

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



**OBTENCION Y CARACTERIZACION DE MUTANTES
ESTRUCTURALES Y REGULATORIAS
DE GLUTAMINO SINTETASA EN N. CRASSA**

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

JOSE GUILLERMO DAVILA RAMOS

1977



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

CL. MT. 15 **118**
ADJ. T-15
FECHA 1957
PRO



QUÍMICA

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA :

PRESIDENTE : JAIME MORA CELIS.

VOCAL : FRANCISCO LARA OCHOA.

SECRETARIO : RAFAEL PALACIOS DE LA LAMA.

1er. SUPLENTE : GERARDO KONO YAICO.

2do. SUPLENTE : CARMEN QUINTO DE SANCHEZ.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS,
U.N.A.M.

SUSTENTANTE

JOSE GUILLERMO DAVILA RAMOS

ASESOR DEL TEMA

JAIME MORA CELIS

SUPERVISOR TECNICO

RAFAEL PALACIOS DE LA LAMA.

INDICE

	Pág.
I. <u>INTRODUCCION</u>	1
II. <u>MATERIAL Y METODOS</u>	11
1. Cepas	11
2. Medios	11
3. Obtención de esporas y determina-- ción de la viabilidad de la cepa - silvestre.	14
4. Mutagenesis y control de sobrevi-- vientes.	14
5. Selección de mutantes enriquecidos por filtraciones.	15
6. Concentración y plafeo de la pobla- ción enriquecida.	16
7. Aislamiento crecimiento y prueba fenotípica.	16
8. Cruza y análisis de la progenie	17
a) Análisis de la cruza por aislamiento al azar.	17
b) Disección de ascos	18
9. Crecimiento en medio líquido.	19
10. Determinación de glutámico y glu- tamina	20
11. Medición de la actividad de Glutamino Sintetasa.	21
III. <u>RESULTADOS</u>	23
IV. <u>DISCUCION</u>	28
V. <u>BIBLIOGRAFIA.</u>	32

Introducción

Dadas las dificultades que presenta el análisis de los fenómenos biológicos en células de organismos superiores, se han utilizado a eucariotes sencillos como los hongos en estudios bioquímicos y genéticos, tendientes a elaborar modelos extrapolables a organismos más complejos.

Dentro de éstos eucariotes sencillos, un mayor avance se ha logrado con el ascomyceto Neurospora crassa. En las células de este hongo se encuentra; retículo endoplásmico, mitocondrias, vacuolas, núcleo con nucleolo y diferentes inclusiones como cuerpos de ergosterol, gotas de aceite, acúmulos de glucógeno, etc. (1).

Un cultivo de Neurospora crece en forma filamentosa (hifas) cuyo conjunto forma el micelio. Las hifas tienen un diámetro aproximado de 5 micras y se encuentran segmentadas por paredes incompletas o septas. La mayor parte de las hifas tienen más de un núcleo por célula o segmento. (2).

Las células se encuentran aisladas del medio por una membrana compleja de doble capa y por la pared celular, principalmente compuesta por polímeros de glucosa, complejos péptido-polisacárido, quitina y galactosamina. (3).(4).

Las septas poseen un poro central de alrededor de 0.5 micras de diámetro, el cual permite el flujo del citoplasma y organelos a lo largo de las hifas y en dirección del crecimiento, el cual se realiza por elongación de sus extremos y los de sus ramificaciones. (5).

Los núcleos tienen una división más activa en la proximidad de las puntas y parece que los cromosomas permanecen en grupos comprimidos de siete durante su división, evitando la posible pérdida de alguno de ellos, en el rápido flujo del citoplasma.

Su nutrición es sencilla³ y como heterótrofo crece en una fuente de carbono, nitrógeno, sales inorgánicas y biotina. En nitrato de amonio como fuente de nitrógeno y sacarosa como fuente de carbono, crece óptimamente, con un tiempo de duplicación de 2.5 horas.

Neurospora crassa presenta dos ciclos vitales: uno sexual y otro vegetativo o asexual. Cuando Neurospora es crecida en medio sólido⁶, el micelio aéreo se diferencia en conidióforos, cuyos extremos se segmentan y dan lugar a macroconidias (7).

En la mayoría de los medios las macroconidias tienen de dos a tres núcleos por célula en promedio. Estas son usadas como inóculo de cultivos vegetativos y de fertilizantes masculinos en las cruas sexuales.

Existe también formación de microconidias, que

es posterior al de las macroconidias y sucede por un proceso diferente que no requiere la formación del conidióforo, pues se distribuyen a lo largo de las hifas.(8).

Las microconidias tienen una viabilidad pobre debido a que en su mayoría son mononucleadas.⁹

Neurospora es un organismo hermafrodita con dos tipos sexuales comunmente denominados A y a, cada uno capaz de producir gametos masculinos o femeninos,¹⁰ siendo necesaria la participación de ambos tipos sexuales en la formación del cigoto.

Las esporas resultantes de éste ciclo se conocen como ascosporas, las cuales están contenidas, en número de ocho, dentro de una vaina y son muy resistentes tanto a la desecación como al calor, teniendo largos períodos de vida latente.

Las ascosporas pueden ser artificialmente inducidas a germinar, ya sea con calor o por agentes químicos.

De cada ascospora se pueden obtener cultivos puros, con un solo tipo de núcleos (homocarióticos) lo que permite clonar a Neurospora.

