



3
24

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO.**

**Unidad Académica de los Ciclos
Profesional y de Posgrado del C.C.H.
Instituto de Fisiología Celular.**

**Regulación del catabolismo de
compuestos nitrogenados en
Saccharomyces cerevisiae.**

**DONADO POR D. G. B. - B. C.
TESIS**

que para obtener el grado de

**Licenciado en Investigación Biomédica
Básica**

presenta

CLAUDIA ANDREA SEGAL KISCHINEVZKY

México, D.F. , 1991.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

CONTENIDO.

INTRODUCCION	1
1.1 Importancia de la asimilación del nitrógeno.	1
1.2 Regulación de circuitos regulatorios.	1
1.3 Represión catabólica nitrogenada: control general.	3
1.4 Control específico.	9
a) Catabolismo de purinas	9
b) Catabolismo de prolina.	12
c) Catabolismo de arginina.	14
d) Catabolismo de ácido glutámico.	16
OBJETIVO	18
MATERIAL Y METODOS	19
Cepas:	19
Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	19
Mutagénesis	20
Determinación de actividades enzimáticas	21
Obtención de extractos crudos	21
Determinación de actividad específica de alan- toinasa.	21
Determinación de actividad específica de GDH-NAD.	22
Determinación de actividad específica de glutamino sintetasa.	23

Determinación de pozas intracelulares de glicina:	24
Determinación de proteína:	6
RESULTADOS Y DISCUSION.	25
1. La glicina impide la utilización de algunos compuestos nitrogenados, tanto primarios como secundarios.	25
2. En presencia de glicina disminuye la actividad de algunas enzimas catabólicas.	31
2.1 Glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD.	31
2.2 Alantoinasa	36
3. Pozas intracelulares de glicina.	39
4. Obtención de mutantes.	39
4.1. Selección de mutantes en SN Glu-Gli y SN Arg-Gli: La G2 y la 12G.	41
4.2. Selección de mutantes en SN Alantoína + Glicina.	43
4.2.1 Serie AL, Clase I.	44
4.2.2. Serie AL. Clase II.	48
4.2.3. Serie AL. Clase III.	52
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.	56
BIBLIOGRAFIA	67

INTRODUCCION

1.1 Importancia de la asimilación del nitrógeno.

El nitrógeno es un elemento clave presente en muchos metabolitos y virtualmente en todas las macromoléculas que forman una célula viva. Ciertos metabolitos, particularmente el amonio, el ácido glutámico y la glutamina, constituyen excelentes fuentes de nitrógeno; sin embargo, los microorganismos eucariotes son capaces de utilizar como fuentes de nitrógeno a una gran variedad de fuentes secundarias, en caso de limitación de las fuentes primarias: nitratos, nitritos, proteínas, péptidos, varios aminoácidos, urea, purinas, etc. La utilización de estas fuentes de nitrógeno secundarias, implica la síntesis *de novo* de las enzimas catabólicas involucradas en la obtención de nitrógeno a partir de estos metabolitos. El uso de estos compuestos conduce a la síntesis de ácido glutámico y glutamina, intermediarios metabólicos que distribuyen su nitrógeno en la síntesis de aminoácidos, aminoazúcares, vitaminas, purinas y pirimidinas, compuestos que a su vez participan en la síntesis de macromoléculas. Esto implica un circuito regulatorio muy sofisticado, que comprende la existencia de genes reguladores generales y específicos, además de metabolitos inductores y represores (7, 24).

1.2 Regulación de circuitos regulatorios.

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

este circuito están sujetas a dos tipos de control: Inducción y represión catabólica nitrogenada. El primer mecanismo previene la expresión de la vía en presencia de amonio o de alguno de los productos de su metabolismo (29), operando a través de inductores y genes específicos, mientras que la represión catabólica nitrogenada constituye un sistema de regulación general que regula la expresión de muchas de las enzimas que participan en el circuito regulatorio nitrogenado.

El modelo del operón propuesto para organismos procaríotes, plantea la regulación simultánea de genes contiguos por un mismo efector (18). Cada unidad así regulada se denomina operón y está constituida por un sitio promotor, un sitio operador, genes estructurales y un gene regulador. Jacob y Monod reportaron el modelo del operón de lactosa para *Escherichia coli*, operón que determina la producción de β -galactosidasa, la enzima responsable de la degradación de la lactosa, encontrando que esta actividad sólo se detecta cuando esta bacteria se cultiva en presencia de lactosa, que es el inductor de la vía. A partir de la cepa silvestre, aislaron diferentes mutantes que permitieron establecer un modelo de regulación.

Desde entonces, el establecimiento de circuitos regulatorios se ha logrado gracias a la identificación de mutantes regulatorias y al estudio de sus interacciones.

El estudio de los genes regulatorios que forman parte del circuito catabólico nitrogenado en microorganismos eucariotes, ha sido llevado a cabo

fundamentalmente en tres sistemas: *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* y *Saccharomyces cerevisiae*.

1.3 Represión catabólica nitrogenada: control general.

La utilización de fuentes de nitrógeno secundarias es regulada por inducción. En presencia de una fuente de nitrógeno pobre, la síntesis de las enzimas catabólicas apropiadas es inducida; sin embargo, si simultáneamente se ofrece una buena fuente de nitrógeno, la inducción es reprimida; este fenómeno se conoce como represión catabólica nitrogenada y es una manifestación del uso selectivo de fuentes de nitrógeno de alta calidad (40).

Muchas de las enzimas de la vía de degradación de purinas, de prolina, de arginina y de algunas otras enzimas del metabolismo de *S. cerevisiae*, *N. crassa* y *A. nidulans*, así como la nitrato reductasa de estos dos últimos, están sujetas a represión catabólica nitrogenada (7).

En *Aspergillus nidulans*, ha sido identificado un gene, *areA*, cuyo producto es una proteína que es capaz de regular la síntesis de varias enzimas del metabolismo nitrogenado (1). Mutaciones en este gene, llamadas *areA^r*, resultan en la incapacidad de utilizar varias fuentes de nitrógeno: aminoácidos, purinas, amidas, nitratos y nitritos; sin embargo, su crecimiento en amonio no se ve afectado; este tipo de mutantes se deben a la presencia de mutaciones sin sentido o translocaciones dentro del gene (2). Otras mutaciones en *areA*, llamadas *areA^d*, son capaces de

desreprimir una o más actividades del circuito nitrogenado, como la nitrato reductasa, la xantino deshidrogenasa y algunas permeasas, pero sin afectar su inducibilidad, lo que demuestra que *areA* sólo está involucrado en la regulación de la represión catabólica.

Las diferentes mutaciones en *areA* presentan una gran variedad de fenotipos (14): mutantes *areA^f* son sensibles a temperatura en algunas fuentes nitrogenadas pero no en otras, mutantes *areA^d* pueden ser desreprimidas en ciertas actividades reprimibles por amonio, pero seguir siendo reprimibles en otras, e incluso tener niveles anormalmente bajos en otras. Cada mutante *areA^d* tiene su propio fenotipo altamente específico. La incapacidad de las cepas *areA^f* para utilizar la mayoría de las fuentes nitrogenadas es paralela a las bajas actividades enzimáticas.

Por otro lado, las mutaciones en *areA^f* no interfieren en la reparación de auxotrofías en dobles mutantes. Así, aunque estas mutantes previenen la utilización de arginina, ornitina y L--amino-*n*-butirato como fuentes de nitrógeno, no previenen el metabolismo de estos compuestos necesario para complementar las auxotrofías por prolina e isoleucina en dobles mutantes. Tampoco se ve afectada la utilización de acetamida y algunos aminoácidos como fuentes de carbono (38).

Esta heterogeneidad de fenotipos sugiere que este locus codifica para un elemento involucrado directamente en la represión por amonio, indicando que el producto de *areA* regula directamente la expresión

genética, y que los sitios receptores de los genes bajo su control son estructuralmente diferentes.

El gene *nit-2* de *Neurospora crassa* (27), constituye el principal gene regulatorio del circuito nitrogenado de este hongo. Bajo condiciones limitantes de nitrógeno, es capaz de activar la expresión de genes estructurales que codifican enzimas catabólicas específicas (nitrito reductasa, enzimas de la vía de degradación de purinas y aminoácidos, proteasa extracelular, L-aminoácido oxidasa) (40). Todas las mutantes *nit-2* que han sido aisladas tienen fenotipo nulo, es decir, tienen una deficiencia, o han perdido completamente, la capacidad de inducir enzimas sujetas a represión catabólica nitrogenada. Esto implica que el producto del gene *nit-2* actúa de manera positiva y se requiere para la expresión de varios de los genes del circuito de control nitrogenado.

Las primeras mutantes *nit-2* fueron aisladas por su incapacidad de utilizar nitrato y nitrito como únicas fuentes de nitrógeno. Más tarde, se aislaron nuevas mutantes *nit-2* por su incapacidad de utilizar purinas, lo que indicaba que el producto del gene *nit-2* tenía un papel más general en el metabolismo del nitrógeno. Ahora ya es claro que *nit-2* es el principal gene regulatorio en el circuito nitrogenado y juega un papel central en la expresión de muchas de las diferentes enzimas de vías metabólicas nitrogenadas diversas (30).

Se han propuesto algunos modelos (27) que buscan explicar el papel del producto del gene *nit-2* en la represión catabólica nitrogenada (FIG.1). En uno de

ellos, se sugiere que el gene *nit-2* es expresado constitutivamente produciendo una proteína cuya actividad es inhibida por la unión de glutamina, que, aparentemente, es el metabolito represor. Otra alternativa, es que la expresión del gene *nit-2* esté regulada de dos posibles maneras:

a) Se ha encontrado un segundo gene, *nmr-1*, que se activa en presencia de glutamina, que parece codificar una proteína represora que se une a un sitio adyacente al gene *nit-2*, previniendo su expresión.

b) En presencia de glutamina, la glutamino sintetasa sufre un cambio en su estructura oligomérica, que la lleva a actuar como proteína represora, uniéndose a *nit-2* y previniendo su expresión.

El gene *areA* de *A. nidulans* y el gene *nit-2* de *N. crassa* parecen ser homólogos: ambos codifican proteínas con un dominio de "dedos de zinc" muy similar (28). De hecho, Davis y Hynes (12), transformaron mutantes *areA* con el gene *nit-2* y encontraron que este puede sustituir perfectamente la función de *areA* en todas las mutantes que examinaron: Una vez transformadas con el gene *nit-2* de *Neurospora*, las cepas mutantes en *areA* recuperaron la capacidad de crecer en acetamida, nitrato y ácido úrico, expresando las enzimas involucradas al mismo nivel que una cepa silvestre de *A. nidulans*.

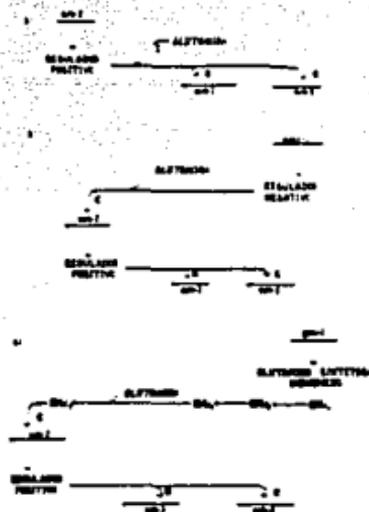


FIG.1. Modelos de regulación nitrogenada en Neurospora. En los tres modelos, el gene *nit-2* codifica una proteína de regulación positiva. a) *nit-2* es expresado constitutivamente y su producto actúa activando los genes de las enzimas necesarias, a menos que haya suficiente glutamina presente que inactive a la proteína reguladora. b) La expresión del gene *nmr-1* produce un represor que, en presencia de glutamina, previene la expresión del gene *nit-2*. c) La glutamino sintetasa, en presencia de glutamina, adopta una forma multimérica que reprime la expresión del gene *nit-2*.

En *Saccharomyces cerevisiae*, se ha intentado identificar productos que medien la regulación catabólica nitrogenada, que pudieran ser, o no, equivalentes a los productos de los genes *nit-2* y *areA* (24).

Hasta la fecha, se han logrado identificar dos tipos de genes regulatorios. *S. cerevisiae* requiere el producto del gene *gln3* para la inducción de, al menos, la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD (catabólica, GDH-NAD), glutamino sintetasa (GS) (33,34), arginasa (AGA) y urea carboxilato-alofanato hidrolasa (9), al ser cultivada en glutamato como única fuente de nitrógeno. El producto de otro gene, *ure2*, parece ser antagónico al de *gln3*, ya que previene la

activación de la síntesis de, al menos, GS, GDH-NAD y arginasa (AGA) (11). Las mutantes *gln3* no son capaces de inducir estas enzimas en crecimientos en glutamato, aunque la expresión de AGA y de urea carboxilato-alofanato hidrolasa sigue siendo sujeta a la acción de sus inductores nativos (ver control específico) (41). Por otro lado, el producto de *ure2* previene la activación de la GS, de la GDH-NAD y de la AGA en presencia de amonio o glutamina como fuentes de nitrógeno, y mutantes *ure2* expresan estas enzimas constitutivamente.

La regulación de la síntesis de enzimas por el sistema *GLN3-URE2* en respuesta a las pozas intracelulares de glutamina y glutamato, parece funcionar principalmente para ajustar la concentración intracelular de amonio de modo tal de mantener la concentración de glutamina adecuada para sostener el crecimiento.

Es por esto que *GLN3* y *URE2* no están involucrados en el control de la represión catabólica nitrogenada, ya que sólo afectan a las enzimas involucradas en la interconversión de amonio y glutamato. La regulación catabólica nitrogenada se define como el mecanismo responsable de reducir los niveles de ciertas enzimas catabólicas de células creciendo en buenas fuentes de nitrógeno: amonio o glutamina. Del mismo modo, al adicionar amonio al medio en que están creciendo células en una fuente pobre de nitrógeno, se reduce rápidamente el nivel de las enzimas responsables de la conversión de este compuesto secundario a amonio o glutamato. Este mecanismo se conoce como exclusión del inductor.

