

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA



REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE  
ARGININA POR OTROS AMINOACIDOS  
EN EL HONGO Neurospora crassa

T E S I S

Que Para Obtener el Título de

Q U I M I C O

P r e s e n t a

MANUEL ARTURO CARDOSO VALDES

México, D. F.

1978



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

TESIS 1978

AD \_\_\_\_\_  
ABE M. 89 77  
FECHA \_\_\_\_\_  
PROC \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE ARGININA POR OTROS  
AMINOACIDOS EN EL HONGO Neurospora crassa

MANUEL ARTURO CARDOSO VALDES

1978

JURADO

PRESIDENTE DR JAIME MORA CELIS

VOCAL M en C CARMEN QUINTO

SECRETARIO DR RAFAEL PALACIOS

1er SUPLENTE BIOL GERARDO KONO

2do SUPLENTE BIOL MARISOL LOPEZ

DESARROLLO DEL TEMA INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
BIOMICAS

SUSTENTANTE MANUEL ARTURO CARDOSO VALDES

ASESOR DEL TEMA DR JAIME MORA CELIS

A mis padres con todo mi cariño.

Mi agradecimiento al Dr. Jaime Mora por el apoyo y la dirección que me brindó en la realización de este trabajo.

Agradezco a la Química Yolanda Mora y a la Biol. Guadalupe Espin su valiosa colaboración técnica.

## INTRODUCCION.

Neurospora crassa es un hongo de la clase ascomice--  
tos, cuyas cepas silvestres pueden crecer en un medio mí-  
nimo en el que este presente una fuente de carbono y de  
nitrógeno, algunos elementos en cantidades traza, y la --  
vitamina biotina. Como fuente de carbono puede utilizar  
succinato, glicerol, glucosa, otros monosacáridos y algu-  
nos oligo y polisacáridos. El nitrógeno puede ser propor-  
cionado como nitrato, nitrito, amonio o en forma de nitró-  
geno amino.

Neurospora crassa es un organismo, que a diferencia  
de los organismos procariotes tienen: a) mayor tamaño, b)  
organelos celulares como: mitocondrias, vacuolas, etc.,  
c) núcleo definido por una membrana nuclear, d) más de --  
un cromosoma, e) una membrana celular más compleja (con -  
colesterol) y f) se reproduce sexualmente.

La fase vegetativa de Neurospora crassa esta consti-  
tuida por filamentos ramificados multinucleados, llamados  
hifas, las que estan segmentadas por septos que contienen  
poros y que permiten el paso de nucleos y citoplasma. Los  
nucleos se dividen por mitosis y al conjunto de hifas se  
le llama micelio.

En ciertas condiciones de limitación de nutrientes y de deshidratación, los extremos de las hifas se segmentan y forman esporas. A su vez las esporas (conidias) en un medio acuoso y en presencia de los nutrientes adecuados, germinan para dar micelio.

Neurospora crassa además se reproduce sexualmente a través de la participación de dos cepas de diferente tipo sexual ( A y a ) en la cual las esporas de un tipo se -- usan para inocular (fertilizar) cultivos diferenciados - sexualmente (protoperitocio) del otro tipo. Estas caracte rísticas de Neurospora crassa han permitido realizar el - análisis genético y bioquímico más completo de un eucario te. (Vogel y Kopac 1959)

Una cepa silvestre de Neurospora crassa en un medio mínimo, sintetiza los 20 aminoácidos que son incorporados en proteínas. En el caso del aminoácido arginina, se han - identificado la mayor parte de las enzimas que participan en su síntesis y su catabolismo, e igualmente se han encon trado las mutantes correspondientes a la ausencia de cada una de ellas.

En la fig. 1 se esquematiza la vía biosintética y ca tabólica de arginina.

En Neurospora crassa, el aminoácido arginina es sintetizado a partir de la glutamina. Este aminoácido en una reacción catalizada por la enzima carbamil fosfato sintetasa específica de arginina (Davis y col 1967) cede su nitrógeno amino para formar carbamil fosfato y ácido glutámico. El ácido glutámico forma ornitina, a través de un ciclo de reacciones en el cual participan cuatro diferentes enzimas (fig. 1).

La enzima ornitino transcarbamilasa, cataliza la reacción de condensación entre carbamil fosfato y ornitina - produciéndose citrulina y fósforo inorgánico.

En el siguiente paso, citrulina y ácido aspártico se condensan formando el ácido arginino succínico, siendo esta reacción catalizada por la enzima arginino succínico - sintetasa dependiente de ATP y Mg<sup>++</sup>.

