa silvestre en glucosa y etanol como fuentes de carbono. Por un lado, queda claro que la GDH-NADP no funciona cuando se da etanol como fuente de carbono, ya que la cepa silvestre presenta el mismo tiempo de duplicación que la cepa mutante en GDH (CN36). Además, González y col. (1987) han demostrado que en malas fuentes de carbono como etanol y acetato, la GDH-NADP está inhibida o reprimida. Otro reporte a este respecto lo proporciona el grupo de Bogonez y col. (1985) al demostrar que la síntesis de la GDH-NADP en levadura se reprime cuando se da acetato como fuente de carbono.

Así, parece ser que la vía de asimilación de nitrógeno que emplea Saccharomyces cerevisiae en fuentes no fermentables de carbono es la vía GS-GOGAT. Sin embargo, los experimentos realizados con las diferentes cepas mutantes indican que se requiere una GOGAT "especial" para crecer en estas condiciones. Como se puede apreciar en la Figura 5, la cepa CN37 (que carece de la actividad de GOGAT A) es incapaz de crecer en etanol como fuente de carbono; este dato indica que se requiere específicamente esta forma de la enzima para poder sostener el crecimiento. Muy probablemente las constantes de afinidad de la GOGAT B no sean las adecuadas para poder tomar sus sustratos a

las concentraciones que se encuentran en limitación de carbono. Además, en nuestro grupo se ha encontrado que la GOGAT B es muy sensible a la inhibición por NAD mientras que la GOGAT A es resistente a este inhibidor (Anaíd Antaramián, comunicación personal.) Cuando se da etanol como fuente de carbono, la única posibilidad de obtener ATP es a través de la cadena respiratoria por lo que en estas condiciones es de esperar que las pozas de NAD sean más elevadas que las de NADH dado que este compuesto necesita ser oxidado para la obtención de ATP. Tal vez este sea el motivo por el que la cepa CN37 es incapaz de crecer en malas fuentes de carbono, ya que la única enzima capaz de llevar a cabo la asimilación de amonio está inhibida.

Por otro lado, notemos en la Figura 5A que la cepa CN38 no es capaz de crecer en etanol con el mismo tiempo de duplicación de la cepa silvestre. Cuando se mide el patrón de pH's óptimos en esta cepa cultivada en etanol como fuente de carbono sólo aparece el pico de GOGAT A (pH 6.5) al igual que en la cepa silvestre cultivada en las mismas condiciones; así mismo, extractos dializados obtenidos de esta condición, sólo muestran la recuperación de la actividad de GOGAT B (pH 7.0), mientras que no se observa efecto de diálisis en la actividad de pH 6.5 en ninguna de las dos cepas. (Anaíd Antaramián, comunicación personal). Este dato apoya la suposición de que la cepa CN38 es portadora de una mutación estructural que no logra inactivar por completo la actividad de GOGAT. Así mismo, este dato descarta que la GOGAT A sea una enzima independiente de la GOGAT B, ya que si este fuera el caso, la cepa CN38 sería portadora de una GOGAT A silvestre (ver los datos genéticos de la Tabla 1) y por lo tanto su crecimiento en etanol debería ser idéntico al de las cepas CN36 y silvestre. Si la cepa CN38 fuera portadora de una mutación que resultara en la sobreproducción de algún inhibidor de la GOGAT, notaríamos un efecto de diálisis en la actividad de pH 6.5 de la cepa CN38 y este no es el caso. Como mencioné anteriormente, estos datos se ajustan mejor al modelo en el cual propongo que la GOGAT de levadura se sintetiza en una forma (GOGAT B) pero que es susceptible de sufrir una modificación que cambia sus propiedades cinéticas, su sensibilidad a inhibidores y su pH óptimo hacia pH 6.5 (GOGAT A).