Courchesne y Magasanik (11), proponen que el producto de *GLN3* activa la transcripción de los genes estructurales de GS, GDH-NAD, AGA, urea carboxilasa-alofanato hidrolasa y tal vez otras enzimas, en respuesta a un incremento en el nivel intracelular de glutamato, mientras que el producto funcional de *URE2* inactiva a *GLN3* en presencia de una poza alta de glutamina, lo que se traduce en la reducción de estas enzimas catabólicas. Así, el principal papel del sistema de control *GLN3-URE2* es mantener la concentración intracelular de glutamina a un nivel óptimo para el crecimiento.

1.4 Control específico.

La mayoría de los genes catabólicos regulatorios descritos en *A. nidulans*, *N. crassa* y *S. cerevisiae*, controlan la expresión de genes cuyos productos actúan dentro de vías metabólicas particulares; estos reguladores se han denominado genes regulatorios vía-específicos. Varios de estos genes regulatorios han sido sujetos a análisis genéticos muy detallados. A continuación, serán discutidas algunas vías metabólicas y su regulación.

a) Catabolismo de purinas

En *Aspergillus nidulans* el producto del gene *uaY* (2), es un modulador que regula la expresión de, por lo menos, seis genes no ligados que participan en el transporte y la degradación de purinas: desaminasa de adenina, xantino deshidrogenasa, urato oxidasa, alantoinasa, alantoicasa, y ácido úrico-xantino permeasa. El inductor de todas las actividades bajo el control de *uaY* es el ácido úrico. Mutantes *uaY* no

presentan actividad de ninguna de las enzimas bajo su control, y no se ha logrado aislar mutantes que tengan actividad constitutiva de estas enzimas, por lo que se presume que se trata de un regulador positivo. Estas mutaciones han sido localizadas y se sabe que están en el promotor del gene *uaY*.

En *Neurospora crassa*, la vía de degradación de purinas es similar a la descrita en *A. nidulans*; sin embargo, no se ha encontrado un gene regulador semejante a *uaY* (18).

La alantoína es un producto de la degradación de purinas que *Saccharomyces cerevisiae* puede utilizar como única fuente de nitrógeno (7). El catabolismo de la alantoína se lleva a cabo a través de una compleja vía que incluye cinco enzimas y cuatro sistemas de transporte, cuyos genes se localizan en tres regiones diferentes (7, 10):

i) En el brazo derecho del cromosoma IX se localizan los genes que codifican para alantoinasa (*dal1*), permeasa de alantoína (*dal4*), alantoicasa (*dal2*) y a 1kb de distancia, ureidoglicolato hidrolasa (*dal3*).

ii) En el brazo derecho del cromosoma II los genes que codifican para la urea carboxilasa-alofanato hidrolasa (*dur1,2*), enzima que tiene dos dominios funcionales.

iii) Unidos al centrómero del cromosoma VIII, se localizan los genes que codifican las enzimas encargadas del transporte activo de urea (*dur3*) y de su difusión facilitada (*dur4*).

Todas las enzimas (DAL1, DAL2, DAL3, DUR1,2) y el sistema de transporte activo de urea (DUR3), tienen por inductor nativo al alofanato, último intermediario de la vía (FIG. 2) (3, 4, 8).

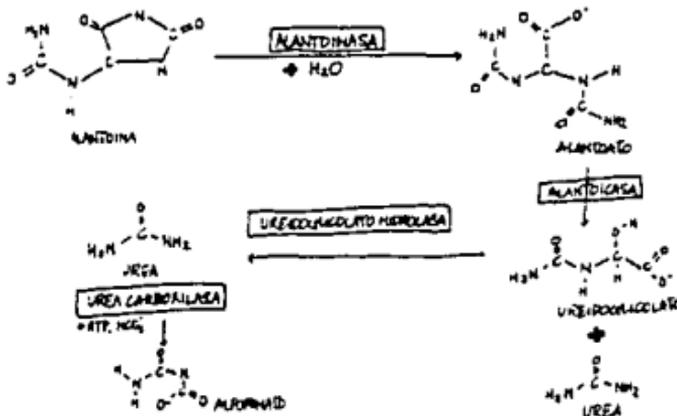


FIG.2. Degradación de alantoína en *Saccharomyces cerevisiae*.

Hasta la fecha, se han identificado tres elementos de control, cuya inactivación resulta en la síntesis constitutiva (*dal80*, [6]) o no inducible (*dal81* [41] y *dal82* [34]) de los cinco productos génicos sujetos a inducción por alofanato, último intermediario de la vía. Se ha propuesto que el producto del gene *dal80* controla el nivel basal de expresión génica como resultado de interactuar con regiones adyacentes a los genes que regula. Las mutaciones *dal81* y *dal82* presentan entre sí el mismo fenotipo; sin embargo, no se trata del mismo mecanismo de regulación. El producto *DAL81* es el responsable del proceso de inducción como resultado de su interacción con el inductor nativo, el alofanato, mientras que la expresión de *DAL82* no responde a la inducción por alofanato ni a represión catabólica nitrogenada; los genes *dal81* y *dal82* se localizan en cromosomas diferentes (34).

Se ha encontrado un tercer elemento regulador, *DAL7*, que responde a regulación catabólica nitrogenada y cuya función parece ser la activación del sistema *DAL* (degradación de alantoína), en limitación de amonio. Este es un gene regulatorio muy interesante (43, 9), ya que se han encontrado elementos regulatorios localizados "upstream" del promotor del gene *dal7*: una secuencia de activación regulada por nitrógeno upstream (UAS_{NTR}), para cuya función se requiere la presencia de *GLN3*; una secuencia de represión upstream (*URS*), cuya inhibición de la activación transcripcional es independiente del inductor; y una secuencia de inducción upstream (*UIS*), requerida para la respuesta al inductor. En otra sección discutiremos el papel de estas secuencias reguladoras.

b) Catabolismo de prolina.

En *Aspergillus nidulans*, los cuatro genes cuyos productos son necesarios para la degradación de prolina se encuentran agrupados (2). Este sistema consta de la permeasa de prolina (*prnB*), la prolina oxidasa (*prnD*), la deshidrogenasa del Δ -pirrolin-5-carboxilato (*prnC*), y del gene *prnA*, que codifica un regulador de *prnB*, *C* y *D*. Este agrupamiento de genes se encuentra interrumpido por una región regulatoria central, en la que se han aislado mutantes que funcionan en *cis*.

La prolina es el inductor de *prnB*, *C* y *D* y el producto de *prnA* es un regulador positivo que media esta inducción. Mutantes *prnA*^{*} carecen de los productos *PRNB*, *C* y *D*. Se ha aislado una mutación, *prn*^d, que

mapea en la región regulatoria central del sistema, que resulta en una derrepresión de la síntesis de la permeasa de prolina, lo que aumenta indirectamente la síntesis de los productos de *prnC* y *prnD*, como consecuencia del aumento en el transporte de prolina. La mutación *prn^d* requiere del producto de *prnA* y de la inducción por prolina.

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

La vía de degradación de prolina en *Saccharomyces cerevisiae* es similar a la de *A. nidulans*; sin embargo, los genes que participan en esta vía no se encuentran agrupados (18). Se han aislado tres tipos de mutantes incapaces de utilizar prolina como única fuente de nitrógeno: El primer tipo está constituido por cepas *petites* (*p⁻*), el segundo por mutantes que carecen de actividad de prolina oxidasa (*put1*), y el tercero por aquellas que carecen de actividad de P5C-deshidrogenasa (*put2*). La P5C-deshidrogenasa es una enzima mitocondrial, y es por esto que mutantes *p⁻* son incapaces de utilizar prolina como única fuente de nitrógeno. Además, se ha aislado otro tipo de mutante, designada *put3*, que posee niveles parcialmente constitutivos de las dos enzimas implicadas en la degradación de prolina. Este gene posiblemente es el mediador de la inducción de estas enzimas por prolina; sin embargo, a diferencia del gene *prnA* de *A. nidulans*, el producto del gene *put3*

podría funcionar como un represor típico en un sistema de control negativo (7).

c) Catabolismo de arginina.

Tanto en *Neurospora crassa* como en *Saccharomyces cerevisiae* (FIG. 3), la arginasa (AGA) es la única enzima capaz de degradar arginina. El resultado de esta degradación es la conversión de arginina en ornitina y urea (20). Esta última es hidrolizada por la ureasa, en *N. crassa*, liberándose CO₂ y amonio, mientras que en *S. cerevisiae* esta es convertida en alofanato, que a su vez es transformado en CO₂ y amonio por la urea carboxilasa-alofanato hidrolasa. En ambos microorganismos, la ornitina, por medio de la ornitino transaminasa (OTA), es a su vez convertida en semialdehído glutámico, que después es transformado en glutamato. El semialdehído se cicliza espontáneamente formando Δ^1 -pirrolin-5-carboxilato, que posteriormente es reducido a prolina.

En *S. cerevisiae* se han aislado seis tipos de mutaciones que presentan defectos en la inducción de arginasa. El primer tipo está constituido por la mutación recesiva *car-80* que resulta en la síntesis constitutiva de AGA (*car-1*), y OTA (*car-2*). Los siguientes dos tipos son dominantes y cada uno está ligado al gene cuya expresión regula, es decir, la mutación *car10⁺* está ligada a *car-1* y resulta en la síntesis constitutiva de AGA, mientras que la mutación *car20⁺* está ligada a *car-2* y resulta en la síntesis constitutiva de OTA.

Los tres tipos restantes tienen fenotipo recesivo y se han designado *arg80*, *arg81* y *arg82*; resultan en la

síntesis constitutiva de las enzimas de la biosíntesis de la arginina y en la incapacidad de utilizar arginina u ornitina como únicas fuentes de nitrógeno. El hecho de que estas tres mutaciones afectan tanto el catabolismo como la biosíntesis de arginina, condujo a Wiame, en 1971 (42), a proponer que el producto de estos genes constituye un represor ambivalente trimérico, que se denominó ARGR. Según este modelo, en presencia de arginina u ornitina, este represor regula la biosíntesis como un represor clásico e induce el catabolismo, a través de inhibir la acción represora o la síntesis de un aporepresor de las enzimas catabólicas. El hecho de que los productos de los genes *arg80*, *arg81* y *arg82* regulen de manera opuesta la biosíntesis y el catabolismo de arginina, impide la operación de un ciclo futil de síntesis y degradación de este aminoácido.

S. cerevisiae ha desarrollado un mecanismo de regulación peculiar, denominado control epiarginástico, que también excluye la operación simultánea de las vías biosintética y catabólica. En esta levadura, la arginasa es capaz de inhibir a una de las enzimas biosintéticas, la ornitino transcarbamilasa. El complejo enzimático así formado, conserva la actividad de AGA, pero no la de ornitino transcarbamilasa (7, 24).

En *N. crassa* no se han aislado mutantes regulatorias como las reportadas en *S. cerevisiae*, sin embargo, la compartimentalización juega un papel importante, impidiendo la operación simultánea de la biosíntesis y el catabolismo de arginina (20).

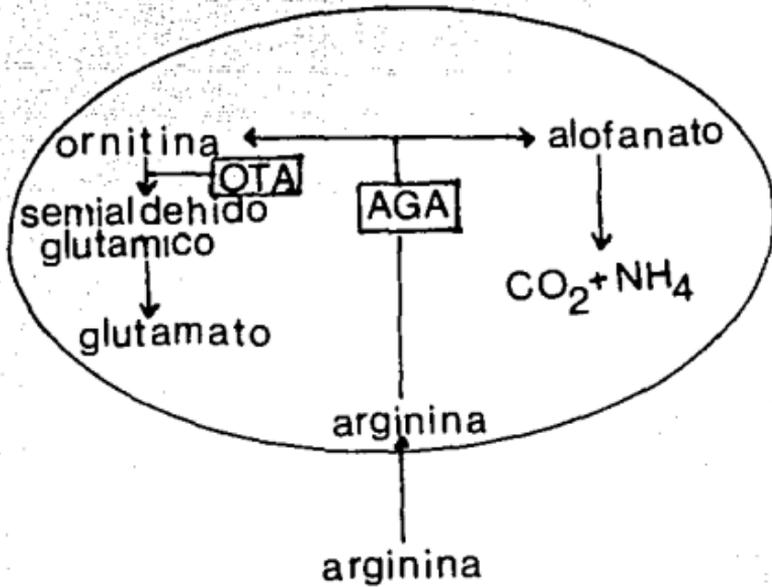


FIG.3. Degradación de arginina

d) Catabolismo de ácido glutámico.

La interconversión entre amonio y glutamato constituye la interfase entre la biosíntesis y la degradación de los compuestos nitrogenados. Ambos metabolitos funcionan como únicas fuentes de nitrógeno y participan, junto con la glutamina, como los principales donadores de nitrógeno en las reacciones biosintéticas. La reacción de interconversión amonio-glutamato, es catalizada por dos enzimas, una dependiente de NADP, la glutamato deshidrogenasa biosintética, y la otra dependiente de NAD, la glutamato deshidrogenasa catabólica. La GDH-NAD cataliza la oxidación del NAD desaminando al glutamato para obtener α -cetoglutarato y amonio (7):



En *S. cerevisiae*, se han aislado mutantes denominadas *gdhCR* (alélicas a *ure2*), que poseen

altos niveles de la enzima, y mutantes *gdhCS* que poseen niveles basales no inducibles (7). Miller y Magasanik, en 1990 (31), obtuvieron una mutante que carece de GDH-NAD, a través de interrumpir el gene *gdh2* (gene que codifica la GDH-NAD); como era de esperarse, encontraron que esta mutante no es capaz de crecer en glutamato como única fuente de nitrógeno. Sin embargo, sorprendentemente, si además de glutamato se agrega adenina, la mutante crece tan bien como la cepa silvestre. La mutante, al carecer de GDH-NAD, requiere la adenina porque es la única manera de obtener un producto de la transamidación de la glutamina, la adenina, necesaria para la biosíntesis de nucleótidos, que esta mutante no tiene por carecer de glutamato y por lo tanto de glutamina; los autores demuestran que el anillo de la adenina no se está catabolizando para dar amonio. Así mismo, obtuvieron otra mutante que induce la GDH-NAD cinco veces menos que la cepa silvestre y aún así la cepa crece bien en glutámico como única fuente. El estudio de estas mutantes, los llevó a proponer que la actividad enzimática de GDH-NAD es la principal, pero no la única, vía para la generación de amonio a partir de glutamato.