En la última reacción de esta vía, la enzima arginino succinasa cataliza la eliminación de ácido fumárico -- del ácido arginino succínico para producir arginina.

En la vía catabólica de arginina la enzima arginasa cataliza la hidrólisis de este aminoácido para formar -- ornitina y urea.

La ornitina producida, transamina con el ácido --  $\alpha$  ceto glutárico formándose ácido glutámico, y el semialdehído del ácido glutámico, siendo esta reacción catalizada por la enzima - ornitino  $\delta$  transaminasa.

El semialdehído del ácido glutámico se cicliza espontáneamente formándose el ácido  $\Delta^1$ , pirrolín carboxílico, que por último es convertido enzimáticamente en el aminoácido prolina.

En Neurospora crassa, la arginina acumulada intracelularmente, proveniente del medio de cultivo, interrumpe la biosíntesis endógena de este aminoácido, debido a que modula negativamente la síntesis de los intermediarios de la vía, ornitina y carbamil fosfato y además induce su -- catabolismo.

Los datos que apoyan lo anterior son los siguientes:

a).- Una doble mutante de Neurospora, la pyr-3a;arg-12<sup>s</sup>, incapaz de sintetizar carbamil fosfato específico -

para síntesis de pirimidinas, y con un bloqueo parcial en la enzima ornitino transcarbamilasa (OTC), crece en medio mínimo y no en presencia de arginina (Davis y Woodward -- 1962).

b).- Williams y col (1971) han demostrado que la doble mutante arriba mencionada, crece en medio mínimo debido a la elevación en la poza de carbamil fosfato específico de la vía, esta elevación permite a este metabolito el ser usado también como precursor de pirimidinas. El bloqueo de la enzima OTC, que tiene esta mutante, es el causante de que al disminuir la poza de arginina, se aumente la síntesis de la enzima que cataliza la formación de carbamil fosfato precursor de arginina. En presencia de arginina en el medio de cultivo, esta cepa no crece debido a que la enzima mencionada se sintetiza en menor cantidad, lo cual hace disminuir la poza de carbamil fosfato.

c).- La cepa mutante aga de Neurospora, deficiente en la actividad de arginasa, es inhibida en su crecimiento, si en el medio esta presente el aminoácido arginina. Esta inhibición se revierte si al medio se le adiciona putrescina o espermidina (Davis y Col 1970).

Los resultados anteriores han sido interpretados por Davis como que una cepa que carece de arginasa, en presencia de arginina, se empobrece de ornitina. Este aminoácido es precursor de la espermidina y la putresina, metabolitos que son indispensables para el crecimiento del hongo. La depleción de ornitina que ocurre en presencia de arginina es el resultado de la ausencia de arginasa y de el retrocontrol negativo que la arginina ejerce sobre la síntesis de ornitina a partir del ácido glutámico.

Los datos presentados, indican que en presencia de arginina en el medio de cultivo, se cierra la biosíntesis de este aminoácido y se induce su catabolismo.

La cepa arg-8 de Neurospora crassa es un auxótrofo de prolina, y crece si al medio se le agrega dicho aminoácido (Castañeda y col 1967; Vogel y Bonner 1954). Esta mutante también crece en arginina y ornitina, como resultado de la acción de una permeasa para aminoácidos básicos (Sánchez y col 1972), una arginasa (Castañeda y col 1967; Davies y col 1970) y una ornitino transaminasa (Davis y Mora 1969). Estas funciones conducen a la formación de ácido glutámico y del semialdehído de este ácido, siendo -

éste último un precursor de prolina, el cual la cepa arg-8 no es capaz de sintetizar por la vía biosintética normal.

Es una paradoja que la cepa arg-8 no utilice, como precursores de prolina, la ornitina y la arginina endógenamente sintetizadas, más aún, hemos encontrado que esta cepa, cuando se incuba en un medio mínimo acumula arginina que no es catabolizada.

En este trabajo reportaré la acumulación de los aminoácidos glutamina y arginina, que ocurre cuando Neurospora crassa es deprivada de un aminoácido.

MATERIAL Y METODOS.

CEPAS.-

Todas las cepas que se utilizaron en el presente trabajo provienen del Fungal Genetics Stock Center en Dartmouth College, Hanover N.H., U.S.A. y de la colección particular del Dr. Jaime Mora. Las dobles mutantes fueron obtenidas después de realizar las cruizas correspondientes.