Así, este modelo implica que la cepa CN38 es portadora de una mutación "leaky" que afecta principalmente a la enzima en su estado no modificado (GOGAT B). Sin embargo esta cepa es capaz de modificar su GOGAT hacia la forma que tiene pH óptimo de 6.5 y esto probablemente mejore la función de la enzima, ya que le permite crecer en etanol como fuente de carbono, aunque con un tiempo de duplicación mayor que el de la cepa silvestre. Esto también explica que en la cepa CN38 sea posible detectar la actividad de pH 7.0 cuando se dializa el extracto, ya que la diálisis la libera de la inhibición por cetoácidos a la cual su GOGAT B es más sensible.

Por otro lado, el modelo también implica que la cepa CN37 posee una GOGAT silvestre (forma B) pero es portadora de una mutación que le impide modificar su GOGAT hacia la forma A, por lo que jamás aparece el pico de actividad a pH 6.5 y por lo tanto esta cepa es incapaz de sostener el crecimiento en etanol como

fuerza de carbono.

Este modelo también explica el hecho de que estas cepas mutantes no puedan crecer en glucosa como fuente de carbono con el mismo tiempo de duplicación que su hermana la cepa CN36, que posee tanto a la GOGAT A como a la GOGAT B. Así, la cepa CN38 no puede sintetizar la misma cantidad de ácido glutámico que la cepa CN36, ya que, a pesar de tener las dos formas enzimáticas, la mutación de la que es portadora hace que su GOGAT B funcione mal. El dato de que la cepa CN35 (GDH⁺ GOGAT A - GOGAT B⁻) crezca con un tiempo de duplicación mayor que el de la cepa silvestre en glucosa como fuente de carbono sugiere además, que la GOGAT B pudiera tener un papel muy importante en esta condición. Por otro lado, la cepa CN37 tampoco crece con el mismo tiempo de duplicación que la cepa CN36, ya que, al faltar la GDH-NADP, se requieren las dos formas de GOGAT para poder sostener un crecimiento con ese tiempo de duplicación (Figuras 2 y 5). La cepa CN39, al ser portadora de ambas mutaciones es incapaz de crecer en ausencia de ácido glutámico, ya sea en glucosa o etanol como fuentes de carbono.

Creo que el análisis por medio de anticuerpos de las actividades de GOGAT en las cepas mutantes y silvestre contribuirá al esclarecimiento de este modelo.

Los datos hasta aquí presentados sugieren fuertemente que el papel de la GOGAT A es el de llevar a cabo la síntesis de ácido glutámico en condiciones de limitación de carbono. Probablemente sea necesario modificar la enzima para que su afinidad por alguno de los substratos aumente y pueda llevar a cabo la síntesis de ácido glutámico. Los datos de inhibición por cetoácidos sugieren que la constante de afinidad por 2-oxo-glutarato se modifica, ya que a pH 6.5 esta enzima es susceptible a la inhibición (muy probablemente de tipo competitivo) por estos compuestos. Por otro lado, esta modificación también hace que la enzima sea resistente a la inhibición por NAD, lo que le permite operar en condiciones en donde la cadena respiratoria está funcionando muy rápidamente.

La GOGAT B muy probablemente sea importante en condiciones de microaerofilia y anaerobiosis. Revisemos algunos datos que me llevan a proponer un papel dual para la GOGAT B en estas condiciones.

En Saccharomyces cerevisiae, Soberón y col. (1987a) han descrito la existencia de dos glutaminasas, una citoplásmica (glutaminasa B) y otra asociada a membrana (glutaminasa A); mutantes afectadas en la actividad de glutaminasa B son incapaces de crecer en glutamina como fuente de nitrógeno, ya que si este compuesto se acumula, para el flujo de carbono a través de la inhibición o represión de algunas de las enzimas de la glicólisis. Además, en esta levadura existe otra vía alterna para la degradación de glutamina que comprende la reacción acoplada de la transaminasa de glutamina y la w-amidasa (Soberón y col., 1987b). Esta vía funciona principalmente en condiciones de microaerofilia, en donde se acumulan algunos substratos de la transaminasa de glutamina (cetoácidos), mismos que inhiben a la

actividad de glutaminasa B haciendo las dos vías excluyentes. Vale la pena notar que al utilizar la vía de la omega-amidasa no se regenera una molécula de glutámico, ya que los productos finales de esta vía son un aminoácido, 2-oxo-glutarato y amonio.