OBJETIVO

Como se menciona en la introducción, *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de utilizar a una gran variedad de compuestos como fuentes de nitrógeno. El estudio de la regulación de las enzimas que participan en la degradación de este tipo de compuestos nitrogenados en esta levadura, ha dado como resultado la identificación del circuito controlado por *GLN3* y *URE2*. Sin embargo, este circuito no participa en lo que se denomina represión catabólica nitrogenada (11). La represión catabólica nitrogenada, se define como la capacidad que tienen las fuentes primarias de nitrógeno de regular negativamente el catabolismo de fuentes secundarias de nitrógeno. En *Aspergillus* y en *Neurospora* se han identificado los genes cuyos productos son los principales efectores de la represión catabólica nitrogenada (*areA* y *nit2*). En *S. cerevisiae* no se han encontrado circuitos de regulación generales que controlen el catabolismo de un número grande de compuestos ni genes similares a los identificados en *Aspergillus* y en *Neurospora*.

El principal objetivo de este trabajo es la identificación de un circuito regulatorio general que module el catabolismo de compuestos nitrogenados en *Saccharomyces cerevisiae*.

MATERIAL Y METODOS

CEPAS:

Se utilizaron las siguientes cepas:

CEPA	PROPIEDADES	REFERENCIA
S288C	Silvestre Maternal gal2	Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.
G2	Mutante seleccionada por su capacidad de crecer en SN Glu-Gli. Derivada de la S288C.	Saúl Guerrero, Tesis de Licen- ciatura, 1988.
12G	Mutante seleccionada por su capacidad de crecer en SN Arg-Gli. Derivada de la S288C.	Este trabajo.
SERIE AL	Mutantes seleccionadas por su capacidad de crecer en SN Alan-Gli (21 mutantes). Derivadas de la S288C	Este trabajo.

MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

MEDIO RICO (YPD): Se preparó con Extracto de Levadura al 1%, Peptona de Caseína al 2% y Dextrosa al 10%. Este medio se utilizó para el crecimiento de precultivos.

MEDIO MINIMO (AMONIO): Se preparó con sales, vitaminas y elementos traza, según la fórmula de Difco Yeast Base. Se utilizó Dextrosa al 2% como fuente de Carbono y Sulfato de Amonio 40mM como fuente de Nitrógeno.

MEDIO SIN NITROGENO (SN): Se preparó igual que el Medio Mínimo pero sin Sulfato de Amonio, suplementándose la fuente de nitrógeno con el com-

puesto nitrogenado indicado a una concentración de 1 mg/ml. Los medios que simultáneamente contenían glicina, a menos que esté indicado, la contenían a una concentración final de 20mM.

CONDICIONES DE CRECIMIENTO: Para detectar el fenotipo reportado en esta tesis, es importante que las células inoculadas provengan de un slant reciente. Las células se cultivaron a 30°C y 250 rpm. El crecimiento se siguió midiendo la densidad óptica a 600nm.

MUTAGENESIS

Se siguió un método ya reportado (15), con algunas modificaciones:

Se resuspendieron células de la cepa S288C crecidas en medio sólido YPD, en 1.5ml de amortiguador de fosfato de sodio monobásico 0.1M, pH 7.0. Se tomó 700ul de esta suspensión y se le agregó 1ml del mismo amortiguador. Se le agregaron 50ul del agente mutagénico etilmetanosulfonato (EMS).

Se incubó en baño de agitación a 30°C a 200rpm durante 60 minutos, se tomaron 200ul de esta suspensión y se mezclaron con 8ml de tiosulfato de sodio al 5%. Se lavaron las células y se resuspendieron en medio SN + el compuesto nitrogenado escogido para hacer la selección, pero sin glicina, con el fin de que las células mutagenizadas se recuperaran.

Se incubaron en baño de agitación a 30°C a 200rpm durante doce horas, y finalmente se plaquearon en medio sólido con el medio de selección (para la G2, en SN Glu-Gli; para la 12G en SN Arg-Gli; y para la serie

AL en SN Alan-Gli). Se seleccionaron las colonias que crecieron más rápido.

DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

OBTENCION DE EXTRACTOS CRUDOS:

1. Se inocularon las cepas a una D.O._{600nm} de 0.05.

2. Se tomaron las células en fase de crecimiento exponencial (entre 0.300 y 1.000 de D.O._{600nm}) y se filtraron a través de una membrana *Millipore* de 1.2µm.

3. Se recuperó la pastilla celular y se resuspendió en el amortiguador de extracción adecuado para cada enzima, siempre en frío

4. Se rompió cada muestra con perlas de vidrio, con cinco pulsos de un minuto cada uno agitando en un Vortex. La suspensión se centrifugó a 15,000 rpm durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. Los extractos se mantuvieron todo el tiempo a 4°C.

DETERMINACION DE ACTIVIDAD ESPECIFICA DE ALANTOINASA.

Se varió el método reportado (24), de la siguiente manera:

Se prepararon los extractos deseados como se explicó en **obtención de extractos crudos**. Se incubó un tubo conteniendo entre 0.2 y 4mM de sustrato (alantoina), 0.5mg/ml de extracto y amortiguador tris acetato 0.1M, pH 8.0 cbp 10ml, en un baño a 30°C y se tomaron cinco muestras de 2ml c/u de esta suspensión cada cierto tiempo (entre 5' y cuatro

horas). Para detener la reacción, se agregaron de inmediato 100ul de HCl concentrado. Una vez preparadas las cinco muestras, se le adicionó a cada una 200ul de una solución de fenilhidrazina HCl al 1%, se hirvieron en baño maría durante 2 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se agregaron 1.2ml de HCl concentrado y 200ul de ferricianuro de potasio al 5%. Se determinó la actividad enzimática por los cambios en densidad óptica a 524nm. Paralelamente, se corrió una curva estándar con ácido alantoico.

Se hicieron curvas de pH y se estableció que el pH óptimo de esta reacción es 8.0.

Para las cinéticas enzimáticas se varió la concentración de sustrato.

Para las curvas de inhibición por glicina *in vitro* se agregaron, en el momento de la incubación, las concentraciones indicadas de glicina.

DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE GDH-NAD:

Se preparó un extracto como se indica, cuyo amortiguador de extracción contenía:

K ₂ HPO ₄	0.1M
EDTA	1mM
β-mercaptoetanol	2mM

a un pH de 7.0. El coctel para ensayo de actividad contenía:

K ₂ HPO ₄ 1M pH 8.0	1ml
α-cetoglutarato 0.1M	300ul
NADH 3mM	120ul
NH ₄ Cl 1M	500ul
Agua bidestilada	8ml

Se puso 1 ml de coctel en una celda de cuarzo y se inició la reacción con el extracto, midiendo la absorbancia a 340nm en un espectrofotómetro. Paralelamente, se corrió un control sin -cetoglutarato y uno sin cloruro de amonio.

Para las curvas de pH, se varió en el rango indicado, el pH de los cocteles.

Se hicieron curvas de pH y se estableció que el pH óptimo de esta reacción es 8.0.

Para las curvas de termosensibilidad, se incubaron los extractos a 55°C, y se corrieron los ensayos a los tiempos indicados.

Para las curvas de actividad enzimática contra tiempo, se prepararon los extractos a partir de un mismo cultivo, en los tiempos indicados.

Para la actividad de GDH-NAD después de un shock de glicina, una vez que los cultivos estuvieron en fase exponencial de crecimiento, se le agregó glicina hasta una concentración de 20mM, se siguieron incubando y se prepararon los extractos 40 minutos después.

DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE GLUTAMINO SINTETASA:

Se preparó un extracto igual a los anteriores cuyo amortiguador de extracción contenía:

K ₂ HPO ₄	5mM
EDTA	5mM
K ₂ SO ₄	50mM

a un pH 7.2. Se determinó la actividad siguiendo el método reportado (13).

RESULTADOS Y DISCUSION.

1. La glicina impide la utilización de algunos compuestos nitrogenados, tanto primarios como secundarios.

La levadura es incapaz de utilizar glicina como única fuente de nitrógeno (7). Se ha encontrado que este compuesto altera la asimilación de amonio a través de inhibir a la glutamino sintetasa (GS), en una gran variedad de organismos (23).

Con el fin de determinar si la glicina inhibía la actividad específica de GS en *Saccharomyces cerevisiae*, decidimos medir esta actividad enzimática contra concentraciones crecientes de glicina de la cepa S288C crecida en SN Glutamato. Como se observa en la figura 4, encontramos que con 50mM de glicina, la actividad enzimática disminuye en un 50%.

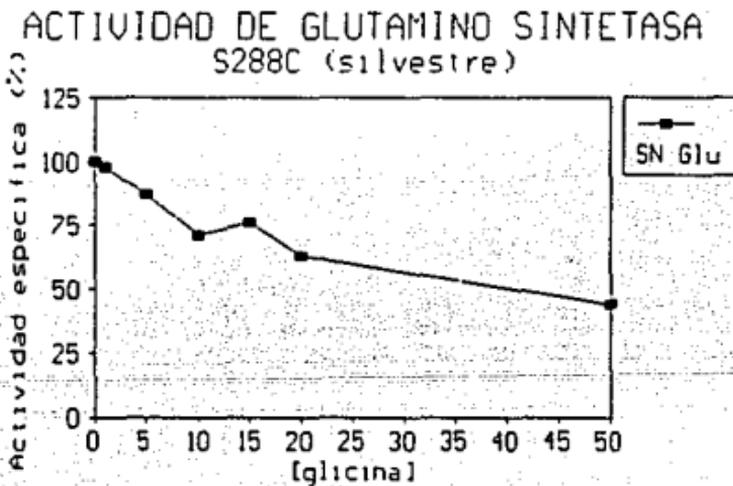


FIG.4. Inhibición in vitro de la actividad de glutamino sintetasa con concentraciones crecientes de glicina. Cepa S288C, cultivada en SN Glu.

Con el objetivo de analizar más detenidamente el

papel de la glicina en el catabolismo de otros compuestos nitrogenados, se hizo un análisis fenotípico de la cepa S288C cultivada en la presencia simultánea de varios compuestos nitrogenados y glicina.

La cepa S288C de *Saccharomyces cerevisiae*, posee una permeasa generalizada que es insensible a la represión por amonio (34) Esto resulta en el mejor transporte de compuestos nitrogenados, de manera tal, que esta cepa es capaz de acumular pozas intracelulares muy elevadas de estos compuestos; así, esta cepa, a diferencia de otras cepas de levadura, transporta y acumula una poza elevada de glicina.

En nuestro laboratorio teníamos datos que indicaban que cuando se adicionaba glicina 50mM a un medio de cultivo de SN Glutamato, se impedía su utilización (21) (Fig.5).

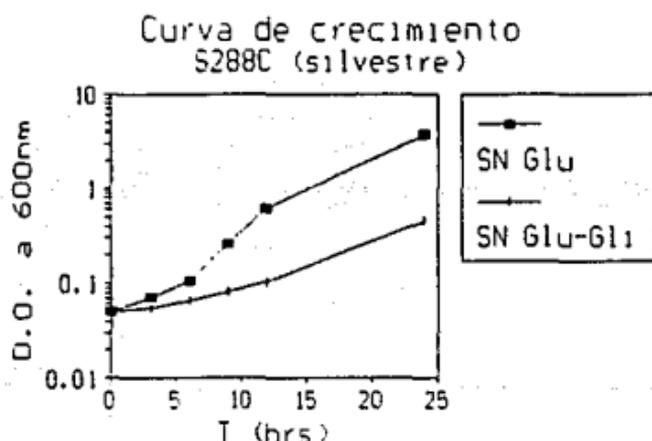


FIG. 5. Curva de crecimiento de la cepa S288C (silvestre) en SN Glu vs SN Glu-Gli.

Como se observa en la figura, mientras que el tiempo de duplicación de la cepa crecida en SN Glutamato es de 150 minutos, un crecimiento en presencia simultánea de glutamato y glicina 50mM, el

tiempo de duplicación se incrementa hasta alcanzar 330 minutos, lo que indica que la glicina inhibe la actividad de GS *in vivo*, o bien que impide la utilización del glutamato como fuente de nitrógeno.

En estos experimentos se utilizó la glicina a una concentración de 50mM. Con el fin de establecer la concentración de glicina necesaria para observar este fenómeno, se probó el efecto de diversas concentraciones de glicina sobre el crecimiento de la cepa en un medio conteniendo como fuente de nitrógeno alantoína, purina que *Saccharomyces* es capaz de utilizar como única fuente de nitrógeno, Se utilizó esta condición, debido a que el efecto de glicina sobre el crecimiento en presencia de alantoína es más claro (Fig 6).

Curva de crecimiento SN Alantoína
Concentraciones crecientes de glicina

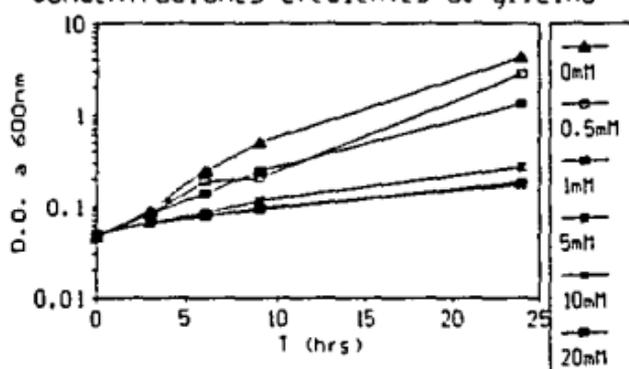
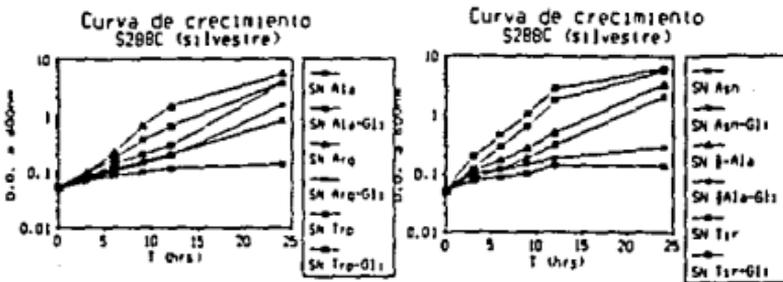


FIG. 6. Curva de crecimiento de la cepa S288C (silvestre), en SN Alan contra concentraciones crecientes de glicina.