Las cepas son las siguientes:

arg-8, prol-4 y prol-1 auxótrofos de prolina

arg-5 y arg-6 auxótrofos de arginina

trip-1, trip-2, trip-3 y trip-4 auxótrofos de triptófano

his-3 e his-6 auxótrofos de histidina

phe-1 auxótrofo de fenilalanina

tir-1 auxótrofo de tirosina

arom auxótrofo de aminoácidos aromaticos (fenilalanina y triptófano)

iv-1 auxótrofo de isoleucina y valina

val-1 auxótrofo de valina

lis-1 auxótrofo de lisina

pyr-3 auxótrofo de uridina

Dobles mutantes

arg-5 ; arg-8

arg-6 ; arg-8

prol-4; trip-2

pyr-3a ; arg-8

Medios:

Para los experimentos de crecimiento en medio líquido, N.crassa se creció en el medio mínimo N de Vogel (Vogel 1956) al 2% suplementado con sacarosa al 1.5% ó glicérol al 2%.

El medio de Vogel contiene por litro de agua bidestilada:

$\text{Na}_3\text{citrato} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	150 g.
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	250 g.
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	100 g.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 g.
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5 g.
Sol. de Biotina*	5 ml.
Sol. Elementos traza**	5 ml.

\* La solución de biotina se prepara disolviendo 5 mg. de biotina en 100 ml. de agua.

\*\* La solución de elementos traza contiene por 100 -  
ml. de agua bidestilada:

Ac. cítrico.H <sub>2</sub> O	5 g.
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5 g.
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1 g.
CuSO .5H <sub>2</sub> O	0.25 g.
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.05 g.
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.05 g.
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.05 g.

Finalmente se añade 5 ml. de cloroformo por litro -  
de medio como preservativo.

Para el medio mínimo SN (sin nitrógeno) no se añade  
NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; y en los elementos traza en vez de Fe (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)  
2 6H<sub>2</sub>O, se añade la misma cantidad de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.

Condiciones de crecimiento:

Las esporas usadas como inóculo en los experimentos  
de crecimiento en medio líquido, fueron recogidas de ma-  
traces erlenmayer (250 ml) con 50 ml. de medio mínimo de  
Vogel (MM) con sacarosa al 1.5% y agar al 1.5%. Estos -  
matraces fueron inoculados con esporas y después de ser

incubados por tres días en la oscuridad a 29°C. y dos -- días con iluminación a 25°C., se les agrega agua estéril (15-25 ml); la solución de esporas fue filtrada en un tubo de vidrio (15 x 1.5 cm) que contiene lana de vidrio y el filtrado, usado como inóculo.

Para los experimentos de crecimiento en medio líquido, se usaron 200 ml. de MM de Vogel suplementado con sacarosa al 1.5% contenidos en un matraz de florencia de -- 250 ml., al que se le ponen dos tubos de vidrio (22 x 0.05 cm) para burbujear aire, que se sostienen con el tapón de algodón del matraz y se introducen hasta 1 cm. arriba del fondo. Estos matraces son inoculados con una suspensión -- de esporas para obtener una absorbancia de 0.04 a 540 Mu de con celdilla de 10 x 1.5 cm. en un colorímetro ---- Bausch and Lomb. Los matraces son incubados en un baño de agua a 25°C, a través de los tubos de vidrio se introduce una corriente de aire hidratado que aerea y agita.

### Cruzas

Las cruzas fueron hechas en tubos de medio sólido con Corn Meal Agar (Difco) al 1.7%. Las esporas de un tipo -- sexual se inoculan y se incuban en la oscuridad a 25°C.; entre los 5 y los 8 días aparece el protoperitecio que es

fertilizado con esporas del otro tipo sexual. Después de incubar a 25°C. de 10 a 15 días en la oscuridad, los tubos son expuestos a la luz 2 días y las ascosporas resultantes son suspendidas en 5 ml. de agua, que es filtrada en una columna de vidrio (semejante a la descrita anteriormente) el filtrado se centrifuga 10 minutos a 2000 r.p.m. en una centrifuga clínica y después de decantar el sobrenadante, el paquete de ascosporas es activado 30 minutos en un baño de aceite a 60°C. Después de suspender las ascosporas en 2 ml. de agua y agitar, se toma una muestra (0.1 a 0.3 ml.) la que se ve al microscopio para calcular una dilución que permita platear de 40 a 80 ascosporas por placa.

La ascosporas activadas se platean en MM de Vogel con glucosa al 0.05%, sorbosa al 1% y agar al 2%. Las ascosporas germinadas después de 24 horas de incubación son disecadas individualmente y pasadas cada una a un tubo (7 x 1 cm) con MM de Vogel con sacarosa al 1.5% y agar al 1.5%. Después de incubados los tubos 5 días a 29°C., con un palillo de madera húmedo se toma una muestra de esporas de cada tubo, la que se siembra en líneas de 3 cm. sobre placas con MM de Vogel con sorbosa al 0.8%, sacarosa

al 0.4% y agar al 1.5% ; estas placas son incubadas a 29° C. y se registra al crecimiento macroscópico a 24 y 48 horas.