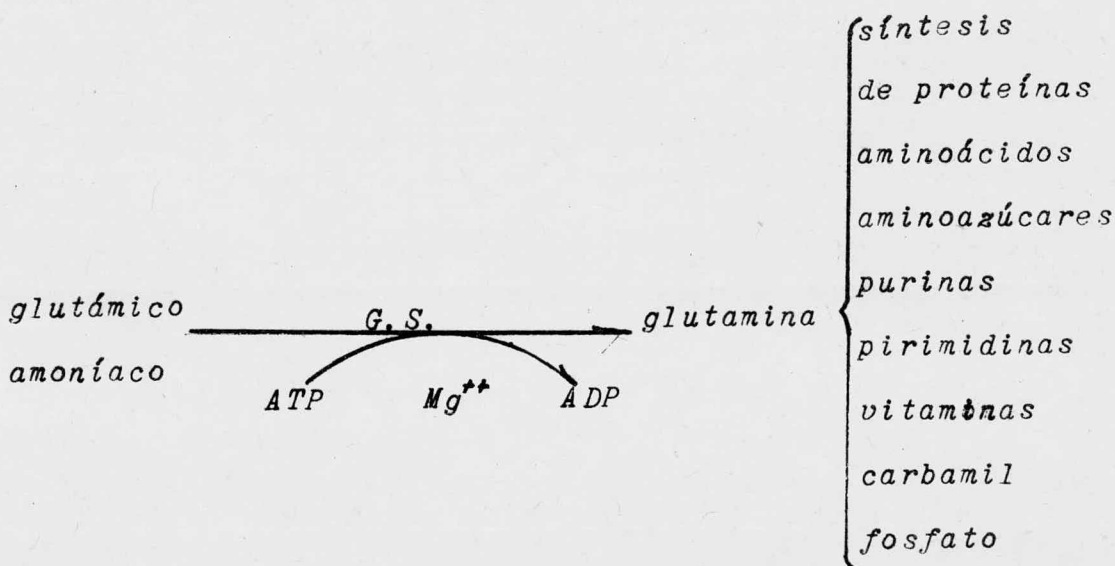
De lo expuesto anteriormente se deducen claras ventajas del empleo de éste hongo como modelo biológico, como son: a) su nutrición simple, b) ser haploide

c) su rápido crecimiento en cultivo, d) la sencillez de su morfología, e) la presencia de un ciclo sexual y f) la existencia de un gran número de mutantes bioquímicas y morfológicas.

El hongo Neurospora crassa resulta pues ser un modelo biológico adecuado para el estudio de la regulación del metabolismo nitrogenado.

La síntesis y distribución de glutamina pueden considerarse como la encrucijada del metabolismo nitrogenado, ya que el nitrógeno del medio se asimila como amoníaco y es transformado a glutamina.

Por otro lado, la glutamina puede considerarse como el donador universal de nitrógeno amino para la síntesis de muy diversos compuestos (fig.), siendo además su síntesis el lugar donde convergen los metabolismos hidrocarbonado y nitrogenado.



Debido a que la enzima glutamino sintetasa (G.S.) es la responsable de la síntesis de glutamina, debe tener un papel clave en la regulación del metabolismo nitrogenado.

En células de organismos procariotes, se conoce que la enzima en cuestión está sujeta a muy variados mecanismos regulatorios, como son:

a) Inhibición por los productos finales del metabolismo nitrogenado, como alanina, glicina, histidina, triptofano, carbamil fosfato, CTP, AMP, glucosamina 6-fosfato, etc. Esta inhibición es acumulativa por mezcla de éstos metabolitos.

b) Regulación de su actividad por un sistema de cascada que incluye proteínas adeniladoras y desadeniladoras, permitiendo un rápido control.

c) A nivel genético presenta un sistema de autorregulación del producto de transcripción. (36), (37), (38).

El papel de la enzima sobre el metabolismo es importante, pues es un modulador de operones catabólicos como el de la histidasa.

En células de mamífero, donde la glutamina también tiene un papel importante en la asimilación y distribución del nitrógeno, se conoce mucho menos acerca de la regulación de la glutamino sintetasa.

La glutamina de estos organismos se encuentra presente en cantidades elevadas en gran parte de los tejidos importantes como corazón, cerebro, hígado, riñón, etc. La glutamino sintetasa tiene una especial importancia en el sistema nervioso, donde se encuentra relacionada a la concentración de inhibidores y excitadores (glutámico: excitador, 2 gamma amino butírico: inhibidor), de la función simpática.

Otro papel importante de ésta enzima se presenta en el tejido renal, donde cumple una función de regulador del equilibrio ácido-base por el atrapamiento de amoníaco, lo que además ayuda a la detoxificación de otros tejidos.

La glutamino sintetasa de éstos eucariotes presenta una estructura de octámero (mamíferos, plantas, Neurospora) a diferencia del dodecámero de procariotes.

Un enfoque experimental para conocer la regulación del metabolismo nitrogenado, es el estudio de la regulación de la glutamino sintetasa, a través del aislamiento de mutantes estructurales y regulatorias de ésta enzima.

El aislamiento de éstas mutantes permitirá establecer lo siguiente:

A) Si sólo una enzima sintetiza toda la glutamina que requiere la célula.

B) Si cambios en la estructura resultan en una diferente regulación.

C) Si cambios regulatorios en la síntesis de glutamina afectan la regulación en la distribución de éste aminoácido y en el catabolismo nitrogenado.

D) Si existe una relación entre la regulación de la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno.

En ésta tesis se presentan los resultados del aislamiento y caracterización de una mutante que requiere glutamina para crecer.

El desarrollo de la bioquímica genética de hongos se encuentra en gran parte basado en el estudio de mutaciones en locus específicos. Sin ellas, la función de un gene así como la regulación a que se encuentra sometido, sería muy difícil de establecer. (23).

Aunque en teoría todas las características hereditarias son mutables, en Neurospora la recuperación de cepas con mutaciones viables en la mayoría de las funciones controladas por genes es muy baja (11), tan solo de un 5 a un 10% del total pueden ser compensadas por un requerimiento específico, adicionado al medio de cultivo.

Por otro lado, mutaciones en genes indispensables solo pueden ser obtenidas como letales condicionales.

Dentro de la mayoría de los procedimientos elaborados para el aislamiento de mutantes, se introducen

métodos para incrementar la frecuencia de mutación.

Como la gran parte de éstas mutantes inducidas alteran o suprimen parcial o totalmente el producto proteico codificado por un gene, éstas son recesivas al alelo silvestre. Siendo N. crassa un organismo haploide, ésta recesividad no es encubierta por el alelo dominante, como ocurre en células diploides.