Por otro lado, González y col. (1987) han reportado que la actividad de GDH-NADP se inhibe competitivamente por algunos cetoácidos.

Así, en condiciones de microaerofilia, al acumularse ciertos cetoácidos, la síntesis de ácido glutámico se ve muy disminuida por la inhibición de la GDH-NADP; además, las pozas de glutamina podrían aumentar, ya que la transaminasa de glutamina es una enzima con mucho menor capacidad de degradación de glutamina que la glutaminasa B (Soberón y col., 1987b). De esta manera S. cerevisiae, a través de la actividad de GOGAT B, puede mantener las pozas de glutamina a niveles adecuados (de modo de no parar el flujo de carbono por glicólisis) y al mismo tiempo llevar a cabo la síntesis de ácido glutámico y la asimilación de amonio.

Vale la pena notar que la actividad de GOGAT B no se inhibe por cetoácidos; la actividad de GOGAT A sí es susceptible a la inhibición por estos compuestos, por lo que no podría funcionar en condiciones de microaerofilia. Además también hay que notar que en esta condición no puede haber NAD acumulado ya que, al no haber oxígeno, la cadena respiratoria está detenida y el NADH no puede ser oxidado, lo que permite el funcionamiento de la GOGAT B.

En conclusión, el papel de la GOGAT A es el de llevar a cabo la síntesis de ácido glutámico en condiciones de limitación de carbono y el papel de la GOGAT B es el de sintetizar este mismo compuesto en condiciones de microaerofilia y anaerobiosis. Estas vías son excluyentes y por lo tanto el crecimiento en limitación de carbono en condiciones de microaerofilia no es posible. Por otro lado la GDH-NADP se encarga de la síntesis de ácido glutámico en condiciones de exceso de carbono, nitrógeno y oxígeno.

El hecho de que Saccharomyces cerevisiae posea dos actividades de GOGAT, además de la GDH-NADP, hace que este microorganismo sea muy versátil en cuanto a su capacidad de colonizar muy distintos nichos ecológicos, ya que a través de la regulación de estas tres enzimas puede coordinar la utilización de diversas fuentes de nitrógeno y carbono en diferentes circunstancias. Así, encontramos muy pocos organismos que sean capaces de crecer en tan diversas condiciones como lo son, limitación de nitrógeno, microaerofilia, malas fuentes de carbono como acetato y etanol y aun anaerobiosis. Saccharomyces cerevisiae ha desarrollado un sistema de regulación que le permite manejar todas estas posibilidades.

REFERENCIAS

- Baldani V. L. D. y Dobereiner (1980)
Soil. Biol. Biochem. 12: 433-439
- Bender R. A., Janssen K. A., Resnick A. D., Blumenberg M. Foor
F., Magasanik B. (1977)
J. Bacteriol. 129: 1001-1009
- Bogonez E., Satrústegui J., y A. Machado (1985)
J. Gen. Microbiol. 131: 1425-1432
- Bohannon D. E., Rosenkrantz M. S. y A. L. Sonenshein (1985)
J. Bacteriol. 163: 957-964
- Boland M. . y A. G. Benny (1977)
Eur. J. Biochem. 79:355
- Boland M. J., C. B. Court (1981)
Biochem. et Biophys. Acta. 657:539
- Bravo A., Becerril B. y J. Mora (1988)
J. Bacteriol. 170: 985-988
- Brenchley J. E., Prival M. E., y B. Magasanik (1973)
J. Biol. Chem. 248: 6122-6128
- Brown C. M., A. C. R. Dean, D. C. Ellwood C., G.T. Evans y J.
Melling (1976)
Continuous Culture 6: Applications and New Fields Ed. Ellis Hor-
wood, Chichester, England p. 170-183
- Calderón J. y J. Mora. (1985)
J. Gen. Microbiol. 131: 3237-3242
- Castaño I., Bastarrachea F., y A. Covarrubias (1988)
J. Bacteriol. 170: 821-827