Determinación de la protefna:

Para determinación de protefna, las muestras de los cultivos se colectan en filtros membrana (millipore tipo HA 0.45 u), se lavan con dos volúmenes de H<sub>2</sub>O destilada y se introducen en 2 ml. de ácido tricloroacético al 5%. Se centrifuga 10 minutos a 2000 r.p.m. a 4°C.; y el precipitado se resuspende en NaOH 1 N. De esa suspensión se toma alícuota para la determinación de protefna por el método Lowry (Lowry y Col 1951)

Determinación de la poza de arginina:

De la misma muestra que se toma para la determinación de protefnas, después de la precipitación se toma una alícuota del sobrenadante para la determinación colorimétrica de la arginina por el método de Van Pilsun (Van Pilsun y Col 1956).

Determinación de pozas de otros aminoácidos:

Las muestras se colectan en filtros millipore y se sumergen en 5 ml. de ácido pícrico al 1% ; después de centrifugar, 10 minutos a 2000 r.p.m. a 4°C. el sobrenadante se pasa a través de una columna con resina Dowex AG1X2 -- (malla 200-400), (1.5 x 2 cm) previamente equilibrada con agua. Se eluye con 7 ml. de HCL 0.02 N y 2 ml. de H<sub>2</sub>O, y el eluato es neutralizado con 1 ó 2 gotas de NaOH 1N, éste después de liofilizado es disuelto en 0.5 ml. de HCl - 0.1N y es pasado por un analizador de aminoácidos technicon.

Determinación de la poza de ornitina:

Las muestras se colectan en filtros millipore y se sumergen en 5 ml. de ácido pícrico al 1%, después de centrifugar 10 minutos a 2000 r.p.m. a 4°C., el sobrenadante se pasa a través de una columna con resina Dowex AG 1 X 2 (malla 200-400) de 1.5 x 2 cm., previamente equilibrada con agua. Se eluye con 7 ml. de HCl 0.02 N. y 2 ml. de H<sub>2</sub>O, el eluato se neutraliza, y se pasa por una columna con resina Dowex 50W-X8, (malla 200-400) de 1.2 x 7 cm., previamente equilibrada con 30 ml. de formiato de amonio 0.1 M.

Se eluye ornitina con 30 ml. de formiato de amonio 0.3 M. La ornitina se determina colorimétricamente por el método de Chinard (Chinard 1952).

## RESULTADOS

### Acumulación de arginina durante la deprivación de aminoácidos.

Cuando las conidias del auxótrofo de prolina arg-8 son incubadas en medio mínimo, acumulan arginina intracelularmente (gráfica 1). La acumulación de este aminoácido empieza inmediatamente después de la deprivación, y - 12 horas después cesa, a concentraciones que son por lo menos 20 veces mayores que la presente en el inóculo.

La acumulación de arginina por las conidias, es la consecuencia de un proceso biosintético, lo que es demostrado por la ausencia de acumulación en los auxótrofos sencillos arg-5 y arg-6 y los dobles auxótrofos arg-5; arg-8 y arg-6;arg-8 (gráfica 1).

Cuando otros auxótrofos de aminoácidos son incubados en medio mínimo, también acumulan arginina (tabla 1). De nuevo, cuando además en uno de estos auxótrofos está también presente, la mutación arg-5, no se observa acumulación.

Cuando los auxótrofos están creciendo en presencia - del aminoácido que requieren, o cuando actidiona, un inhibidor de síntesis de protefmas, está presente durante la deprivación, no se observa acumulación de arginina (tabla II).

La ornitina, un precursor de la arginina, no se encontró acumulada cuando conidias de los auxótrofos sencillos arg-8 y trip-2 se incubaron en medio de Vogel.

La deprivación en las conidias de otros nutrientes - esenciales, como la deprovación de uridina en la cepa auxotrófica pir-3a, no da por resultado acumulación de arginina en medio de Vogel, ni cuando se usó glutamina como - única fuente de nitrógeno.

Los datos presentados, muestran que durante la deprivación de aminoácidos en las conidias, la arginina que - proviene de biosíntesis se acumula. Esta acumulación requiere de que cierta síntesis de protefmas sea llevada a cabo.