Las mutaciones pueden ser clasificadas como microlesiones y macrolesiones. A la primera clase pertenecen alteraciones pequeñas en el ADN, que involucran solo un par de bases. Existen tres tipos principales de ésta clase:

a) *Mutaciones sin sentido (nonsense).* - Cuando el codón o triplete de bases resultante no codifica para la inserción de ningún aminoácido, provocando la terminación temprana de la traducción y dando como resultado un polipéptido incompleto.

b) *Mutaciones de sentido perdido (missense).* - En éste caso el codón resultante de la alteración de un par de bases, codifica para un aminoácido diferente, y aunque se traduce completa, la estructura final de la proteína se encuentra más o menos alterada, dependiendo del sitio en que se encuentre el aminoácido, y de su diferencia con respecto al original.

c) *Mutaciones por pérdida o adición de uno o más pares de bases (frameshift).* - Este tipo de mutaciones son polares, es decir, toda la secuencia de tripletes posterior a la mutación se encontrará alterada, dando

como resultado la formación de un polipéptido diferente al original.

El grado de alteración depende de que tan lejos del inicio de transcripción del gene se encuentra la lesión. Para que éste tipo de mutaciones sean polares, la pérdida o inserción de pares de bases no deberá ser de tres o de sus múltiplos.

A la segunda clase de mutaciones (macrolesiones), pertenecen las deleciones, que son pérdidas de varios pares de bases, o inclusive de uno o más genes. Estas mutaciones son por regla general irreversibles (excepto por una supresión intergénica). La deleción de dos o más genes consecutivos son frecuentemente letales para la célula. También a ésta clase pertenecen los rearranglos cromosomales tales como inversiones y translocaciones.

Las mutaciones pueden o no encontrarse asociadas a cambios morfológicos. Una mutante bioquímica afecta una capacidad en una reacción metabólica definida, la mutación impide la elaboración de algún metabolito o la degradación y/o asimilación de otro.

Las mutantes bioquímicas presentan por regla general, una morfología muy parecida a la de la cepa silvestre, cuando el requerimiento le es adicionado al medio en cantidad suficiente. Obtención de mutantes de éste tipo, es decir, que pasan del fenotipo silvestre

al mutado se conoce como mutación hacia adelante, por el contrario, una reversión o mutación hacia atrás es aquella que pasa del estado mutado al silvestre o a un fenotipo muy parecido.

Los distintos tipos de mutaciones mencionadas, ocurren espontáneamente, siendo un fenómeno general observado en todas las células; usualmente la frecuencia de mutación es muy baja, pudiéndose incrementar por el uso de agentes físicos o químicos.

El espectro mutacional varía conforme al mutágeno empleado, así, las mutaciones inducidas por rayos X, luz ultra violeta y las espontáneas, pertenecen a todos los tipos conocidos, enttando que los mutágenos químicos usualmente inducen mutaciones puntuales (21) (22). De éstos últimos la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) (17), es el más empleado, pues presenta las siguientes ventajas: es muy potente, actúa preferencialmente sobre el ADN en replicación, produce transiciones y transversiones y no produce mutaciones de corrimiento. Sin embargo, como principales desventajas, se ha encontrado que produce polimutaciones, puede alquilar el ADN por la formación de diazometano y es carcinógeno.

Material y Métodos

I) Cepas.

Todas las cepas utilizadas fueron obtenidas de "The Fungal Genetics Stock Center", Dartmouth College, Hanover, New Hampshire, 03755; y de la colección personal del Dr. Jaime Mora.

a) Cepas silvestres.

St. Lawrence.- St. 74-A y St. 73-a. (Crece en medio mínimo y son fértiles).

b) Cepas mutantes.

Cepa glm 1 (crece en medio mínimo más glutamina 200 microgramos/ml.)

Cepa trip 2 (crece en medio mínimo más triptofano 200 microgramos/ml.)

Cepa arg 5 (crece en medio mínimo más arginina 200 microgramos/ml.)

II) Medios de cultivo.

a) Medio mínimo de Vogel (13).

Solución 50 X:

A 750 ml. de agua añadir y disolver sucesivamente:

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	117.5 gr.
KH_2PO_4	250 gr.
NH_4NO_3	100 gr.
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 gr.
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5 gr.

reactivos traza.....5 ml.
biotina (50 ug/ml).....5 ml.
Ajustar a un volúmen final de 1000 ml. y añadir 5 ml.
de cloroformo.

Solución de reactivos traza.

A 95 ml. de agua , añadir y disolver sucesivamente:

ac. cítrico. $1H_2O$ 5 gr.
 $Zn SO_4 \cdot 7H_2O$ 5 gr.
 $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ 1 gr.
 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.25 gr.
 $MnSO_4 \cdot 1H_2O$ 0.05 gr.
 H_3BO_3 0.05 gr.
 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.05 gr.

Se ajusta el volúmen a 100 ml. más 1 ml. de cloroformo.

Solución de biotina.

0.005 gr. en 100 ml. de una solución al 50% etanol-agua.

b) Medio SN.

Es esencialmente el medio mínimo de Vogel, al cual no se le adiciona nitrato de amonio y el sulfato doble de fierro y amonio se sustituye por sulfato ferroso heptahidratado. La fuente de nitrógeno se agrega como aminoácidos * (200 ug/ml.), uridina* o adenina*. La fuente de carbono es sacarosa al 1.5% (p/v)-

(* éstos se agregan en solución esterilizada por filtración al medio ya estéril.)

c) Medios sólidos.

A los medios de Vogel o SN se les agrega agar al 1.5% (p/v) (Bacto agar "Difco Lab.").

d) Medio para selección de mutantes.

Se emplea para cuentas viables y para recolección de colonias (éste medio induce crecimiento colonial en Neurospora) (14).

Al medio de Vogel o SN se le sustituye la sacarosa por glucosa 0.05%, fructosa 0.05% sorbosa 1%, solidificando con 2% de agar. El medio autoclaveado se vierte a cajas de petri de plástico (estériles y desechables) poniendo 25 ml. de medio en cada una.

e) Medio de pruebas.

Se utiliza para pruebas de auxotrofia de cepas mutantes.

A los medios de Vogel o SN se les adiciona sacarosa al 0.4% y sorbosa al 0.8% (Sigma Chem. Co.) solidificando con agar al 1.5% (p/v) usando 25 ml. de medio por caja de petri.

f) Medio para cruces.

Se prepara rehidratando 17 gr. de Bacto Corn Meal Agar (Difco lab., 0114-05, Detroit, Michigan) con un litro de agua bidestilada, calentando a ebullición hasta disolver y se autoclavea por 15 min.