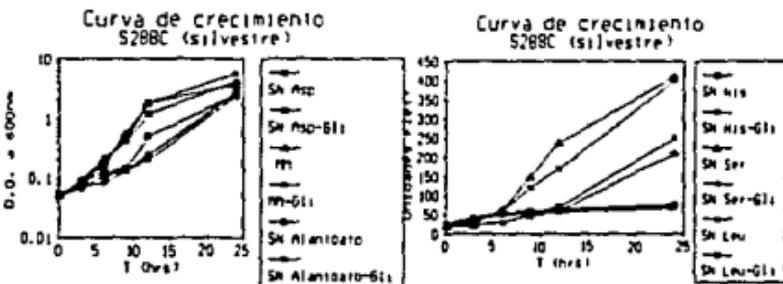
Como se observa en la figura, la glicina provoca un incremento en el tiempo de duplicación desde una concentración de 0.5mM, aumentando a medida que se incrementa la concentración de glicina hasta un fenotipo de no crecimiento, indistinguible desde 10

hasta 50mM de glicina. Por esta razón, decidimos utilizar glicina 20mM para nuestro análisis. A continuación, se hicieron curvas de crecimiento en veinticinco compuestos nitrogenados (Fig 7, a-g).



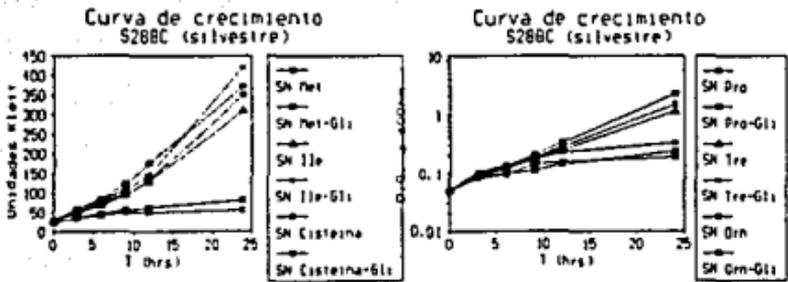
a. Curva de crecimiento de la cepa silvestre en SN Alanina, SN Alanina + Glicina, SN Arginina, SN Arginina + Glicina, SN Triptofano y SN Triptofano + Glicina.

b. Curva de crecimiento de la cepa silvestre en SN Asparragina, SN Asparragina + Glicina, SN Fenilalanina, SN Fenilalanina-Glicina, SN Tirosina y SN Tirosina + Glicina.



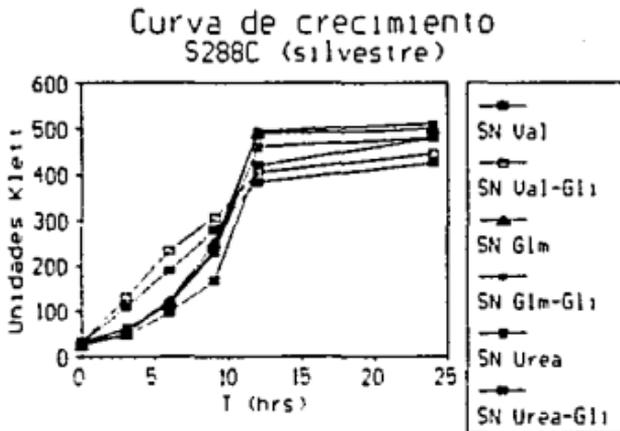
c. Curva de crecimiento de la cepa silvestre en SN Aspartato, SN Aspartato + Glicina, amonio, amonio + Glicina, SN Alantoína y SN Alantoína + Glicina.

d. Curva de crecimiento de la cepa silvestre en SN Histidina, SN Histidina + Glicina, SN Serina, SN Serina + Glicina, SN Leucina y SN Leucina + Glicina.



e. Curva de crecimiento de la cepa silvestre en SN Metionina, SN Metionina + Glicina, SN Isoleucina, SN Isoleucina + Glicina, SN Cisteina y SN Cisteina + Glicina.

f. Curva de crecimiento de la cepa silvestre en SN Prolina, SN Prolina + Glicina, SN Treonina, SN Treonina + Glicina, SN Ornitina y SN Ornitina + Glicina.



g. Curva de crecimiento de la cepa silvestre en SN Valina, SN Valina + Glicina, SN Glutamina, SN Glutamina + Glicina, SN Urea y SN Urea + Glicina.

FIG. 7. Curvas de crecimiento de la cepa S288C en varias fuentes nitrogenadas en presencia y ausencia de glicina 20mM.

Como se puede apreciar, al crecer a la cepa silvestre en diferentes compuestos nitrogenados +

glicina, se presentan una gran variedad de fenotipos: desde aquellos en los que la glicina no parece ejercer ningún efecto hasta aquellos en los que el crecimiento es totalmente abatido. En la TABLA 1 se presentan los tiempos de duplicación de la cepa S288C en todos los compuestos nitrogenados analizados con y sin glicina.

COMPUESTO NITROGENADO	TIEMPO DE DUPLICACION	EFEECTO DE GLICINA
Amonio	144	210
Glutamina	132	ninguno
Aspargina	134	ninguno
Arginina	120	400
Glutamato	150	330
Serina	153	ninguno
Alanina	180	270
Aspartato	210	360
Fenilalanina	180	780
Leucina	287	ninguno
Tirosina	210	600
Valina	204	ninguno
Isoleucina	222	ninguno
Triptofano	375	585
Prolina	195	1005
Metionina	329	ninguno
Treonina	375	762
Histidina	N.D.	N.D.
Lisina	N.D.	N.D.
Cisteína	N.D.	N.D.
Alantoína	120	1020
Alantoato	180	330
Urea	164	ninguno
Ornitina	285	894

aN.D. = No detectable

TABLA 1. Efecto de glicina sobre el crecimiento de la cepa S288C (silvestre) en distintos compuestos nitrogenados.

Así, hemos encontrado que el crecimiento de la cepa silvestre en trece de los 25 compuestos nitrogenados analizados disminuye considerablemente en presencia de glicina.

El efecto de glicina sobre el crecimiento de la cepa silvestre pudiera ser atribuible a un efecto sobre el transporte de los diferentes compuestos nitrogenados. Este punto se discutirá más adelante.

2. En presencia de glicina disminuye la actividad de algunas enzimas catabólicas.

2.1 Glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD.

En su tesis de licenciatura, Saúl Guerrero (21), reportó que la actividad específica de glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD (GDH-NAD), que juega un papel catabólico, es más baja en extractos obtenidos de la cepa silvestre cultivada en un medio SN Glu-Gli que en los provenientes de SN Glu.

Con el fin de estudiar detenidamente el efecto de la presencia de glicina sobre la GDH-NAD, determinamos la actividad específica de esta enzima contra tiempo. En la Fig. 8, se muestra la actividad específica de GDH-NAD de células cultivadas en SN Glu y en SN Glu-Gli: como se puede apreciar, la actividad de GDH-NAD en SN Glu se incrementa gradualmente, obteniéndose un nivel máximo a las doce horas y decayendo posteriormente. En cambio, al determinar la actividad específica de GDH-NAD de células incubadas en SN Glu-Gli, se obtienen valores mucho menores o incluso no detectables. De acuerdo con estos resultados, se podría suponer que la disminución del crecimiento en SN Glu-Gli se debe a la baja actividad de GDH-NAD, ya que en estas condiciones, el

catabolismo del ácido glutámico debe estar reducido. Este hecho sugiere que la glicina regula de manera negativa la degradación del ácido glutámico.

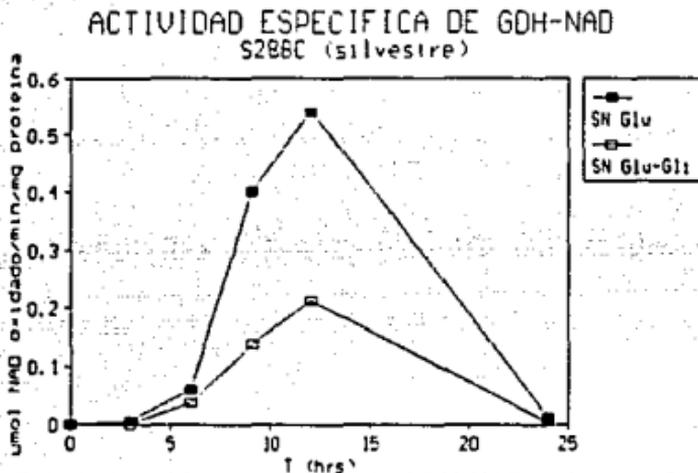


FIG. 8. Actividad específica de GDH-NAD de la cepa S288C (silvestre) en SN Glu y SN Glu-Gli contra tiempo.

Pero ¿a qué nivel regula la glicina la actividad de la GDH-NAD?. En *Candida utilis*, Hemmings y Sims (1977), reportaron que la GDH-NAD tiene dos formas interconvertibles (22): una forma activa que debido a una rápida fosforilación es convertida en una forma inactiva; los autores distinguen una y otra forma de la enzima porque las actividades enzimáticas de cada una de estas dos especies tienen diferentes pH's óptimos, tanto para la activa como para la inactiva. Con el fin de determinar si la glicina podría inducir una inactivación de este tipo, decidimos dar un shock de glicina (ver Material y Métodos) a cultivos en fase de crecimiento exponencial en SN Glu y determinar la actividad específica de glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD; las actividades fueron determinadas a diferentes pH's, ya que de ser un fenómeno similar al descrito para *Candida*, tendrían, posible-

mente, un pH óptimo diferente.

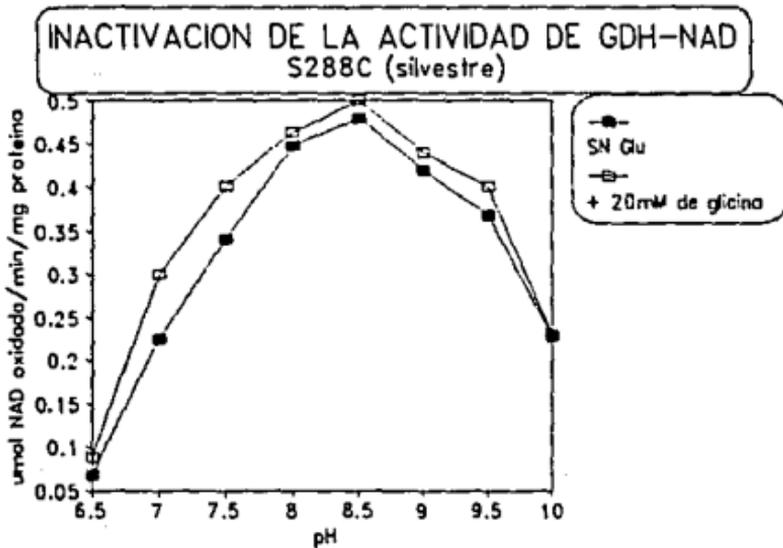


FIG. 9. Actividad específica de GDH-NAD de la cepa S288C crecida en SN Glutamato después de 30 minutos de haberle aplicado un shock de Glicina 20mM contra pH.

Como se observa en la figura 9, el perfil de actividad de la GDH-NAD no sufre ningún cambio significativo después de dar el shock de glicina, por lo que concluimos que la glicina no parecía estar inactivando por medio de este mecanismo a la GDH-NAD.

Datos obtenidos por Saúl Guerrero (21), sugerían que la GDH-NAD presente en extractos de cultivos provenientes de SN Glu era más resistente al calor, que la enzima presente en extractos provenientes de cultivos en SN Glu-Gli. Por lo tanto, decidimos determinar la actividad de glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD en extractos provenientes de SN Glu y SN Glu-Gli contra tiempo de calentamiento a 55°C. En la fig. 10, se observa el resultado de esta determinación enzimática. Como se puede apreciar, las enzimas

provenientes de ambos extractos presentan una termosensibilidad similar.

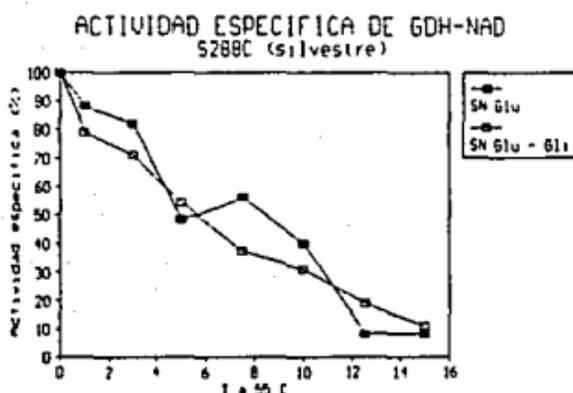


FIG. 10. Curva de termosensibilidad de la actividad enzimática de GDH-NAD de la cepa S288C incubada en SN Glu y SN Glu-Gli contra tiempo de incubación a 55°C.

La determinación de las enzimas a diferentes pH's nos permitió observar que el pH al que estábamos realizando las determinaciones (7.0), que era el reportado para este ensayo, no era el óptimo. Por esta razón decidimos realizar una curva de pH con el fin de establecer el pH óptimo en nuestro ensayo (no mostrado), resultando que el pH óptimo para la determinación de la actividad específica de glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD es 8.0, tanto en extractos de células provenientes de cultivos en SN Glu como de SN Glu-Gli.

Está reportado (36) que la GDH-NAD sólo es inducida en células crecidas en SN Glutamato, SN Alanina y SN Aspartato, no induciéndose en ningún otro compuesto nitrogenado. Con el fin de analizar el efecto de glicina sobre la inducción de la actividad de la GDH-NAD en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno, determinamos la actividad de GDH-NAD en extractos de células provenientes de cultivos con-

teniendo SN Gln, SN Gln-Gli, amonio y amonio-Gli (Tabla 2).

MEDIO	ACTIVIDAD ESPECIFICA
SN GLU	0.541
SN GLU-GLI	0.214
SN GLM	0.004
SN GLM-GLI	N.D.
AMONIO	N.D.
AMONIO-GLI	0.005

umol NAD_{ox}/min/mg de proteína.