#### Acumulación de glutamina durante la deprivación de aminoácidos.

Para saber si otros aminoácidos además de arginina,

se acumulaban durante la deprivación, se incubaron conidias de la cepa arg-8 durante 10 horas en medio mínimo, y el extracto soluble en ácido se pasó a través de un analizador de aminoácidos (ver métodos). Los resultados se muestran en la tabla III, de dónde se puede calcular que después de la deprivación hay un aumento de 4.5 veces en el nitrógeno amino, del cual el 32.6 % está en arginina y el 21.9 % en glutamina. En el inóculo el 18.1 % está en arginina y el 14.5 % en glutamina. La concentración de ácido glutámico aumentó sólo 2 veces después de la deprivación y el nitrógeno amino acumulado en este aminoácido es el 9 % en el inóculo y el 12 % después de la deprivación.

Resultados similares fueron obtenidos en el aminograma de un extracto libre de células de la mutante trip-2. En relación a la acumulación de glutamina y arginina se debe mencionar que el primer aminoácido es el sustrato de la vía biosintética de arginina, lo que se discutirá más adelante.

#### Catabolismo de arginina durante la deprivación de aminoácidos.

Ya que la mutante arg-8 no crece en condiciones dónde

glutamina y arginina se acumulan, se concluye que el último aminoácido no se cataboliza durante la deprivación de prolina. Se sabe que glutamina previene el crecimiento de esta cepa en arginina. (Vaca y Mora 1977)

En la gráfica 2 se muestra que conidias de la mutante arg-8 crecen en arginina, sólo cuando este aminoácido está presente en el momento de la inoculación, la adición de este compuesto 3 horas después no provoca el crecimiento en medio de Vogel, sin embargo, lo hace si el nitrato de amonio se substituye por ácido glutámico. Al contrario de arginina, ornitina es un suplemento adecuado para el crecimiento de esta mutante, aún cuando se adiciona 6 horas después de la deprivación (gráfica 2).

Resultados similares fueron obtenidos con conidias de los dobles auxótrofos arg-5; arg-8 y arg-6; arg-8. En experimentos no presentados aquí, se ha observado que la ausencia de crecimiento en presencia de arginina, no está relacionada a la baja acumulación de este aminoácido proveniente de el medio de cultivo.

Se han obtenido resultados similares con el auxótrofo de prolina prol-4, que como el mutante arg-8 también

crece en prolina, arginina u ornitina. Cuando las conidias de esta mutante se preincuban 3 horas en medio de Vogel, no se observa ningún crecimiento cuando se añade arginina.

Para probar si la deprivación de otros aminoácidos también previenen el catabolismo de arginina, se exploró - el doble auxótrofo prol-4; trip-2. Se encontró que la deprivación de triptófano resulta en la acumulación de arginina y en la prevención de su catabolismo. (gráfica 3)

Los resultados presentados sugieren que la deprivación de un aminoácido interfiere con la hidrólisis de la arginina por la arginasa.

#### Coordinación entre la biosíntesis y el catabolismo de arginina.

Debido a que se encontró que cuando se acumula arginina no se cataboliza, se estudió una posible correlación entre la biosíntesis de arginina y su catabolismo en el --

doble auxótrofo pir-3a ; arg-8. Esta cepa permite la deprivación de prolina ó de pirimidinas, y así acumula ó no arginina.

Cuando se incubaron conidias de esta cepa en uridina (deprivadas de prolina) se acumuló arginina. Esto no pasa cuando las conidias se incuban en prolina o arginina (deprivadas de uridina) (gráfica 4).

Como se muestra en la gráfica 5, las conidias deprivadas de prolina no crecieron cuando se les agregó arginina, sin embargo la deprivación de uridina sí permitió el crecimiento cuando se agregó pirimidina.

Es evidente que existe una coordinación entre la biosíntesis y el catabolismo de arginina, ya que cuando se acumula no se cataboliza y viceversa.

Se obtuvo más evidencia a este respecto cuando se encontró que las conidias de la cepa arg-8 cuando son deprivadas de prolina en presencia de actidiona, crecen en presencia de arginina si se quita el inhibidor. Como lo muestra la tabla II actidiona previene la acumulación de arginina durante la deprivación.

Efecto de la fuente de carbono en la acumulación de arginina.

La acumulación de arginina por las conidias de la cepa arg-8, cuando se incuban en medio de Vogel, depende de la fuente de carbono. Cuando se substituye sacarosa por glicerol o se omite la fuente de carbono, no se observa ninguna acumulación.

Si en presencia de glicerol el amonio se substituye por glutamina, se obtienen resultados similares -- (gráfica 6). No se observó ninguna acumulación de arginina en glicerol más AMP<sub>C</sub>.