III) Obtención de esporas y determinación de viabilidad de la cepa St. 74-A.

Se inocularon esporas de la cepa 74-A en matraces de 250 ml. con: 50 ml. de medio mínimo con 1.5% de agar.

Los matraces se incuban a 29°C durante tres días y por dos días más a 25°C, con buena iluminación.

Las esporas se resuspendieron adicionando 50 ml. de agua bidestilada estéril a cada matraz, agitando para desprenderlas. La suspensión se filtró por una columna con fibra de vidrio y se calculó la concentración de conidias por ml., por cuenta directa, ajustándose a un millón de conidias /ml.

Se hicieron diluciones de la suspensión anterior y se platearon 100 esporas en cajas de medio mínimo Vogel-germinación, incubándose a 29°C por 48 horas. Se determinó el por ciento de viabilidad.

IV) Mutagénesis y control de sobrevivientes.

Para la mutagénesis se partió de esporas de cinco días de la cepa St. 74-A, suspendidas en una solución amortiguadora de fosfatos (0.67 M pH 7), ajustando la concentración de conidias a 21 millones/ml.

A 19 ml. de la suspensión anterior se les adiciona 1 ml. de una solución de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG, Sigma Chem Co.) con 200 ug/ml., esterilizada por filtración y se incubó a 25°C con agitación lenta y cada 10 min., por una hora, se tomaron alicuotas de 3 ml., se filtraron por membrana millipore (HA 0.45) y se lavaron con seis volúmenes de agua bidestilada.

El filtro con las esporas se resuspende en seis ml. de agua. Una alícuota de ésta suspensión se diluye y se platea en cajas de petri con medio Vogel-germinación. La cantidad de esporas fue de 200 por caja. Las cajas se incuban a 29°C durante 48 horas, al cabo de las cuales se cuenta el número de colonias y se selecciona el tiempo que resulta en 90% de sobrevivencia.

V) Selección de mutantes enriquecidas por filtraciones. (24)

La suspensión de esporas mutagenizadas se colocó en un matraz erlenmeyer de 500 ml., con 250 ml. de medio SN glutámico 5mM. La concentración final de esporas se llevó a 1 millón/ml. El matraz se incubó a 37°C, con agitación. Las filtraciones se realizan periódicamente, a un matraz erlenmeyer de 500 ml., con cuatro capas de gasa, en forma de bolsa, asegurada a la boca del matraz. (Todo el procedimiento se realiza en condiciones estériles).

La primera filtración se llevó a cabo a las 8 horas, efectuándose las siguientes en períodos de 2-4 horas durante un día, después del cual el intervalo se amplió de 6-12 horas.

Como el medio decreció en volúmen en el transcurso de las filtraciones, se adicionó la cantidad suficiente del mismo medio, para mantenerlo constante.

Los períodos entre filtraciones se escogen tomando en cuenta que cualquier crecimiento que se observe a simple vista, debe ser removido inmediatamente, pues deriva al medio de nutrientes y la conidia no germinada se pega a las hifas.

El procedimiento finaliza cuando no aparece más crecimiento después de que se ha agregado medio fresco, 72 horas después de la última filtración.

VI) Concentración y plateo de la población enriquecida de mutantes.

La población enriquecida se concentró por filtración a través de membrana (millipore 1.2 micras), lavándose con 100 ml. de agua bidestilada estéril y resuspendiendo en 5 ml.

Se calcula el número de esporas y se platan 0.1 ml. de la suspensión en cajas de petri con medio SN germinación-glutamina como única fuente de nitrógeno. Las cajas se incuban a 37°C hasta la aparición de colonias (de 18 a 24 horas).

VII) Aislamiento, crecimiento y prueba fenotípica de las posibles mutantes.

Cada colonia se aísla a un tubo de 13X75 mm. con 1.5 ml. de medio sólido, suplementado con 200ug/ml. de glutamina. Es indispensable aislar el mayor número

posible de colonias. Los tubos se incuban por tres días a 29 C y por dos días más a 25⁰ C, con iluminación. Se seleccionan todos aquellos tubos que esporulen.

La prueba fenotípica de las colonias se realiza en cajas de petri con los siguientes medios:

- a) Vogel (de prueba)
- b) Vogel glutámico 200ug/ml (de prueba)
- c) SN glutámico 200 ug/ml. (de prueba)
- d) SN glutamina 200 ug/ml. (de prueba)

Las cajas se incuban a 29 y 37⁰ C, y los resultados se reportan a las 48 horas, seleccionando las cepas con los fenotipos apropiados.

VIII) Cruzas y análisis de la progenie.

Esporas de la cepa 73-a se inoculan a tubos de 15 ml. conteniendo 5 ml. de medio Corn Meal Agar. Se incuban de 4 a 6 días a 25⁰ C en la obscuridad; al cabo de los cuales son fertilizados, esparciendoles esporas de las posibles cepas mutantes.

Los cultivos fertilizados se incuban a 25⁰ C en ausencia de luz.

- a) Análisis de la craza por aislamiento al azar.- (30)

Aproximadamente 10 días después de la fertilización, los tubos se exponen a la luz, y después de un día las ascosporas son expulsadas del peritecio.

La recolección de las ascosporas se hace introduciendo 5 ml. de agua bidestilada estéril al tubo,

desprendiéndolas con un aplicador de madera estéril, la suspensión así obtenida se centrifuga por 10 min. a 2000 r.p.m., descartándose el sobrenadante.

El paquete de ascosporas se coloca en un baño maría a 60°C por 30 min. y se resuspende en 5 ml. de agua destilada estéril, ajustando la concentración para tener 1000 ascosporas/ml. Se platean 0.1 ml. a cajas de medio SN glutamina-germinación, las cuales se incuban por 12 horas a 29°C.

Las colonias son aisladas a tubos de 13X75 mm., con 1.5 ml. de medio SN glutamina, e incubadas por 5 días.

La prueba se realiza en los mismos medios en que se analizó el fenotipo de las cepas mutantes, a ambas temperaturas.

b) *Disección de ascus.* - (31)

Nueve días después de que los tubos fueron fertilizados con esporas de las cepas mutantes, se tomó un peritecio con una aguja de disección, colocándolo sobre un rectángulo de agar duro al 7%. Bajo disección microscópica el peritecio se explota con unas micropinzas, liberando a las ascosporas.