Tabla 2. Actividad específica de la cepa S288C (silvestre) de glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD.

Como era de esperarse, la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD, no es activada en presencia de amonio o glutamina. El efecto de glicina sólo se observó en presencia de glutamato.

De los datos obtenidos con la cepa silvestre sobre la actividad de glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD (catabólica), podemos concluir que en la presencia simultánea de glutamato y glicina, la actividad específica de GDH-NAD es 2.5 veces menor que cuando no hay glicina en el medio; así mismo, nuestros datos indican que este fenómeno no se debe a una modificación postraducciona de la enzima que cambie el pH óptimo, ni a una diferencia conformacional que confiera protección al calor, ni tampoco a una activación tardía de la enzima por la presencia de glicina.

Vale la pena aclarar, que aún cuando es evidente el efecto de la presencia de glicina sobre la actividad de la GDH-NAD, el tiempo de duplicación de la cepa silvestre en medios conteniendo glutamato + glicina

es tan sólo el doble del que se observa en ausencia de glicina, durante la fase exponencial del crecimiento (330 en SN Glu-Gli contra 150 en SN Glu). Después de 36 horas de crecimiento, los cultivos en ambas condiciones alcanzan una D.O._{600nm} similar.

2.2 Alantoinasa

Una vez analizado el efecto de la glicina sobre la GDH-NAD, decidimos ver si otras enzimas catabólicas eran a su vez reguladas por la glicina.

Decidimos determinar la actividad de alantoinasa, dado que el fenotipo de no crecimiento de la cepa S288C en SN Alantoína - Glicina es muy evidente (Fig. 6). Como se explica en Material y Métodos, no es clara la concentración de sustrato que se debe utilizar para la reacción colorimétrica. Con el fin de buscar la concentración óptima de sustrato (alantoína) requerido para saturar la reacción, decidimos determinar la actividad enzimática de la cepa S288C crecida en SN Alantoína, contra diferentes concentraciones de sustrato (Fig. 11). Como se puede apreciar, no conseguimos alcanzar la saturación de la enzima. Debido a que la alantoína es poco soluble, decidimos estandarizar nuestro ensayo utilizando una concentración de sustrato de 4mM, donde obteníamos la máxima actividad enzimática.

En el ensayo reportado para determinar alantoinasa (ver Material y Métodos) se especifica que el pH óptimo es 7.0. Sin embargo, al analizar la curva de

actividad de alantoinasa contra pH (no mostrado), encontramos que el pH óptimo para determinar esta enzima era, en realidad, 8.0

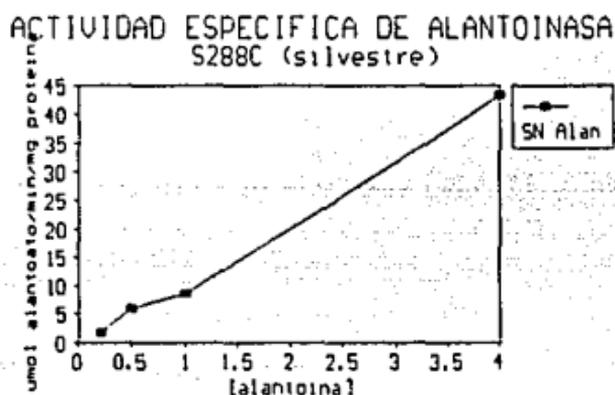


FIG. 11. Actividad específica de alantoinasa de la cepa S288C cultivada en SN Alantoina contra concentraciones crecientes de sustrato.

Como se explica en la introducción, la alantoina es degradada a través de una compleja vía: de alantoina se obtiene alantoato, que a su vez es convertido en ureidoglicolato; el ureidoglicolato es convertido en urea y finalmente se obtiene alofanato para dar CO_2 y amonio. El inductor nativo de esta vía es el alofanato, por lo tanto, cualquier metabolito anterior a éste es capaz de activar a la alantoinasa (8).

Determinamos la actividad específica de alantoinasa de la cepa silvestre cultivada en SN Alantoina, amonio (donde se espera que no se active) y en SN Urea (donde se espera actividad) en presencia y ausencia de glicina (Tabla 3).

MEDIO	ACTIVIDAD ESPECIFICA*
SN ALAN	37.000
SN ALAN-GLI	7.120
AMONIO	0.652
AMONIO-GLI	n.d.
SN UREA	19.130
SN UREA-GLI	2.080

*umol alantoato /min/mg de proteína.

Tabla 3. Actividad específica de alantoinasa de la cepa S288C (silvestre).

Como se observa en la tabla 3, la actividad de alantoinasa disminuyó más de cinco veces en SN Alan-Gli con respecto a la actividad obtenida en ausencia de glicina. Lo mismo se observa en SN Urea - Gli con respecto a la actividad en ausencia de glicina. Como era de esperarse, la enzima no se activa ni en amonio ni en amonio + glicina.

Con el fin de analizar si la glicina inhibía la actividad de alantoinasa *in vitro*, decidimos probar el efecto de concentraciones crecientes de glicina sobre la actividad específica de alantoinasa utilizando diferentes concentraciones de sustrato para realizar el ensayo. Como se observa en la Fig. 12, no encontramos inhibición en la actividad de alantoinasa.

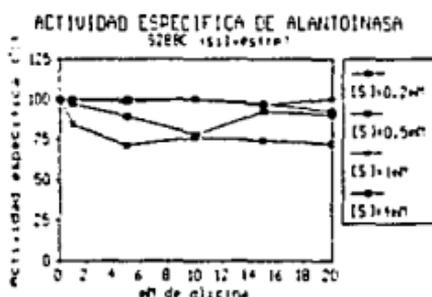


FIG. 12. Inhibición de la actividad de alantoinasa de la cepa S288C cultivada en SN Alantoína, utilizando diferentes concentraciones de sustrato contra concentraciones crecientes de glicina.

Estos resultados indican que en células creciendo en presencia de glicina, la actividad de alantoinasa es aproximadamente cinco veces menor a la encontrada en ausencia de glicina. Es decir, al igual que en el caso de la GDH-NAD, la glicina regula negativamente la actividad de alantoinasa.

3. Pozas intracelulares de glicina.

Se determinaron las pozas intracelulares de glicina de la cepa S288C crecida en SN Gli y en SN Alantoina - Glicina (Tabla 3.1). Como se puede observar, la glicina se acumula, lo cual demuestra que la glicina entra a la célula y que no se degrada aún en presencia de alantoina.

POZAS INTRACELULARES DE GLICINA		
Cepa S288C (silvestre)		
MEDIO	T de cultivo(h)	umol de glicina/mg de proteína
SN Gli	2	10.70
SN Gli	24	23.21
SN Alan-Gli	2	8.58
SN Alan-Gli	24	24.05

TABLA 4. Pozas intracelulares de glicina de la cepa silvestre, a las 2 y a las 24 horas de crecimiento en SN Gli y SN Alan-Gli.

Estos datos sugieren que la glicina como tal, y no un producto de su catabolismo, es el efector de los fenómenos anteriormente descritos.

4. Obtención de mutantes.

Evidentemente, la glicina está implicada en la

expresión de un circuito regulatorio que sería difícil dilucidar con la sólo exploración bioquímica de la cepa silvestre. Es por ello, que decidimos mutagenizar a la cepa S288C (ver Material y Métodos), con el fin de obtener mutantes en este circuito. Es conveniente aclarar que la caracterización de las mutantes que se presentará a continuación, será una descripción meramente fenotípica de las diferentes cepas obtenidas. La caracterización genética aún no se ha realizado. El objetivo inicial de la búsqueda de estas mutantes ha sido el de obtener un buen número de mutantes, seleccionadas en diferentes medios de cultivo. La obtención de estas cepas nos ha permitido analizar diferentes fenotipos y seleccionar algunos para su ulterior caracterización genética.

A priori, se podrían esperar los siguientes tipos de mutantes:

a) Mutantes que no transporten glicina;

b) Mutantes que sean capaces de crecer utilizando glicina como única fuente de nitrógeno, por ser capaces de degradar este compuesto hasta amonio. *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de degradar glicina a través de la enzima glicina descarboxilasa (7), cuando la levadura es cultivada en acetato como fuente de carbono, por lo que se justifica que esperemos este tipo de mutante, ya que la vía degradativa de glicina existe;

c) Mutantes regulatorias específicas que sean capaces de revertir el efecto de glicina en una o algunas de las fuentes de nitrógeno probadas + glicina;

d) Mutantes regulatorias afectadas en un sistema de control general. El fenotipo de mutantes alteradas en este supuesto gene regulatorio podría ser muy variado. Este tipo de mutantes (d), son las que nos interesaba obtener particularmente.

Se efectuaron tres mutagénesis diferentes, obteniéndose los siguientes resultados:

4.1. Selección de mutantes en SN Glu-Gli y SN Arg-Gli: La G2 y la 12G.

Saúl Guerrero aisló la mutante G2 seleccionándola por su capacidad de crecer en glutamato + glicina como fuentes de nitrógeno. La mutante G2 sólo revirtió el efecto de glicina en glutamato, con un tiempo de duplicación en SN Glu-Gli de 120 minutos (contra 330 de la cepa silvestre en la misma condición), siendo incapaz de crecer en presencia de glicina cuando las fuentes de nitrógeno eran otros compuestos nitrogenados como alantoína, arginina, etc. Sin embargo, esta mutante no logró presentar actividad de GDH-NAD en medios adicionados de glutamato y glicina (Tabla 5). Por otro lado, aislamos la mutante 12G por su capacidad de crecer en arginina + glicina como fuentes de nitrógeno. La mutante 12G fué capaz de revertir el fenotipo sólo en SN Arginina-Glicina (180 minutos contra 400 de la silvestre), SN Ornitina-Glicina (195 contra 894) y SN Glutamato-Glicina (180 contra 330)(Fig. 13, a y b), pero no en presencia de glicina y otros compuestos nitrogenados.

DONADO POR D. G. B. - B. C.

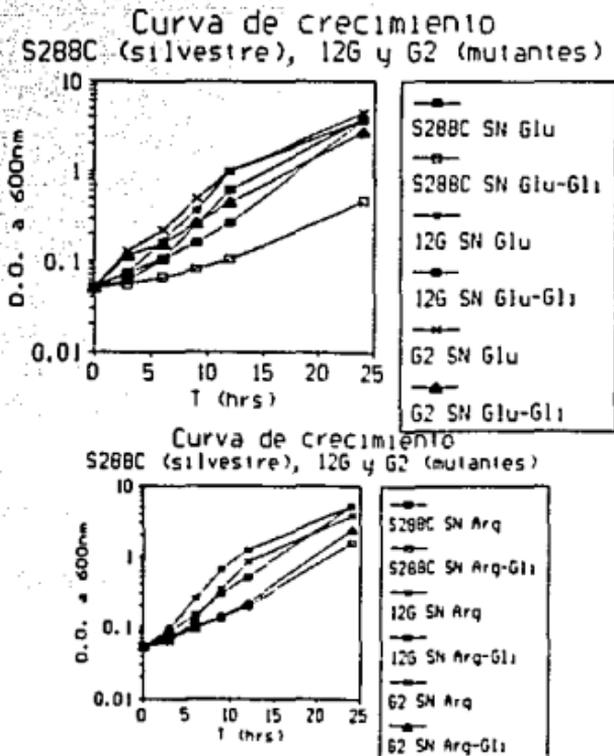


FIG. 13. Curvas de crecimiento de las cepas silvestre y mutantes en a) SN Glu y SN Glu-Gli; b) SN Arg y SN Arg-Gli;

La mutante 12G tampoco fué capaz de activar su GDH-NAD en cultivos provenientes de SN Glu-Gli. En la tabla 5, se presentan las actividades de GDH-NAD y alantoinasa de estas mutantes.

CEPA	GDH-NAD ^a			ALANTOINASA ^b		
	SN GLU	SNGLU-GLI	NH ₄	SN ALAN	SNALAN-GLI	NH ₄
S288C	0.541	0.214	0.005	37.00	7.12	0.652
G2	0.381	0.202	0.006	28.05	10.11	N.D. ^c
12G	0.396	0.103	0.004	43.23	4.88	N.D.

^aumol de NAD_{oxidado}/minuto/mg de proteína.

^bumol de alantoato producido/minuto/mg de proteína.

^cN.D. = No Detectable.

TABLA 5. Actividades específicas de GDH-NAD y alantoinasa de las cepas S288C (silvestre), G2 y 12G (mutantes).

Como se puede observar, tanto la mutante G2 como la mutante 12G presentan actividades de GDH-NAD similares a las de la cepa silvestre en SN Glu-Gli. Utilizando los criterios de pH óptimo y termosensibilidad, se encontró que la enzima obtenida de extractos de las mutantes G2 y 12G se comportaba igual que la GDH-NAD de la cepa silvestre. Estos datos sugieren que, aún cuando estas mutantes han recuperado un tiempo de duplicación similar al que se observa en SN Glu, esto no va aparejado con la capacidad de activar a la GDH-NAD en presencia de glicina. Así mismo, indican que el efecto de la glicina sobre la activación de la GDH-NAD en glutamato, observada en la cepa silvestre, no es el responsable del aumento en el tiempo de duplicación que se presenta en esta condición. Como se mencionó anteriormente, tanto la 12G como la G2, no recuperaron la capacidad de crecer en cultivos adicionados de alantoína + glicina. La tabla 5, muestra las actividades de alantoinasa de la cepa silvestre y de las mutantes G2 y 12G. Como era de esperarse, las mutantes son incapaces de activar la alantoinasa en presencia de glicina.

4.2. Selección de mutantes en SN Alantoína + Glicina.

Nuestro interés era aislar mutantes regulatorias generales que, por ende, afectaran la regulación de muchas enzimas (del tipo de *areA* y *nit2*). Por esta razón, decidimos hacer otra mutagénesis, esta vez seleccionando en medios conteniendo Alantoína + Glicina, en donde el fenotipo de no crecimiento era más obvio que en los medios de selección utilizados

en las mutagénesis anteriores (SN Glu-Gli y SN Arg-Gli). Se obtuvieron 21 mutantes que fueron agrupadas, en principio, por su capacidad o no de crecer en glicina como única fuente de nitrógeno.