Chiu J. y Shargool P. D. (1979)
Plant Physiol. 63:409-415

Cullimore J. y Feng-Ling Chen (1988)
Plant Physiol. 88:1411-1417

Dávila G., Lara M., Guzmán J., y J. Mora (1980)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 92: 134-140

Dean D. R., y A.I. Aronson (1980)
J. Bacteriol. 141: 985-988

Deshpande K. L. y J. F. Kane (1980)
Biochem Biophys Res. Commun. 93: 308-31

Deuel T. F., Ginsberg A., Yeh J., Shelton E., y R. E. Stadtman
(1970)
J. Biol. Chem. 245: 5195-5205

Deuel T. F., y S. Prusiner (1974)
J. Biol. Chem. 249: 257-264

Drillien R. y F. Lacroute (1972)
J. Bacteriol. 109: 203-209

Dubois E., y M. Grenson (1974)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 60: 150-155

Fink G. R., (1970)
Methods in Enzymology 16: 59-78

Folch J. (1986)
Tesis de Licenciatura. U. A. C. P. y P. del CCH de la U.N.A.M.

Foor F., Reuveney Z., Magasanik B. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2636-2640

Fowler M. W., W. Jessup, G. S. Sarkissian, (1974)
FEBS Lett. 46:340-42

Freese E., Park S.W., y M. Cashel (1964)
Proc. Natl. Acad. Sci. 51: 1164-1172

F. L. Pan y J. G. Coote (1979)
J. Gen. Microbiol. 112: 373-377

Garcíarrubio A., Lozoya E., Covarrubias A., y F. Bolívar (1983)
Gene. 26: 165-170

González A., Calva E., y Dávila G. (1985a)
Gene 36: 123-129

González A. Olivera H. Rodríguez L. Soberón M. (1985b)
J. Gen. Microbiol. 135: 2565-2569

González A., Rodríguez L., Folch J., Soberón M. y Olivera H.
(1987)
J. Gen. Microbiol. 133: 2497-2501

Grenson M., Dubois E., y M. Piotroroneska (1974)
Mol. Gen. Genet. 128: 73-80

Henning S. B. y A. Ginsburg (1971)
Arch. Biochem. Biophys 144: 611-620

Hernández G., Sánchez-Pescador R., Palacios R., y J. Mora. (1983)
J. Bacteriol. 154: 524-528

Hernández G., Mora Y., y J. Mora (1986)
J. Bacteriol. 165: 133-137

Hirschman J., Wong P. K., Sci K., Keiner J., Kustu S. (1985)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7525-7529

Hummelt G. y Mora J., (1980a)
J. Biochem. Biophys Res. Commun. 92: 127-135

Hummelt G. y Mora J. (1980b)
Biochem Biophys. Res. Commun. 96: 1688-1694

Kanamori K., Weiss R. L. y J. D. Roberts (1987a)
J. Bacteriol. 169: 4692-4695

Kanamori K., Weiss R. L., y J. D. Roberts (1987b)
J. Biol. Chem. 262: 11038-11045

Kleiner D. (1975)
Arch. Microbiol. 104: 163

Kleiner D., Phillips S., y E. Fitzke (1981)
H. Bothe y A. Trebst (eds.) Inorganic Nitrogen and Sulfur
Ed. Springer Verlag, New York p. 131-140

Kleinschmidt T. A. y Kleiner D. (1978)
Eur. J. Biochem. 89:51-60

Kusnan M. B., Berger M. G., y H. P. Fock (1987)
J. Gen. Microbiol. 133: 1235-1242