Se adiciona una gota de agua al racimo de ascosporas, sustrayendo cada ascus con una aguja pyrex. Cada ascospora se aísla a un tubo(tomando en cuenta el or-

den) del medio apropiado de incubando hasta esporulación.

c) Complementación en medio líquido.^{32 33.}

Esporas de cinco días de las dos cepas por complementar, se resuspenden en medio mínimo de Vogel y se ajusta la concentración a 10 millones/ml.; ambas suspensiones se inoculan a un tubo con el mismo medio (de 13X100 con 2 ml. de medio), variando las concentraciones de una con respecto a la otra, pero siempre quedando con una concentración final de 2 millones/ml., inoculando además tubos con una sola suspensión de esporas. Estos últimos son utilizados como control negativo de crecimiento.

Los tubos son incubados a 29°C en reposo, durante las primeras 48 horas, agitando suavemente cada 24 horas, para evitar la esporulación de las condiciones donde aparezca crecimiento.

Se dice que hay complementación cuando después de cinco días se observa buen crecimiento.

IX) Crecimiento en medio líquido.^{25.}

Se preparan ocho matraces de florecia, cada uno con 400 ml. de medio SN y sacarosa al 1.5%, agregando glutámico 5 mM a cuatro de ellos, y glutamina 5mM a los otros cuatro. Se inoculan con una suspensión de esporas a una densidad óptica de 0.04 a 540 nm. de longitud de onda. (Colorímetro "Baush and Lomb", celdillas de 1.5 X 10 cm.)

Los matraces son agitados y oxigenados por medio de aire húmedo estéril.

La curva de crecimiento se elaboró de la siguiente manera: se tomaron alícuotas de cada matraz, se filtraron por membrana (millipore HA 0.45 micras) y se lavaron con dos volúmenes de agua destilada. La proteína se precipitó agregando 2 ml. de ácido tricloroacético (5%) a cada muestra, centrifugando a 2000 r.p.m. durante 10 min.; el precipitado se resuspendió en sosa 1N y se tomaron alícuotas para medir la proteína por el método de Lowry (26), elaborándose curvas de concentración de proteína contra tiempo.

X) Determinación de glutámico y glutamina.

Se inocula 1 lt. de medio mínimo de Vogel, con 1.5% de sacarosa, con una solución de esporas de 0.06 de densidad óptica, medida a 540 m μ de longitud de onda.

Las esporas fueron incubadas a 25°C durante 12 horas, con agitación por burbujeo.

A éste tiempo se filtró por millipore (1.2 micras), una alícuota de 300 ml., lavándose con 400 ml. de agua destilada. La extracción y separación del glutámico y la glutamina se realizó por el método montado por G. Vaca (G. Vaca y J. Mora, en preparación, 1976); los aminoácidos separados se cuantificaron por el método de la ninhidrina. (27) (28).

XI) Medición de la actividad de glutamino sintetasa.²⁹

Se inoculó un litro de medio SN glutamina sacarosa con esporas de cinco días, incubándolos durante 12 horas a 37 C, con buen burbujeo. Al finalizar éste tiempo, se filtró por papel Watman, adicionando la cantidad mínima de acetona (4°C) para deshidratar el micelio. Los polvos de acetona se muelen en mortero, agregando trozos de hielo seco hasta obtener un polvo fino. Por cada gramo se adicionan 12 ml. de buffer de extracción ($K_2HPO_4 - 5 \times 10^{-3} M$, $EDTA - 5 \times 10^{-4} M$, $K_2SO_4 - 5 \times 10^{-2} M$) y se homogeniza por 10 min.. El homogenado se centrifuga a 10 000 r.p.m. durante 15 min., a 4°C, el sobrenadante es dializado por una columna de sefadex G-25. El extracto dializado es utilizado como fuente de enzima.

La mezcla de reacción para medir la actividad de transferasa, contiene: ADP- 1.5mM, glutamina-90mM, $MnCl_2$ - 4.5mM, arsenato de sodio- 35mM, NH_2OH - 17,5mM, buffer tris acetato- 0.4 M., extracto- 0.3 ml. Se colocan 0.85 ml. de la mezcla en tubos de 13 x 75 mm., se preincuban a 30°C durante 10 min.

La mezcla de reacción para medir la actividad de sintetasa es la siguiente: ATP- 36mM, glutámico-150mM, $MgSO_4$ - 820 mM, buffer imidazol (0.34 gr/lit), $EDTA - 9.1 \times 10^{-3} M$. Las soluciones de ATP y glutámico deben estar ajustadas a pH 7.2.

Las reacciones de medición enzimática se inician por la adición de 0.15 ml. (extracto dializado) para transferasa y 0.2 ml. para sintetasa, y se para a los 5 min., agregando 0.5 ml. de cloruro férrico (25 gr. TCA, 8 gr. $FeCl_2$ aforados a 250 ml. con HCl 0.5 N), que además precipita las proteínas. Los tubos se centrifugan por 30 min. a 2000 r.p.m., midiéndose su densidad óptica a 500nm de longitud de onda.

Se determina la cantidad de proteína presente en el extracto por el método de Lowry, calculándose la actividad específica como μM de gamma-glutamil-hidroxamato/min./mg. de proteína.

Resultados

La viabilidad de las esporas de la cepa 74-A, plateadas en medio mínimo germinación se encuentran en la tabla 1. Es el promedio de tres experimentos realizados por separado.

Se observa que el porcentaje de esporas germinadas es elevado, contándose así con el material adecuado para realizar el experimento de mutagénesis.

El control de sobrevivientes al tratamiento mutagénico se midió como el decremento en el número de colonias, después de la mutagénesis.

El mutágeno NTG, a una concentración de 10 microgramos por mililitro, a 25°C y con agitación lenta, disminuye la viabilidad con el tiempo. (Tabla 2).

De acuerdo con la tabla 2, se seleccionó 30 min. de tratamiento con el mutágeno. Después de mutagenizar la población de esporas, se sometió a un enriquecimiento por filtraciones, plateándose la población de esporas enriquecidas en cajas de SN germinación glutamina, aislandose 640 colonias, de las cuáles solo crecieron y esporularon en tubo con medio sólido (SN glutamina), 441.