4.2.1 Serie AL, Clase I.

De las 21 mutantes aisladas, diez de ellas parecían ser capaces de crecer en medios conteniendo glicina como única fuente de nitrógeno (Fig. 14, a y b).

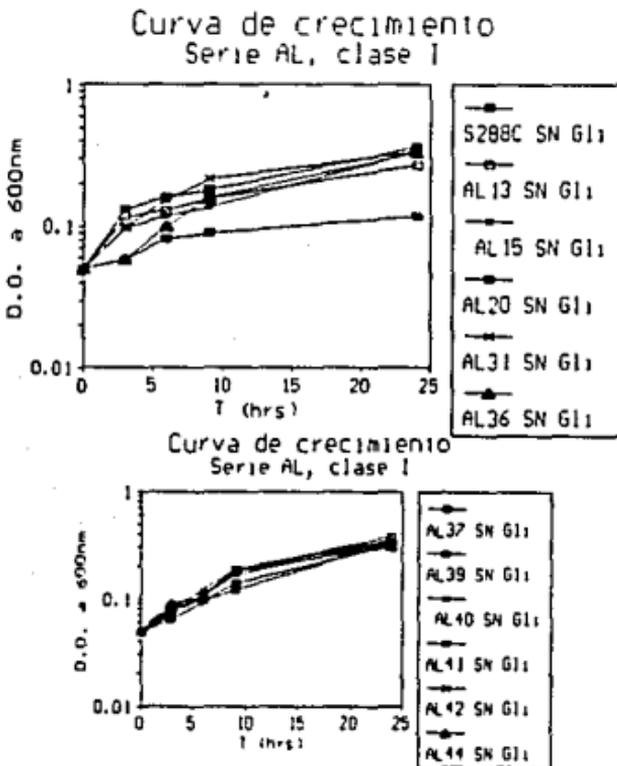


FIG. 14, a y b. Mutantes serie AL, clase I.: capaces de crecer en SN Gli.

De estas diez mutantes, se eligió la AL39 como representante de esta clase. Con esta mutante, se realizaron curvas de crecimiento en todos los compuestos nitrogenados en presencia y ausencia de glicina, resultando que esta mutante es capaz de

crecer en todos los compuestos nitrogenados analizados, independientemente de la presencia de la glicina. En la figura 15, se presenta de manera muy esquemática el fenotipo de crecimiento de la cepa silvestre en presencia de glicina (en blanco porque no es capaz de crecer en ninguno de esos compuestos nitrogenados en presencia de glicina), y el mismo esquema para el caso de la mutante AL39.

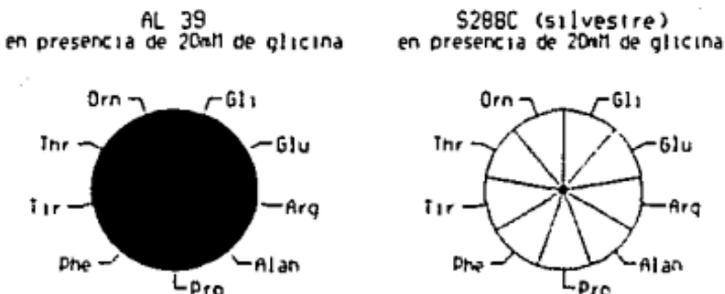


FIG. 15. Esquema del fenotipo de crecimiento de las cepas a) S288C (silvestre) y b) AL39 (mutante).

Los valores obtenidos para las pozas intracelulares de glicina (Tabla 6), sugieren que este aminoácido no está siendo catabolizado. Sin embargo, esta mutante presenta un tiempo de duplicación ligeramente menor al encontrado en la cepa silvestre en esta condición (1020 minutos para la silvestre, contra 840 minutos para la mutante AL39). Esto indica que una pequeña proporción de la glicina debe ser degradada. Así mismo, estos resultados sugieren que la capacidad de la mutante AL39 para crecer en los diferentes compuestos nitrogenados probados, no se debe a que la glicina está siendo catabolizada de manera importante.

POZAS INTRACELULARES DE GLICINA^a

CEPA	SN Gli(2h)	SN Gli(24h)	SN Alan-Gli(2h)	SN Alan-Gli(24h)
S288C	10.70	23.21	8.58	24.05
AL39	21.22	26.34	20.15	3.23

^amol de glicina/mg de proteína

TABLA 6. Pozas intracelulares de glicina de las cepas S288C (silvestre) y AL39 (mutante) en SN Gli y en SN Alan-Gli a las 2 y a las 24 horas de crecimiento.

Se determinó la actividad de alantoinasa de extractos de la mutante AL39 provenientes de SN Alan, de SN Alan-Gli y de Amonio (Tabla 7).

ACTIVIDAD DE ALANTOINASA ^a			
CEPA	SN Alan	SN Alan-Gli	Amonio
S288C	37.00	7.12	0.652
AL39	33.00	41.10	0.370

^amol de alantoato/min/mg de proteína.

Tabla 7. Actividades específicas de alantoinasa de las cepas S288C (silvestre) y AL39 (mutante), en SN Alantoína, SN Alantoína-Glicina y Amonio como fuentes de nitrógeno.

La tabla muestra que la mutante AL39 es capaz de presentar actividad de alantoinasa aún en presencia de glicina. Efectivamente, esta cepa presenta un tiempo de duplicación en medios adicionados de alantoína + glicina igual al que se observa cuando solamente se adiciona alantoína, es decir, la activación de la alantoinasa es resistente al efecto de glicina. La probabilidad de que esta mutante presentara una síntesis constitutiva de alantoinasa quedó descartada, ya que en presencia de amonio, la actividad de esta enzima es baja tanto en la cepa silvestre como en la mutante AL39.

La tabla 6 muestra que esta mutante disminuye notoriamente la poza de glicina en SN Alan-Gli. Esto

puede deberse al hecho de que esta cepa es capaz de crecer en esta condición.

Como se explicó en la Introducción, la síntesis de la permeasa de alantoína es inducida por alofanato; este producto resulta de la degradación de alantoína. El hecho de que el crecimiento de la cepa silvestre se inhiba o disminuya en la presencia simultánea de glicina y diversas fuentes de nitrógeno, podría ser explicado asumiendo que la glicina afectara negativamente algún sistema de transporte general. En estas circunstancias, el crecimiento se vería afectado debido a que el transporte de las diversas fuentes de nitrógeno que se adicionan al medio de cultivo fuera impedido en presencia de glicina. A este respecto, es conveniente mencionar que si bien *S. cerevisiae* posee una permeasa general de aminoácidos, esta no transporta alantoína, ya que es una purina. Así mismo, la afinidad de esta permeasa por los diversos aminoácidos es diferente; además existen sistemas particulares de transporte para cada uno. Por otro lado, como se menciona en la Introducción, la actividad de la permeasa de alantoína es inducida por alofanato, que es un producto de la degradación de alantoína; por tanto, el transporte eficiente de la alantoína depende de su catabolismo, ya que solamente por esta vía se puede obtener alofanato. Los datos obtenidos para la mutante AL39 sugieren que esta cepa es una mutante regulatoria capaz de activar los sistemas catabólicos pertinentes aún en presencia de glicina.

El hecho de que esta cepa recupere un crecimiento normal aún en presencia de glicina en todos los com-

puestos nitrogenados que se probaron, sugiere que esta cepa pudiera estar afectada en un sistema de regulación general. Al igual que la cepa silvestre, esta cepa es incapaz de utilizar eficientemente a la glicina como única fuente de nitrógeno.

4.2.2. Serie AL. Clase II.

Seis mutantes de las 21 aisladas crecen muy bien en SN Gli, aún mejor que las de la clase I (Fig. 16).

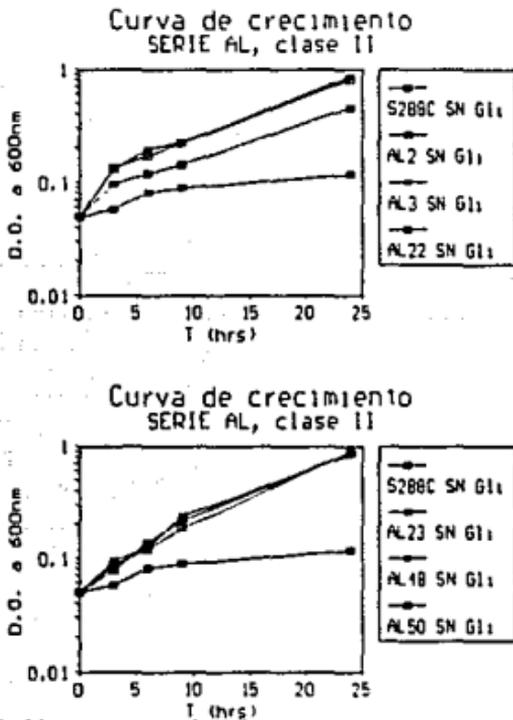


FIG. 16. Mutantes serie AL, clase II.

Esta clase agrupa a aquellas mutantes que disminuyen su tiempo de duplicación en SN Gli (540 minutos), aún cuando el crecimiento en este medio sigue siendo pobre. Otro rasgo fenotípico de este grupo de mutantes, que las distingue de la clase I, es

el hecho de que si bien son capaces de revertir el efecto de glicina sobre la utilización de varios compuestos nitrogenados, simultáneamente disminuyen su capacidad para crecer con algunos de estos compuestos suministrados como únicas fuentes de nitrógeno. Seleccionamos la mutante AL50 como representante de esta clase. Continuando con la esquematización del fenotipo, en la figura 17, se observa el fenotipo de esta mutante:

AL 50
en presencia de 20ml de glicina

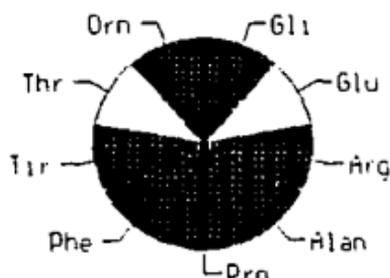


FIG.17. Esquema del fenotipo de la mutante AL50.

Es interesante notar que la mutante AL50 disminuye su tiempo de duplicación en algunas fuentes de nitrógeno y glicina, pero aumenta su tiempo de duplicación en la misma fuente, en ausencia de glicina. Las demás mutantes de esta clase aún no han sido sujetas a un análisis fenotípico completo; sin embargo, sabemos que su crecimiento disminuye en ausencia de glicina en diferentes compuestos nitrogenados.

En la tabla 8, se observan los tiempos de duplicación que presenta la mutante AL50. Nótese que tanto en SN Alantoína como en SN Arginina crece muy bien con o sin glicina. Sorprendentemente, en SN Prolina-Glicina, esta mutante revierte el fenotipo y de

un tiempo de duplicación de la cepa silvestre de más de 1000 minutos, la mutante AL50 se duplica cada 660 minutos. Sin embargo, al proporcionar prolina como única fuente de nitrógeno, mientras la cepa silvestre se duplica cada 195 minutos, la cepa AL50 tiene un tiempo de duplicación de 660 minutos. Efectos similares se observan en la utilización de ornitina, glutamato, treonina, tirosina y aspartato.

MEDIO	TIEMPOS DE DUPLICACION (minutos)	
	S288C	AL50
SN Alan	120	150
SN Alan-Gli	1020	150
SN Arg	120	120
SN Arg-Gli	400	120
SN Pro	195	660
SN Pro-Gli	1005	660
SN Orn	285	360
SN Orn-Gli	894	540
SN Glu	150	540
SN Glu-Gli	330	450
SN Tre	375	480
SN Tre-Gli	762	480
SN Tir	210	720
SN Tir-Gli	600	390
SN Asp	135	420
SN Asp-Gli	300	360

TABLA 8. Tiempos de duplicación estimados de crecimiento de la cepa AL50, comparada con los de la silvestre.

Las actividades enzimáticas que presenta esta cepa, se observan en la tabla 9.

Resultados y Discusión

<u>ACTIVIDAD ESPECIFICA DE ALANTOINASA^a</u>					
CEPA	SN Alan	SN Alan-Gli	NH ₄	SN Urea	SN UreaGli
S288C	37.00	7.12	0.652	19.13	2.08
AL50	35.80	56.80	0.747	10.90	22.63

<u>ACTIVIDAD ESPECIFICA DE GDH-NAD^b</u>			
CEPA	SN Glu	SN Glu-Gli	NH ₄
S288C	0.541	0.214	0.005
AL50	0.307	0.420	0.006

^amol de alantoato producido/min/mg de proteína.

^bmol de NAD_{oxidado}/min/mg de proteína.

TABLA 9. Actividad específica de alantoinasa y de GDH-NAD de las cepas S288C (silvestre) y AL50 (mutante).

Como se observa en esta tabla, la mutante AL50 presenta actividad de alantoinasa en presencia de glicina tanto en alantoína como en urea, que son sus inductores, pero no en amonio. De la misma manera, la actividad de glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD se observa en glutamato independientemente de la presencia de la glicina. La enzima no se activa en crecimientos en amonio como única fuente de nitrógeno, indicando que esta cepa no presenta una síntesis constitutiva de esta enzima.

Los datos obtenidos para la mutante AL50 sugieren que esta cepa está afectada en un sistema que regula el catabolismo de los compuestos que esta cepa es capaz de utilizar, aún en presencia de glicina. Así mismo, el hecho de que en la cepa AL50 el crecimiento en presencia de algunos aminoácidos como prolina, glutamato, etc., esté disminuído, sugiere la existencia de un sistema de control general del catabolismo nitrogenado.

4.2.3. Serie AL. Clase III.

De las cinco mutantes restantes, ninguna es capaz de crecer en glicina como única fuente de nitrógeno. Sin embargo, cada una presenta un fenotipo singular (Fig. 18, a, b, c, d y e).