La biosíntesis y el catabolismo de arginina están coordinadas en glicerol o en ausencia de fuente de carbono. En estas condiciones arginina no se acumula y las células crecen si son transferidas a un medio con sacarosa y arginina. (gráfica 7)

## DISCUSION.

Cuando conidias del hongo Neurospora crassa se deprivan de un aminoácido se acumula arginina (tabla I). Esta acumulación es el resultado de un proceso biosintético -- que requiere de la presencia de una buena fuente de carbono, y de que cierta síntesis de proteínas se lleve a cabo (gráfica I y tabla II).

La acumulación de arginina ocurre durante la deprivación de un aminoácido y no cuando un auxótrofo de pirimidinas se depriva de uridina.

En 2 diferentes auxótrofos de aminoácidos estudiados, se encontró que también glutamina se acumula durante la - deprivación de un aminoácido. Un poco más de la mitad del nitrógeno amino de la célula se acumula en arginina y glutamina (tabla III). Como se mencionó anteriormente la - glutamina puede ser considerada el substrato por excelencia de la vía biosintética de arginina. La glutamina a través de la acción de la carbamil fosfato sintetasa, específica para la síntesis de arginina (Davis y Col 1967), provee el nitrógeno para el carbamil fosfato, y una molécula de ácido glutámico para la síntesis de ornitina.

El nitrógeno de 2 moléculas de glutamina puede ser guardado en una molécula de arginina, se debe mencionar que la ornitina, que es un intermediario en la síntesis de arginina, no se encontró acumulado durante la privación de un aminoácido.

En el auxótrofo de prolina arg-8 se detectó por primera vez la acumulación de arginina durante la privación de prolina. Como se dijo en introducción, el requerimiento por prolina de esta cepa puede ser substituido por arginina u ornitina. Fue sorprendente que esta mutante no crece en medio de Vogel y sin embargo acumula pozas elevadas de arginina. Aquí se demuestra que si esta mutante se preincuba en medio de Vogel no crece cuando se añade arginina. (gráfica 2). Hemos postulado que durante la privación de aminoácidos la arginina que se acumula no se cataboliza porque la arginasa no se induce.

El hecho de que la privación de triptófano también permita la acumulación de arginina y la prevención de su catabolismo (gráfica 3) indica que existe una coordinación entre la síntesis y el catabolismo de arginina. Esta coordinación implica que cuando se biosintetiza arginina, no se cataboliza, dando como resultado que se acumule arginina; y viceversa, el aminoácido puede ser hidrolizado --

cuando no se sintetiza.

Se encontró evidencia en favor de esta hipótesis -- cuando se estudió el doble auxótrofo pir-3a; arg-8. Esta cepa acumula arginina cuando se depriva de prolina, pero no cuando se depriva de uridina, al mismo tiempo la deprivación de prolina pero no la de uridina, previene el catabolismo de arginina (gráficas 4 y 5).

Más evidencia se obtuvo cuando se encontró que actidiona previene la acumulación de arginina, pero se cataboliza cuando se agrega al medio y se remueve el inhibidor (tabla II). La biosíntesis y el catabolismo de arginina, también están coordinados, cuando la deprivación de un aminoácido se lleva a cabo en glicerol o en ausencia de fuente de carbono. Es decir, que arginina no se acumula en estas condiciones y que las células crecen cuando se transfieren a un medio con sacarosa y arginina (gráficas 6 y 7).

Cuando Neurospora esta creciendo exponencialmente en presencia de arginina, esta se cataboliza pero no se sintetiza (Cañedo y col 1967) también cuando la levadura -- Candida utilis está creciendo exponencialmente, la glutamina regula su propia síntesis (Sims y Ferguson 1974).

Cuando Neurospora no crece porque ha sido deprivada de un aminoácido, la glutamina se sintetiza en exceso y la arginina ni previene su síntesis ni induce su catabolismo. Esto debe ser el resultado de que la biosíntesis y el catabolismo son regulados coordinadamente.

Wiame y colaboradores han proporcionado la evidencia y un modelo para la coordinación de la biosíntesis y el catabolismo de arginina en Saccharomyces cerevisiae (Wiame 1971).

Nos gustaría proponer que en Neurospora, durante la deprivación de aminoácidos en presencia de una buena fuente de carbono y de nitrógeno, la glutamina y la arginina se acumulan como reservorios de nitrógeno. Esta proposición implica que exista alguna coordinación entre la síntesis de glutamina y la biosíntesis y el catabolismo de arginina, que debe ser responsable de la acumulación de estos aminoácidos. En ciertas condiciones, aún por encontrar, estos reservorios de nitrógeno deben ser utilizados.