Estas colonias se probaron en cajas con medio de prueba SN, en presencia de las siguientes fuentes de

nitrógeno: amoníaco, glutámico, glutámico-amoníaco y glutamina, por duplicado a 29 y 37° C. Los resultados se presentan en la tabla 3, a las 48 horas de incubación.

Las cepas incluídas en los medios de prueba, como control, fueron: la silvestre St. 74-A y la auxótrofa de glutamina glm⁻¹. Un hallazgo fué que ésta última crece en glutámico a 37° C.

De todas las cepas probadas solamente una demostró ser totalmente dependiente de glutamina para crecer, a ambas temperaturas, lo que la diferencia de la cepa glm⁻¹.

Las cepas GDH-D⁻ encontradas, probablemente tienen una mutación que les impide catabolizar glutámico, no produciendo el amoníaco necesario para sintetizar glutamina.

Las glm⁻ parciales, son posibles cepas poli mutadas, cuya dependencia de glutamina no es total.

Tanto las AM-1, como las silvestres, son cepas que escaparon al método de enriquecimiento, sobreviviendo hasta el plateo final, donde fueron recuperadas.

La cepa glm⁻ total se denominó glm 2 y se cruzó por la cepa silvestre St 73-a (isogénica con la St 74-A excepto en el tipo de conjugación), para purificar solo aquella mutación de la que depende el requerimiento por glutamina. Además, se buscó con ésta cruce mejorar el

crecimiento y la esporulación, ya que ésta cepa esporula mal y tiene una morfología diferente a la silvestre.

La cruce de la cepa mutante por la silvestre permite también conocer el número de loci que participan en el requerimiento por glutamina.

Los resultados obtenidos de ésta cruce son los siguientes: de 100 colonias analizadas 48 fueron silvestres y 52 requieren glutamina, lo que indica que la mutación glm 2 es monogénica mendeliana. De ésta cruce se seleccionó una cepa glm2, con características de esporulación y morfología semejantes a las de la cepa silvestre.

También la cruce en cuestión se analizó por disecación de ascus, lo que permite establecer de manera definitiva una segregación monogénica. En la tabla 4 se muestra el resultado obtenido.

Como se observa en la tabla, el porcentaje, tanto de cepas silvestres como de cepas que requieren glutamina, es del 50%.

Se analizó también por cruce, el alelismo de ésta nueva mutación en relación a otra cepa que requiere glutamina (glm⁻¹).

Para esto la cepa glm⁻¹ se usó como receptora y la glm⁻² como donadora, siendo el porcentaje de germinación de 92%.

En las cajas de medio mínimo, de 5000 ascosporas

plateadas, no apareció ninguna colonia recombinante (silvestre) en 4 días de incubación, solamente al quinto día de observación, se vió una colonia.

Se estudió también la dominancia y recesividad de la nueva mutación en un experimento de complementación forzada, por medio de la formación de un heterocarión, para esto se obtuvo por cruce la doble mutante trip2 glm2 y se determinó si complementaba o no con la cepa arg5.

La complementación se llevó a cabo en tubos de 13X100 con 2 ml. de medio mínimo de Vogel, con y sin glutamina. Los resultados se reportan en la tabla 5.

Como se observa en la tabla, la mutación glm2 es claramente recesiva frente al alelo silvestre, en el heterocarión.

El crecimiento en medio líquido de ésta mutante, en dos fuentes de nitrógeno (glutamina y glutámico), a 25 y 37°C, se muestra en la figura 1, comparados con el de la cepa St 74-A.

Como se observa en la figura, la cepa glm2 solo es capaz de crecer cuando el medio contiene glutamina, en el caso de glutámico como fuente de nitrógeno, la mutante solamente germina, a diferencia de la cepa 74-A que sí crece.

Los resultados de la medición de glutámico y glutamina de la cepa glm2, incubada por 12 horas en medio

mínimo a 25°C y comparados con la cepa prol₃, se muestran en la tabla 6.

La actividad de la enzima glutamino sintetasa, medida tanto por la reacción de sintetasa como por la de transferasa de la mutante glm₂, se muestran en la tabla 7, comparadas con la actividad de la enzima de la cepa silvestre en la misma condición.

Discusión

El procedimiento reportado para seleccionar mutantes que requieran glutamina para crecer, da un bajo rendimiento de éstas (tabla #3), a pesar de que el mutágeno empleado incrementa el número de cepas mutantes (tablas #2 y #3).

La aparición de cepas silvestres que no se eliminan al enriquecer por filtraciones, se puede deber a la presencia de esporas que tardan mucho en germinar en el medio seleccionado para el enriquecimiento, o a que éstas necesitan formar micelio más o menos largo para ser eliminadas por la gasa.

Por otro lado no se puede prolongar más el procedimiento debido a que aumenta la posibilidad de contaminación. Esto sugiere la necesidad de usar un método de enriquecimiento más efectivo, que elimine aún a la población de esporas silvestres no germinadas.

El método que se juzga más adecuado para cumplir el objetivo anterior, es el de matar selectivamente con nistatina o deprivando de inositol las conidias que intenten germinar.

La nistatina, un antibiótico polienico que rompe la organización de la membrana celular produce la muerte por choque osmótico.

La deprivación de inositol se logra al usar una cepa

incapaz de sintetizar este compuesto. Cuando conidias de esta cepa intentan crecer en un medio sin inositol, mueren debido a que requieren este compuesto para sintetizar membrana. Una segunda mutación en esta cepa, que interfiera con la síntesis de macromoléculas previene la muerte de estas conidias, lo que resulta en un enriquecimiento de esta población.

Unido a los procedimientos anteriores debe usarse además cepas microconidiantes¹² que por tener un sólo núcleo, no existe la posibilidad de que se enmascaren mutaciones recesivas.¹⁵

Se ha montado en el laboratorio un procedimiento con las recomendaciones anteriores, que permite aumentar el número de mutantes auxotrofas de glutamina.

El medio de selección usado permite también seleccionar mutantes de deshidrogenasa glutámica, éstas tampoco crecen en glutámico debido a que no pueden formar el amonio para sintetizar glutamina, sin embargo éstas pueden identificarse fácilmente debido a que crecen en glutámico más amoniaco.