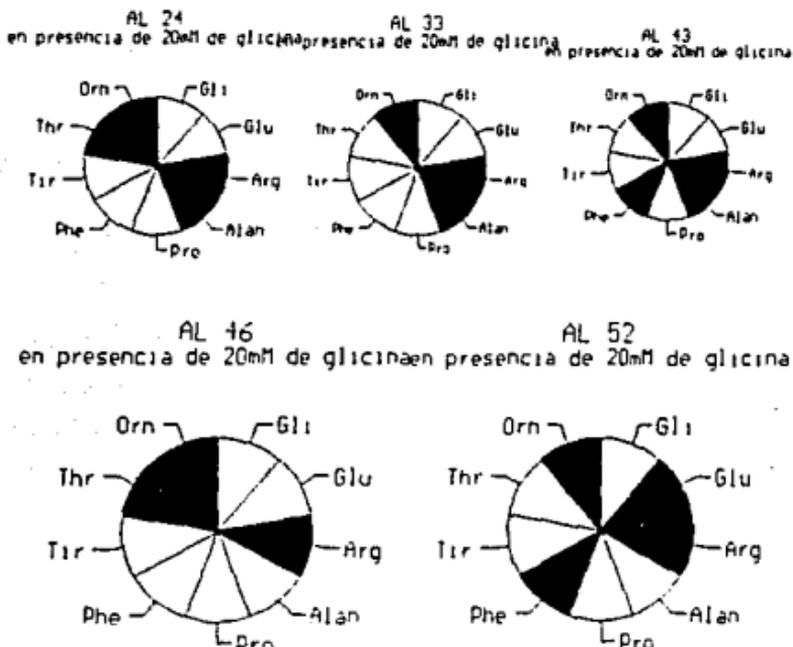


FIG. 18. Diagrama esquemático del fenotipo de crecimiento de las mutantes de la clase III: a. AL24; b. AL33; c. AL43; d. AL46; e. AL52.

La mutante AL24 es capaz de crecer en presencia de Glicina y los siguientes compuestos: Alantofina, Arginina, Ornitina y Treonina. Por su parte, la mutante AL33 es capaz de crecer con Glicina y Alantofina, Arginina y Ornitina. La mutante AL43 crece en Alantofina, Arginina, Fenilalanina y Ornitina, en presencia de Glicina. La mutante AL46 crece en Glicina con Arginina, Ornitina, y Treonina y la AL52 con Glicina y

Arginina, Fenilalanina, Ornitina y Glutamato. Estas dos últimas (AL46 y AL52) no son capaces de crecer en SN Alan-Gli. Las mutantes pertenecientes a esta clase, crecen igual que la cepa silvestre en cada uno de los compuestos nitrogenados, suministrados como únicas fuentes de nitrógeno.

Como se puede observar en la tabla 10, la actividad de GDH-NAD de estas cepas, medida en extractos obtenidos de cultivos de SN Glu-Gli, siempre es menor a la obtenida en extractos de cultivos crecidos en SN Glu, independientemente de que las cepas hayan o no recuperado la capacidad de crecer óptimamente en SN Glu-Gli. Este dato apoya la propuesta de Miller y Magasanik ((31), en el sentido de que debe existir otra vía para catabolizar el ácido glutámico hasta amonio.

CEPA	GDH-NAD ^a		ALANTOINASA ^b	
	SN Glu	SN Glu-Gli	SN Alan	SN Alan-Gli
S288C	0.540	0.214	37.00	7.12
AL24	0.388	0.096	48.17	15.93
AL33	0.334	0.204	46.99	20.30
AL43	0.287	0.137	28.77	2.33
AL46	0.658	0.287	45.67	14.18
AL52	0.338	0.052	N.D. ^c	N.D.

^amol de NAD_{oxidado}/min/mg de proteína.

^bmol de alantoato producido/min/mg de proteína.

^cN.D. = No determinado.

TABLA 10. Actividades enzimáticas de las mutantes de la clase III.

Por otro lado, si analizamos los niveles de actividad de alantoinasa de las mutantes, podemos ver que aún cuando las cepas AL24, AL33 y AL43 son capaces de crecer en SN Alan-Gli, presentan actividades variables de alantoinasa, inclusive menores a las encontradas

en la cepa silvestre en esta condición (ver el caso de la mutante AL43). Cabe mencionar que ninguna de ellas presenta actividades de la magnitud a las encontradas cuando únicamente se adiciona alantoína.

Por otro lado, la cepa AL46, que es incapaz de crecer en SN Alan-Gli, presenta, en esta condición, una actividad superior a la de la cepa silvestre y similar a la de la AL24 y AL33, que sí son capaces de crecer en SN Alan-Gli. Estos datos sugieren la existencia de otro punto de regulación en la vía de degradación de alantoína. Es decir, es probable que la glicina impida la activación de alguna otra enzima implicada en la degradación de la alantoína. En este caso, las mutantes AL24 y AL33, que se han liberado medianamente del efecto de la glicina sobre la alantoinasa, pudieran haberse liberado también en otra enzima de la vía catabólica y, por lo tanto, son capaces de crecer en SN Alan-Gli. La mutante AL43, a pesar de no haber liberado su alantoinasa, recuperó la actividad completa de la otra enzima catabólica, lo que le permite crecer en SN Alan-Gli.

La interpretación que le damos al caso de la mutante AL46, sería que la sólo liberación mediana observada en la alantoinasa, no es suficiente para recuperar el crecimiento, ya que la otra actividad catabólica podría permanecer reprimida.

En este contexto, mutantes como las descritas en los incisos anteriores (Serie AL, clases I y II), recuperan la capacidad de crecer en SN Alan-Gli, ya que en estas cepas la alantoinasa se induce en SN Alan-Gli al mismo nivel que en SN Alan.

Es interesante hacer notar que en esta selección de mutantes no se encontró ninguna que solamente se recuperara en SN Alantoina + Glicina. Esto sugiere que el sistema de control en el que participa la glicina no afecta un sistema particular del catabolismo de alantoina.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

Como se mencionó en la introducción, Miller y Magasanik (31), obtuvieron una mutante que presenta cinco veces menos actividad de GDH-NAD que la cepa silvestre, y sin embargo, su tiempo de duplicación al crecer en SN Glutamato es el mismo que el de la cepa silvestre. El fenotipo que hemos observado en la cepa S288C de *Saccharomyces cerevisiae*, de no crecer bien en SN Glu-Gli, se explicaría por el hecho de que presenta sólo la mitad de la actividad de glutamato deshidrogenasa catabólica con respecto a la expresada en crecimientos en glutamato como única fuente. Estos autores, a partir de los resultados que obtuvieron con esta mutante y otra, a la cual le interrumpieron el gene de GDH (mutante null), sugieren que el glutamato puede ser degradado por más de una vía; es decir, además de ser catabolizado vía GDH-NAD, puede ser transaminado a alanina, aspartato y prolina, explicando así el hecho de que estas mutantes, con poca o nula actividad de GDH, son capaces de crecer con el mismo tiempo de duplicación que una cepa silvestre. Nuestros datos indican que, en la cepa silvestre, la glicina impide la degradación del glutamato por la vía de GDH-NAD, pero también impide su catabolismo por las vías alternativas.

Es muy poco probable que todo este fenómeno se deba a que la glicina impida la asimilación de amonio vía glutamino sintetasa: nuestra principal evidencia es

la existencia de varias mutantes con diferentes fenotipos pleiotrópicos; si fuese un problema exclusivo de la asimilación de amonio, todas nuestras mutantes habrían adquirido la capacidad de asimilar amonio en presencia de glicina y por lo tanto, todas nuestras mutantes crecerían en todos los compuestos nitrogenados con y sin glicina; además, todas nuestras mutantes continúan teniendo una actividad de GS sensible a glicina.

De nuestros resultados, se desprende que la glicina está, de alguna manera, regulando negativamente la utilización de un grupo de compuestos nitrogenados: En presencia de un compuesto no metabolizable, como lo es la glicina, se impide la actividad de varias de las enzimas involucradas en la producción de amonio en la célula.

Utilizando este modelo, hemos logrado seleccionar algunas mutantes regulatorias que presentan alteraciones en su capacidad de utilizar una variedad de fuentes de nitrógeno. El estudio de estas mutantes, seguramente nos permitirá identificar un sistema regulatorio general, involucrado en la utilización de fuentes de nitrógeno. Sin embargo, es evidente que nuestro sistema de selección de mutantes no consideró el aislamiento de cepas alteradas en represión catabólica nitrogenada, sino en otros sistemas de regulación general del metabolismo nitrogenado, ya que de acuerdo a la definición de represión catabólica, la utilización de una fuente

primaria de nitrógeno impide la inducción de las enzimas necesarias para el catabolismo de fuentes secundarias. En el caso que estamos analizando, un compuesto que no es metabolizable, la glicina, impide la utilización de fuentes de nitrógeno primarias y secundarias.

A partir de la cepa S288C, hemos aislado mutantes resistentes a glicina, obteniendo una gran variedad de fenotipos:

i) Diez crecen en glicina, sin embargo, no son capaces de degradarla (Serie AL, clase I) (Tabla 8, resultados). En estas mutantes, la glicina ya no es capaz de impedir la activación de las enzimas degradativas de los diversos compuestos nitrogenados que ya hemos visto que son regulados por este metabolito. El liberarse del efecto de la glicina, sugiere fuertemente que es en sí misma, la molécula efectora encargada de la regulación.

ii) Seis de las mutantes constituyen un grupo particularmente interesante (Serie AL, clase II): Si efectivamente estamos ante un fenómeno de regulación negativa, en este grupo de mutantes el punto mutagenizado es precisamente el producto genético que regula negativamente la expresión de las enzimas involucradas.

Como se mencionó en resultados, estas mutantes son capaces de crecer con un bajo tiempo de duplicación en varios compuestos nitrogenados, en presencia o ausencia de la glicina; sin embargo, en otros compuestos nitrogenados, el tiempo de duplicación aumenta de dos a cuatro veces sin que haya glicina presente en el medio. En el caso de la mutante AL50, el tiempo de duplicación en SN Glutamato es cuatro veces mayor con respecto a la silvestre, y sin embargo, la actividad específica de GDH-NAD es ligeramente menor que la de la cepa silvestre (TABLA 9, resultados). Es decir, la mutación presente en esta cepa alteró la capacidad de catabolizar el ácido glutámico. Por otro lado, aún cuando en esta mutante el catabolismo de alantoína es resistente al efecto de glicina, esto no se traduce en un efecto sobre el catabolismo de alantoína en ausencia de glicina. Es indispensable determinar la actividad de las enzimas involucradas en la degradación de otros compuestos nitrogenados, cuyo catabolismo esté o no regulado por la glicina, en las mutantes de la clase *ii*. Esto nos permitirá determinar con mayor precisión qué sistemas catabólicos están regulados dentro de este circuito.

iii) Las siete mutantes restantes (G2, 12G, y serie AL clase III: AL24, AL33, AL43, AL46 y AL52) constituyen, cada una, un fenómeno de desregulación particular: En el caso de la mutante G2, sabemos que a pesar de no lograr inducir su GDH-NAD, logra crecer en SN Glu-Gli, probablemente porque el glutamato transamina produciendo otro compuesto cuyo

catabolismo no es regulado por la glicina. Del mismo modo, la 12G es capaz de crecer en arginina, ornitina y glutamato en presencia de glicina, pero no en otros compuestos cuando hay glicina en el medio. El estudio genético de estas mutantes, permitirá establecer grupos de complementación, lo cual nos conducirá a establecer cuántos genes están implicados en esta regulación.

Sin embargo, hay características de las mutantes de la serie AL (clase III) que cabe destacar: todas son capaces de crecer en arginina y ornitina haya o no glicina en el medio, y ninguna es capaz de crecer con un tiempo de duplicación parecido al de la silvestre en tirosina como única fuente de nitrógeno.

Por otro lado, dos de las mutantes de la serie AL, la AL46 y la AL52, sorprendentemente no son capaces de crecer en Alantoina + Glicina como fuentes de nitrógeno, a pesar de que fueron seleccionadas precisamente en un medio conteniendo SN Alantoina-Glicina. Esto se explica por el hecho de que si bien es cierto que contamos con un medio para la selección de mutantes regulatorias en el circuito nitrogenado, el método presenta algunos problemas de tipo práctico, ya que no es fácil seguir un fenotipo de crecer con diferentes tiempos de duplicación en medio sólido; así, la existencia de las mutantes AL46 y AL52 es casi una casualidad: seguramente, las colonias seleccionadas en la mutagénesis crecieron sutilmente más que las del fondo. De hecho, en cada mutagénesis, se seleccionaron decenas de mutantes que, en el análisis

fenotípico, resultaron ser falsas positivas.

Con esta tesis, no se pretende dar una explicación de cuál es el significado fisiológico de que la glicina regule negativamente la utilización de compuestos nitrogenados. Queremos hacer incapié en que gracias a este fenómeno de regulación negativa, hemos conseguido identificar la existencia de un circuito regulatorio general, que no es represión catabólica nitrogenada y que aún no ha sido descrito en *Saccharomyces cerevisiae*. Nuestro objetivo ahora es caracterizar este circuito regulatorio cuya existencia ha quedado evidenciada al aislarse las mutantes del tipo AL50.

En la introducción, hemos enumerado varios genes de control que regulan la expresión genética de las enzimas involucradas en la degradación de compuestos nitrogenados.

Es claro que estas proteínas regulatorias son activas promoviendo la expresión genética bajo ciertas condiciones celulares, e inactivas en otras. Es razonable suponer que los cambios en la actividad transcripcional son modulados por los cambios intracelulares en los niveles de las moléculas efectoras (FIG. 19).