Laemmli U. K. (1970)
Nature 227: 680-689

Lara M., Forta H., Padilla J., Folch F., Y Sánchez F. (1984)
Plant Physiology 76: 1019-1023

Lea P. J., Mifflin B. J. (1974)
Nature 251:614

Lowitz A., Calderón J., Hernández G., y J. Mora (1987)
J. Gen. Microbiol. 133: 2333-2340

Lowry O. H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951)
J. Biol. Chem. 193: 285-289

Lozoya E. Sánchez-Pescador R., Covarrubias A., Vichido I., y
Bolívar F. (1980)
J. Bacteriol. 144: 616-621.

Mazon J.J. (1978)
J. Bacteriol. 133: 780-785

Meers, J.L. y D.W. Tempest. (1970)
J. Gen. Microbiol. 64: 187-194

Mifflin B. J., Lea P. J., (1976)
Phytochemistry 15: 873

Miller R.E., y E. R. Stadtman (1972)
J. Biol. Chem. 247: 7407-7419

Mitchell A.P., y B. Magasanik (1983a)
J. Biol. Chem. 258: 119-124

Mitchell A. P. y B. Magasanik (1983b)
J. Biol. Chem. 259: 12054-12062

Mora Y., Hernández G. y Mora J. (1987)
J. Gen Microbiol. 133: 1667-1674

Nagatani H., Shimizu J., y R. C. Valentine (1971)
Arch. Microbiol. 79: 164-175

Ninfa A. y Magasanik B. (1986)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5909-5913

Osburne M. S., y E.R. Signer (1980)
J. Bacteriol. 143: 1234-1240

Osmond C. B., y K. C. Woo (1982)
Plant Physiol. 69:591

Osmond C. B., K. C. Woo, Morot-Gaudry, R. E. Summons (1982)
Plant Physiol. 70:1514-1517

Pahel G., Rothstein D. M., Magasanik B. (1982)
J. Bacteriol. 150:202-213

Pahel G., Zelenetz A. D. y B. M. Tyler (1978)
J. Bacteriol. 133: 139-148

Pateman J. A., (1969)
Biochem. J. 115: 769-783

Patriquin D. G., Dobereiner J., y D.K. Jam (1983)
Can. J. Microbiol. 29: 900-915

Rockel D., Hernando J., Vakalopoulou E., Post E., Oelze S. (1983)
Arch Microbiol. 136: 74

Romero D. y G. Dávila (1986)
J. Bacteriol. 167: 1043-1047

Roon J. R., Harvey L., y F. Larimore (1974)
J. Bacteriol. 118: 89-92

Roon R. J. y H.L. Even (1978)
J. Bacteriol. 116: 36-40

Sakamoto N., Kotre A. M. y M.A. Savagean (1975)
J. Bacteriol. 124: 775-78

Sánchez F., Calva E., Campomanes M., Blanco L., Guzmán J.,
Saborio J.L., y R. Palacios. (1980)
J. Biol. Chem. 255 2231-2234

Senior P. J., (1975)
J. Bacteriol. 123: 407-418

Servin-González L. y F. Basterrachea (1984)
J. Gen. Microbiol. 130: 3071-3077

Shapiro B. M., y E. R. Stadtman (1968)
J. Biol. Chem. 243: 3769-3772

Somerville C. R. y Ogren W. L. (1980)
Nature 286:257

Suzuki, A., Vidal J., Gadal P. (1982)
Plant Physiol. 170:827

Tempest, D.W., J.L. Meers y C.M. Brown (1970).
Biochem. J. 117: 405-407.

Westby C. A., Enderlin C. S., Steinberg N. A. Joseph C. M. y J.
C. Meeks (1987)
J. Bacteriol. 169: 4211-4214

Wootton J. C., Chambers G. K., Holder A.A., Baron A.J., Taylor J.
G., Fincham J.R.S., Blumenthal K. M., Moon K., y E. L. Smith (1974)
Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 4361-4365