Si se considera que la glutamina es el sustrato de la vía biosintética de arginina, y la arginina su producto, existe una relación inversa para estos aminoácidos en la vía catabólica de arginina.

En este aspecto debe hacerse algún comentario acerca del efecto de glutamina en el catabolismo de arginina. Se ha encontrado que glutamina previene el catabolismo de arginina y se propone que ésta es una regulación por el producto final de la vfa catabólica de arginina - (Vaca y Mora 1977). Como se reporta aquí, en una cepa -- que requiere catabolizar arginina para crecer, la glutamina inhibe el catabolismo de este aminoácido.

Se postula que durante la privación de un -- aminoácido, es la acumulación de glutamina lo que dispara la apertura de la biosíntesis de arginina y también -- el cierre de su catabolismo.

## REFERENCIAS

- Cañedo, L., Martuscelli, J. and Mora, J.  
The catabolism of L-arginine by *N. crassa*.  
Natl. Cancer Inst. Monograph. 27: 273-282, (1967).
- Castañeda, M., Martuscelli, J. and Mora, J.  
The Catabolism of L-arginine in *N. crassa*.  
Biochim. Biophys. Acta 141: 276-286, (1967).
- Chinard, F.P.  
Photometric estimation of proline and ornithine.  
J. Biol. Chem. 199: 91-95, (1952).
- Davis, R.H., In H.J. Vogel, J.O. Lampem, and Bryson  
(Editors), Organizational Biosynthesis,  
Academic Press, New York, P. 303, (1967).
- Davis, R.H., Lawless, M.B. and Port, L.A.  
Arginaseless Neurospora: Genetics Physiology and  
polyamine synthesis.  
J. Bact. 192: 299-305, (1970).
- Davis, R.H. and Mora, J.  
Mutants of Neurospora crassa deficient in ornithine  
aminotransaminase.  
J. Bact. 96: 383-388, (1968).
- Davis, R.H. and Woodward, V.W.  
The relation between gene supresion and aspartate  
transcarbamylyase activity in pyr-3 mutants of Neurospora.  
Genetics 47: 1075-1083, (1962).
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall  
Protein measurement with the folin phenol reagent.  
J. Biol. Chem. 193: 265-275, (1951).

Sánchez, S., Martínez, L. and Mora, J.  
Interactions between amino acid transport systems in  
Neurospora crassa.

J. Bact. 112: 276-284, (1972).

Sims, A.P. and Ferguson, A.R.

The regulation of glutamine metabolism in Candida utilis:  
studies with  $^{15}\text{NH}_3$  to measure "in vivo" rates of glutamine  
synthesis.

J. Gen. Microbiol. 80: 143-158, (1974).

Vaca, G. and Mora, J.

Nitrogen regulation of arginase in Neurospora crassa.

J. Bact. 131: 719-725, (1977).

Van Pilsum, J.F., R.P. Martin, E. Kito, and J. Hess.  
Determination of Creatine, creatinine, arginine, guanido  
acetic acid, guanidinic, and methyl-guanidine in biological  
fluids.

J. Biol. Chem. 222: 225-236, (1956).

Vogel, H.

A convenient growth medium for Neurospora (Medium N).  
Microbiol. Genet. Bull. 13: 42-43, (1956).

Vogel, H.J. and D.M. Bonner.

On the glutamate-proline ornithine inter-relation in  
Neurospora crassa.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 40: 688-694, (1954).

Vogel, R.H. and Kopac, M.J.

Glutamine-semialdehyde in arginine and proline synthesis  
of Neurospora: A mutant tracer analysis.

Biochim. Biophys. Acta 36: 505-510, (1959).

Wiame, J.M.,

Current Topics in Cellular Regulation. 4: 1, (1971).

Williams, L.G., Bernhart, S. and Davis, R.H.

Evidence for two discrete carbamyl phosphate pools in  
Neurospora.

J. Biol. Chem. 246: 973-978, (1971).

T A B L A I

Efecto de la Deprivación de Aminoácidos Sobre la Acumulación de Arginina.