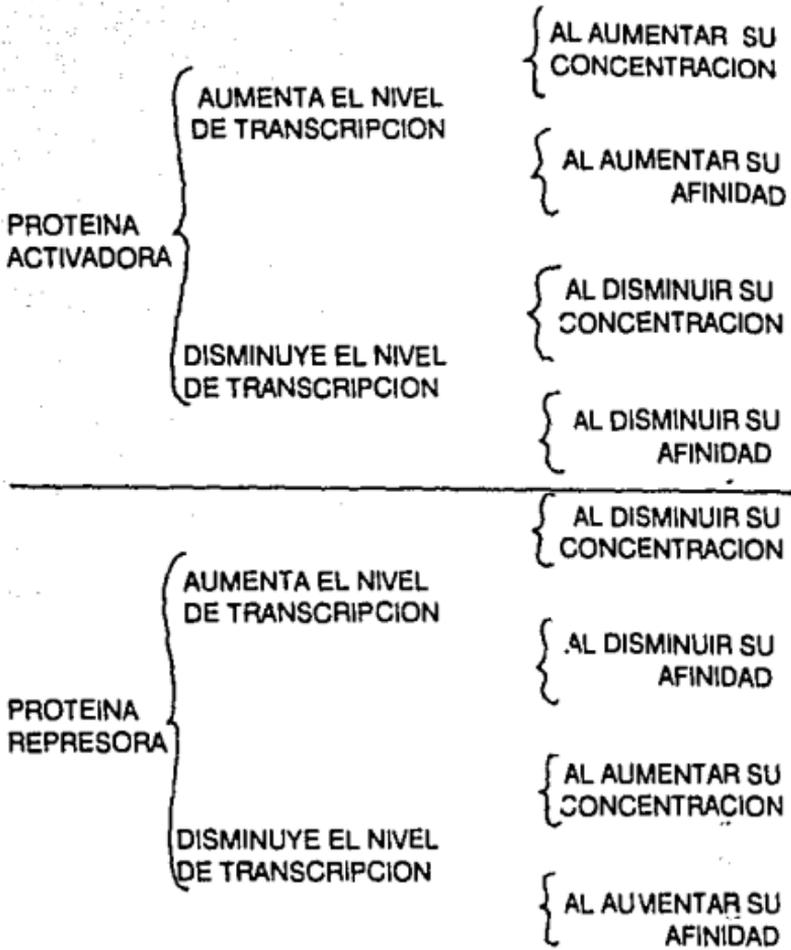


FIG. 19. Modulación de la expresión genética.

La regulación de la expresión de genes estructurales involucra la interacción entre los elementos específicos localizados en dirección 5' del gene con proteínas regulatorias que se unen a estas secuencias específicas de regulación (42). Cuando nos referimos a la degradación de alantoina, se explicó la existencia de un gene regulatorio, *dal7*, cuya expresión es dependiente de la presencia del inductor, y su región regulatoria ya ha sido descrita (43). Los autores proponen dos mecanismos a través de los cuales podría actuar la regulación de la transcripción de este

gene (FIG. 20, a y b):

a) El primer modelo sugiere que uno de los elementos que actúa en *cis*, el UAS, funciona como sitio blanco para un factor que actúa positivamente activando la transcripción de manera independiente del inductor. Una segunda región, URS, funciona como sitio blanco para un factor que actuaría negativamente bloqueando la función de el o los factores que se uniesen a UAS. La tercera región, UIS, funcionaría como sitio blanco de otro factor de acción negativa que inhibiría la función del factor unido a URS. La existencia de un factor unido a UIS requeriría la presencia del inductor. En este modelo, la inducción es resultado de la suma de dos eventos de regulación negativa.

b) El factor asociado a UIS podría mediar la inducción a través de incrementar la activación regulada por UAS en el momento en que una proteína reguladora se una a la secuencia URS. En este caso, la inducción depende de la interacción con el activador.

Por otro lado, otro gene del sistema *DAL*, *dal5*, que codifica para la permeasa de ácido alantoico, cuya expresión es independiente del inductor, ya ha sido mapeado (35). Ha diferencia de *dal7*, *dal5* sólo tiene un elemento de regulación en su región 5', UAS (upstream activation sequence), lo que correlaciona con el hecho de que este gene no responde al sistema de inducción de alantoína (FIG. 20, c).

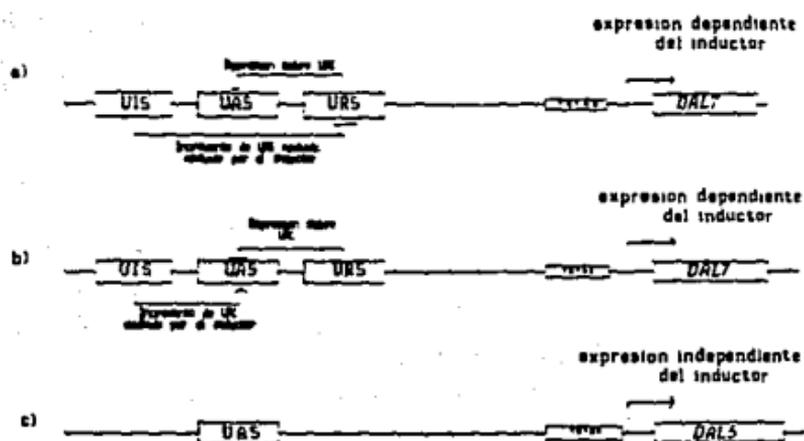


FIG.D.3. Modelos para explicar los elementos del promotor del gene inducible *dai7* (a y b), y del gene constitutivo *dai5* (c) de *Saccharomyces cerevisiae*.

La existencia de estos elementos de control genético en *Saccharomyces cerevisiae* dan validez a la existencia de un mecanismo regulatorio general como el que estamos estudiando.

Para llevar a cabo un análisis que nos permita

Identificar en efecto un circuito regulatorio general, debemos, en primer lugar, concluir la exploración fenotípica de la mutante AL50: la mutante sólo fué crecida en aquellos compuestos nitrogenados que son claramente regulados en presencia de glicina; pretendemos ahora, estudiar la velocidad de crecimiento, con respecto al de la cepa silvestre, en todos aquellos compuestos que *Saccharomyces cerevisiae* pueda utilizar como fuente de nitrógeno. Esto nos permitirá aproximarnos a saber qué genes son los que estarían siendo regulados dentro de este circuito.

Por otro lado, contamos con otras cinco mutantes de tipo regulatorio cuya exploración fenotípica apenas ha sido iniciada.

Así mismo, si bien es cierto que es altamente probable que la mutación AL50 sea monogénica, dado el efecto pleiotrópico del fenotipo, debemos realizar las cruza genéticas necesarias para demostrarlo. Como se mencionó en resultados, la cepa silvestre S288C tiene la peculiaridad de que su permeasa general de aminoácidos no es regulada por amonio; otras cepas silvestres no presentan esta característica: la glicina no regula la utilización de compuestos nitrogenados probablemente debido a que no se permite su entrada a la célula. Por ello, debemos cambiar el "mating type" de la cepa S288C para poder cruzarla con nuestras mutantes. Al estudiar la segregación genética, podremos establecer a cuántas mutaciones se debe el fenotipo observado y la relación de dominancia/recesividad de la mutación, y definir a cuántos grupos de complementación pertenecen nuestras

mutantes.

Todo esto, nos conducirá a establecer las condiciones mediante las cuales podremos clonar el gene regulatorio silvestre. Contamos con el medio de selección adecuado, ya que la mutante AL50 no es capaz de crecer en prolina como única fuente de nitrógeno; al transformar contra un banco de nuestra cepa silvestre será fácil seleccionar transformantes. Una vez teniendo clonado el gene regulatorio, llevaremos a cabo una interrupción génica con el fin de poder estudiar más finamente su regulación.

FIN

BIBLIOGRAFIA

1. Arst, H.N. and Cove, D.J. (1973). Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **126**: 111 - 141.

2. Arst, H.N., and Scazzocchio, C. (1985). Formal genetics and molecular biology of the control gene expression in *Aspergillus nidulans*, in *Gene Manipulations in Fungi*. Academic Press, Inc.

3. Bossinger, J., Lawther, R.P. and Cooper, T.G. (1974). Nitrogen repression of the allantoin degradative enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **118**: 821 - 829.

4. Bricmont, P.A. and Cooper, T.G. (1989). A gene product needed for induction of allantoin system genes in *Saccharomyces cerevisiae* but not for their transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 3869 - 3877.

5. Bysani, N., Daugherty, J.R. and Cooper, T.G. (1991). Saturation mutagenesis of the $UAS_{NTR}(GATAA)$ responsible for nitrogen catabolite repression-sensitive transcriptional activation of the allantoin pathway genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **173**: 4977 - 4982.

6. Chisholm, G. and Cooper, T.G. (1982). Isolation and characterization of mutants that produce the allantoin-degrading enzymes constitutively in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **2**: 1088 - 1095.

7. Cooper, T.G. (1982). Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, in Strathern, J.N., Jones, E.W. and Broach, J.R. (Eds.). The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, vols. 1 y 2. Cold Spring Harbor Laboratory.

8. Cooper, T.G. and Lawther, R.P. (1973). Induction of the allantoin degradative enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* by the last intermediate of the pathway. Proc. Natl. Acad. USA. 70: 2340 - 2344.

9. Cooper, T.G., Ferguson, D., Rai, R. and Bysani, N. (1990). The *GLN3* gene product is required for transcriptional activation of allantoin system gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 172: 1014 - 1018.

10. Cooper, T.G., Gorski, M. and Turoscy, V. (1979). A cluster of three genes responsible for allantoin degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 92: 383 - 396.

11. Courchesne, W.E. and Magasanik, B. (1988). Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*: Roles of the *URE2* and *GLN3* genes. J. Bacteriol. 170: 708 - 713.

12. Davis, M.A. and Hynes, M.J. (1987). Complementation of *areA*⁻ regulatory gene mutations of *Aspergillus nidulans* by the heterologous gene *nit-2* of *Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 3753 - 3757.

13. Ferguson, A.R. and Sims, A.P. (1974). J. Gen. Microbiol. 80: 173 - 183.

14. Davis, M.A. and Hynes, M.J. (1989). Regulatory genes in *Aspergillus nidulans*. TIG 5: 14 - 19.
15. Drillien, R., Aigle, M. and Lacroute, F. (1973). Yeast mutants pleiotropically impaired in the regulation of the two glutamate dehydrogenases. Biochem. Biophys. Res. Comm. 53: 367 - 372.
16. Fink, G.R. (1970). Meth. Enzymol. 16: 58 - 78.
17. Fu, Y.H. and Marzluf, G.A. (1990). Site-directed mutagenesis of the "zinc finger" DNA-binding domain of the nitrogen-regulatory protein NIT2 of *Neurospora*. Mol. Microbiol. 4: 1847 - 1852.
18. González, A. (1982). Una mutante de *Neurospora crassa* alterada en la regulación por glutamina. Tesis de Maestría. UACPyP-CCH.
19. González, A., Rodríguez, L., Folch, J., Soberón, M. and Olivera, H. (1987). Coordinated regulation of ammonium assimilation and carbon catabolism by glioxilate in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 133: 2497 - 2501.
20. González, Alicia. Regulación del catabolismo de arginina en *Neurospora crassa* y en *Saccharomyces cerevisiae*, en Caminos en la biología experimental
21. Guerrero, S. (1988). Regulación de la degradación del ácido glutámico por glicina en *S. cerevisiae*. Tesis de Licenciatura, UACPyP-CCH.
22. Hemmings, B.A. and Sims, A.P. (1977). The regulation of glutamate metabolism in *Candida utilis*. Eur. J. Biochem. 80: 143 - 151.

ESTA TESIS NO
SALIR DE LA BIBLIOTECA

23. Hernández, G., Mora, Y. y Mora, J. (1986). Regulation of glutamine synthesis by glycine and serine in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 165: 133 - 138.
24. Large, P.J. (1986). Degradation of organic nitrogen compound by yeasts. YEAST 2: 1 - 34.
25. Lee, K.W. and Roush, A.H. (1964). Allantoinase assays and their application to yeast and soybean allantoinases. Arch. Biochem. Biophys. 108: 460 - 467.
26. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265 - 275.
27. Marzluf, G.A. and Fu, Y.H. (1988). Genetic and metabolic regulation of nitrogen metabolism in *Neurospora crassa*, in Nitrogen Source Copntrol of Microbial Processes. Sergio Sánchez-Esquivel, Ed., CRC Press, Inc.
28. Marzluf, G.A. and Fu, Y.H. (1990). Site-directed mutagenesis of the "zinc finger" DNA-binding domain of the nitrogen regulatory-protein NIT2 of *Neurospora*. Mol. Microbiol. 4: 1847 - 1852.
29. Marzluf, G.A. (1981). Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. Microbiol. Rev. 45: 437 - 498.
30. Marzluf, G.A., Perrine, K.G. and Nahm, B.H. (1985). Genetic regulation of nitrogen metabolism in *Neurospora crassa*, in Molecular Genetics of Filamentous Fungi. Timberlake, W.E., Ed., A.R. Liss, New York.

31. Miller, S.M. and Magasanik, B. (1990). Role of NAD-linked glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 172: 4927 - 4935.

32. Mitchell, A.P. and Magasanik, B. (1984). Regulation of glutamine-repressible gene products by the *GLN3* Function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 4: 2758 - 2766.

33. Mitchell, A.P. and Magasanik, B. (1984). Three regulatory systems control production of glutamine synthetase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 4: 2767 - 2773.

34. Olive, M.G., Daugherty, J.R. and Cooper, T.G. (1991). *DAL82*, a second gene required for induction of allantoin system gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 173: 255 - 261.

35. Rai, R., Genbauffe, F.S. and Cooper, T.G. (1988). Structure and transcription of the allantoin permease gene (*DAL5*) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 170: 266 - 271.

36. Roon, R.J. and Even, H.L. (1973). Regulation of the nicotinamide adenine dinucleotide and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 116: 367 - 372.

37. Rytka, J. (1975). Positive selection of general amino acid permease mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 121: 562 - 570.

38. Struhl, K. (1987). Promoters, activator proteins, and the mechanism of transcriptional initiation in yeast. *Cell* **49**: 295 - 297.

39. Taho, N.M., Sealy-Lewis, H.M. and Scazzocchio, C. (1984). Suppressible alleles in a wide domain regulatory gene in *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics* **8**: 245 - 251.

40. Tomsett, A.B. and Garrett, R.H. (1981). Biochemical analysis of mutants defective in nitrate assimilation in *Neurospora crassa*: Evidence for autogenous control by nitrate reductase. *Mol. Gen. Genet.* **184**: 183 - 190.

41. Turoscy, V. and Cooper, T.G. (1982). Pleiotropic control of five genes by multiple regulatory elements. *J. Bacteriol.* **151**: 1237- 1246.

42. Wiame, J.M. (1971), en *Current Topics in Cellular Regulation*, edit. Horecher, B.L. and Stadman, E.R. **4**: 1 - 38. Academic Press, N.Y. .

43. Yoo, H.S. and Cooper, T.G. (1989). The *DAL7* promoter consist of multiple elements that cooperatively mediate regulation of the gene's expression. *Mol. Cel. Biol.* **9**: 3231 - 3243.