La temperatura de selección de 37°C, escogida por la posibilidad de recuperar mutantes termosensibles,^{16,18,19} no reportó ninguna cepa con estas características. Sin embargo, dada la importancia de la obtención de una cepa de este tipo, se continuará con el enriquecimiento a 37°C.

La cruce de la cepa mutante con la silvestre, demostró ser una manera eficiente de "limpiar" a la cepa de mutaciones no involucradas en el fenotipo buscado, además de determinar que se trataba de una mutante monogénica. (tabla#4).

La recesividad de la mutación se determina a través de complementar la doble mutante glm_trip_2 con la cepa arg_5 (tabla #5). La dependencia absoluta por glutamina de la mutante (fig. 1), es el resultado de un bloqueo en la síntesis de éste aminoácido, como lo demuestra la acumulación de glutámico y la ausencia de glutamina en conidias incubadas en medio mínimo. (tabla#6)

Por último la baja actividad de sintetasa de la G.S. en esta mutante (tabla#7), comparada con la cepa silvestre, demuestra de manera definitiva que la mutación encontrada es responsable del requerimiento por glutamina para crecer, debido a una disminución en la actividad de glutamino sintetasa.

La purificación de la G.S. de la cepa glm_2 , se llevó a cabo por un método basado en cromatografía de afinidad. (35)

El estado oligomérico de la enzima, en un gradiente de sacarosa, fue de un tetrámero en tanto que el de la silvestre es de octámero.

La caracterización inmunológica con anticuerpos preparados contra la G.S. de la cepa silvestre, demuestra

una disminución en la actividad por molécula de la enzima. (34).

El aislamiento de ésta nueva mutante permite, por otro lado, la generalización de una serie de datos, probados hasta hace poco con la mutante glm_1 ya existente. Datos que proponen un efecto pleyotrópico de ésta enzima sobre la regulación del metabolismo nitrogenado (J. Mora, G. Espín, en preparación, 1976) con un posible papel central en éste y como punto de unión con el metabolismo de la fuente de carbono.

Bibliografía

1. - A. J. Shatkin and E. L. Tatum; *Amer. J. Botany* 32, 678 (1945).
2. - A. N. Namboodiri and R. J. Lowry; *Amer. J. Botany* 54, 735 (1967).
3. - P. R. Mahadevan and E. L. Tatum; *J. Bacteriol.* 90, 1073 (1975).
4. - F. M. Harold; *Biochem. Biophys. Acta* 57, 59 (1962).
5. - F. J. Ryan, G. W. Beadle and E. L. Tatum; *Amer. J. Botany* 36, 784 (1943).
6. - M. Zalokar; *Amer. J. Botany* 46, 602 (1959).
7. - C. Hubshman; *Mycology* 44, 599 (1953).
8. - R. J. Lowry, F. L. Dunkee and A. S. Sussman; *J. Bacteriol.* 94, 1057 (1967).
9. - M. W. Barrat and G. Arnst; *Genetics* 34, 351 (1949).
10. - M. Westgaard and H. Mitchell; *Amer. J. Botany* 34, 573 (1947).
11. - K. C. Atwood and F. Mukai; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 39, 1027 (1953).
12. - J. R. Bayliss and A. G. Debusk; *Neurospora Newsletter* 7, 7 (1965).
13. - H. Vogel; *Microbiol. Genet. Bull.* 13, 42 (1956).
14. - E. L. Tatum, R. W. Barrat and U. M. Culter; *Science* 109, 509 (1949).
15. - G. Beadle, W. Tatum; *Amer. J. Botany* 32, 678 (1945).
16. - J. L. Sullivan and K. G. Debusk; *Neurospora Newsletter* 18, 13 (1971).
17. - F. Westrun and N. Vigfussan; *Neurospora Newsletter* 20, 35 (1973).
18. - N. Horowitz; *Neurospora Newsletter* 3, 5 (1963).
19. - B. Kilbey; *Neurospora Newsletter* 6, 18 (1964).
20. - A. Lacy; *Neurospora Newsletter* 6, 19 (1964).
21. - W. Kligmuller and F. Kavderwitz; *Neurospora Newsletter* 7, 18 (1965).
22. - E. Tatum, R. Barrat, R. Fries, D. Borner; *Amer. J. Botany* 37, 38 (1951).
23. - A. De Leo, K. Magasanik; *J. Bact.* 121, 313 (1975).
24. - M. Case; *Neurospora Newsletter* 3, 8 (1963).
25. - H. Colvin, K. Munkers; *Neurospora Newsletter* 20, 31 (1973).

26. -D. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr, R. Randall; *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
27. -E. Yemm and E. Cocking; *Analyst* 80 209 (1955).
28. - A. Ferguson and A. Sims; *J. of Gen. Microbiol.* 80, 159 (1974).
29. -M. Kapoor and D. Bray; *Biochem .7,* 583 (1968).
30. -V. Prakash; *Neurospora Newsletter* 3,10 (1963).
31. -V. Prakash; *Neurospora Newsletter* 3,11 (1963).
32. - De Serres, E. ; *Neurospora Newsletter* 1 (1962).
33. - Catchside, D.G. *Neurospora Newsletter* 6,17 (1964).
34. - Kapoor, M and Bray, D. ; *Neurospora Newsletter* 14,23(1969).
35. -R. Palacios, (in press); *J. Biol. Chem.* (1976).

Tabla 1

Viabilidad de las esporas de la cepa 74-A

Nº de esporas/caja	Nº colonias/caja*	% viabilidad
200	178	89
200	182	91
200	184	92
	promedio	90.6

* Los resultados se tomaron a las 36 horas de incubación a 29° C.

Tabla 2

Efecto de NTG sobre la viabilidad de las esporas

Tiempo (min.)	% sobrevivientes*
0	100
10	96
20	93
30	88
40	84
50	79
60	72

* Se tomó como 100% la viabilidad de las esporas no mutagenizadas.

Tabla 3

Fenotipo y clasificación de las colonias
aisladas

Nº de colonias	Medio+				Clasificación
	NH ₄	glu	glu-NH ₄	gln	
412	(+)	(+)	(+)	(+)	silvestre
9	(g)	(g)	(g)	(±)	glm ⁻ parciales
9	(g)	(g)	(g)	(g)	desconocida
5	(g)	(+)	(+)	(+)	<u>AM-1</u>
5	(+)	(g)	(+)	(+)	posibles GDH-D †
1	(ng)	(ng)	(ng)	(+)	glm ⁻ (<u>glm 2</u>)

+ clave:

(ng)- no germina

(g)- germina

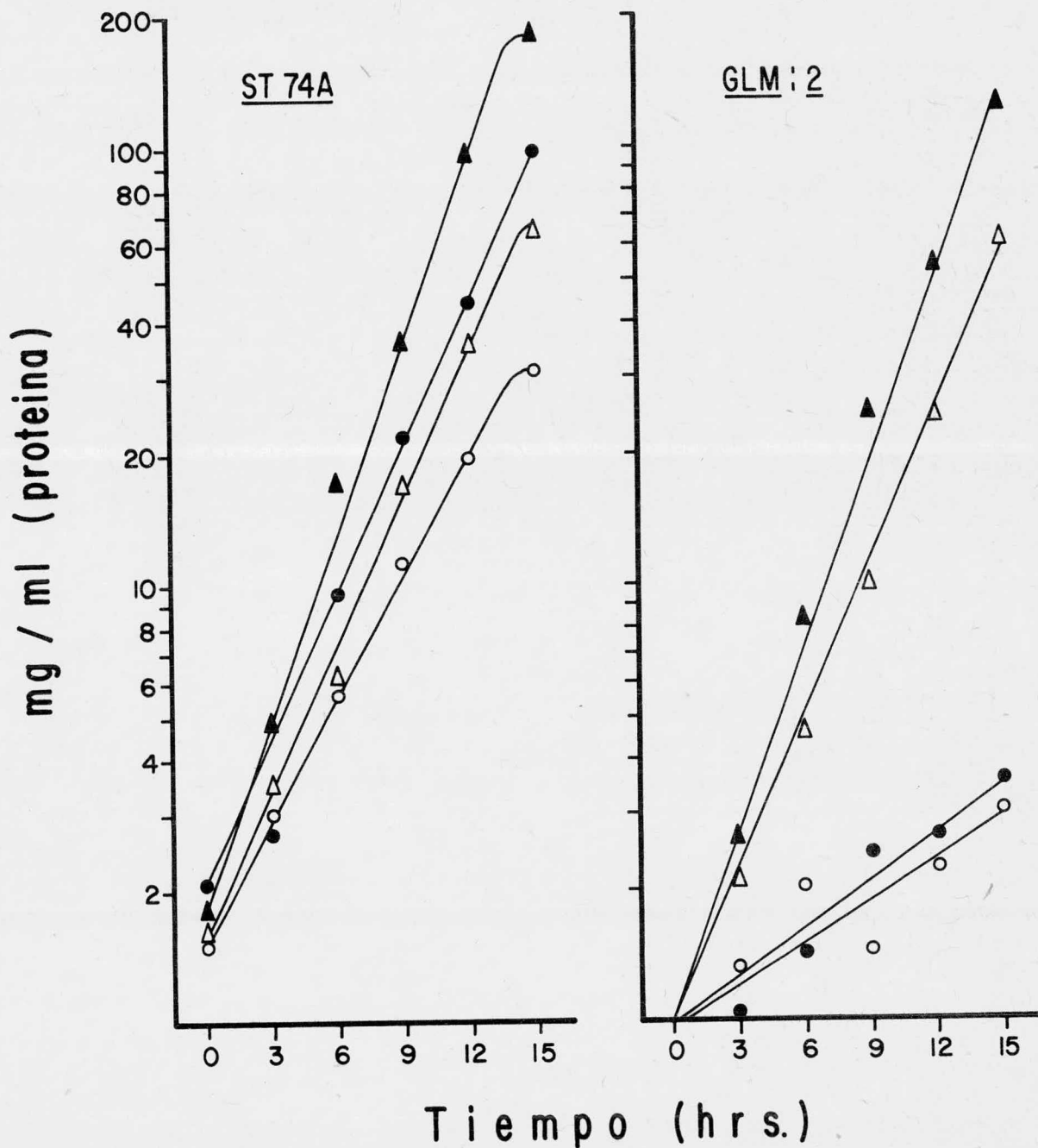
(±)- crecimiento pobre

(+)- crece bien

Los fenotipos obtenidos fueron similares a 29 y

37°C.

CRECIMIENTO EN LIQUIDO DE LAS CEPAS GLM:2 Y 74A



CONDICION : ○ GLUTAMICO 25° C, ● GLUTAMICO 37° C, △ GLUTAMINA 25° C, ▲ GLUTAMINA 37° C.

Tabla 4

Análisis de la cruce 73a por glm 2 por disección
de ascus

No ascus analizados	No ascosporas	No silvestres	No <u>glm 2</u>
2	16	8	8

Tabla 5

Complementación forzada en medio líquido entre
la doble mutante trip2glm2 y la cepa arg5

Medio Tubo	Mínimo					Mínimo gln 200				
	1	2	3	4	5	I	II	III	IV	V
+ ml. <u>trip2glm2</u>	0.5	0.35	0.25	0.15	0.0	0.5	0.35	0.25	0.15	0.0
+ ml. <u>arg.5</u>	0.0	0.15	0.25	0.35	0.5	0.0	0.15	0.25	0.35	0.5
± crecimiento	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)

+ La suspensión ajustada a una concentración de 10 millones/ml.

* A 48 horas de incubación a 29° C.

Tabla 6

Pozas de glutámico y glutamina en las cepas glm2 y pro13

Cepa	<u>glm2</u>		<u>pro13</u> *	
Pbza	glu	gln	glu	gln
mM/mg prot.	2.29	0.08	0.17	0.37

+Obtenidos a las 12 hrs. de incubación en medio mínimo

*Datos proporcionados por la bióloga G. Espín

Tabla 7

Actividad de glutamino sintetasa⁺

Cepa	Actividad específica transferasa ⁺	Actividad esp. sintetasa ⁺	S/T
<u>glm2</u>	0.12	0.009	0.072
<u>74-A</u>	0.40	0.081	0.25

+Tomada de cultivos de 12 hrs. a 37°C en gln 5 mM

*Como unidades de enzima/mg. de proteína