<u>Cepa</u>	Condiciones Experimentales <sup>a</sup>	
	(0 hs.)	(24 hs.)
	umoles de arginina/mg de protefna.	
<u>trip-1</u>	0.028	0.81
<u>trip-2</u>	0.071	0.95
<u>trip-3</u>	0.043	0.04
<u>trip-4</u>	0.045	0.76
<u>his-3</u>	0.100	2.10
<u>his-6</u>	0.042	1.70
<u>lis-2</u>	0.027	0.92
<u>arg-8</u>	0.028	0.72
<u>prol-1</u>	0.020	0.42
<u>phe-1</u>	0.082	0.72 <sup>c</sup>
<u>tir-1</u>	0.026	0.36 <sup>c</sup>
<u>arom</u> (Ø ala) <sup>b</sup>	0.056	0.37
<u>arom</u> (trip) <sup>b</sup>	0.056	0.53
<u>iv-1</u> (ileu) <sup>b</sup>	0.120	0.41
<u>iv-1</u> (val) <sup>b</sup>	0.120	0.35 <sup>c</sup>
<u>val</u>	0.036	0.194

.../ / /

...#2

- a.- Conidias de diferentes auxótrofos de aminoácidos fueron inoculadas en matraces de florencia de 250 ml.
- b.- Las abreviaturas dentro del paréntesis indican el -- aminoácido del cual la mutante fue deprivada.
- c.- La determinación de arginina fue hecha a las 10 horas, debido a que estas mutantes crecen a tiempos más largos.

T A B L A    I I

Efecto de la Actidiona Sobre la Acumulación de Arginina  
Durante la Deprivación de Aminoácidos.

Condiciones Experimentales<sup>a</sup>

Cepa	Inóculo	Deprivadas	Deprivadas en Actidiona
	umolas de arginina/mg de protefina		
<u>trip-2</u>	0.052	0.715	0.165
<u>his-6</u>	0.042	1.700	0.163
<u>lis-2</u>	0.092	0.584	0.235
<u>arg-8</u>	0.028	0.720	0.222

a.- Excepto donde está indicado, las conidias fueron inoculadas en matraces de florencia de 250 ml. e incubados en medio mínimo con actidiona y sin ella a una -- concentración de 10 ug/ml.

T A B L A III

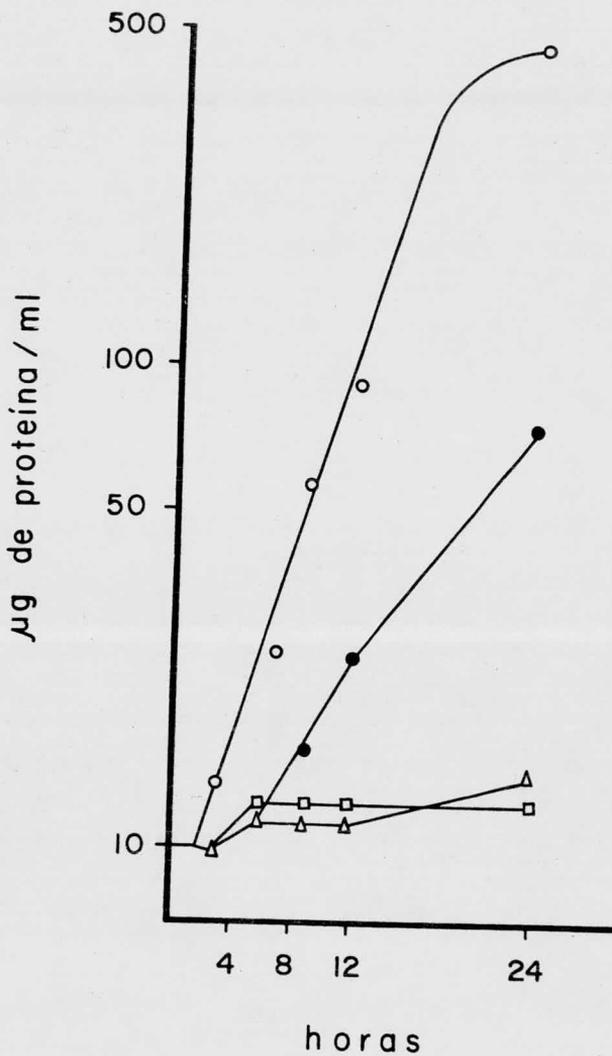
Aminograma de un Auxótrofo de Prolina\*

Aminoácidos	A	B	B/A
	umolas/mg de proteína.		
aspártico	0.085	0.157	1.9
treonina	0.015	0.084	5.6
serina	0.016	0.042	2.6
asparagina	0.020	0.039	2.0
glutámico	0.144	0.309	2.1
glutamina	0.088	0.373	4.2
glicina	0.110	0.184	1.7
alanina	0.070	0.175	2.5
cisteína	n.d.**	0.151	---
metionina	n.d.**	0.027	---
isoleucina	0.026	0.052	2.0
leucina	0.011	0.009	0.9
ornitina	n.d.**	0.035	---
lisina	0.20	0.120	0.6
histidina	n.d.**	0.035	---
arginina	0.055	0.280	5.0

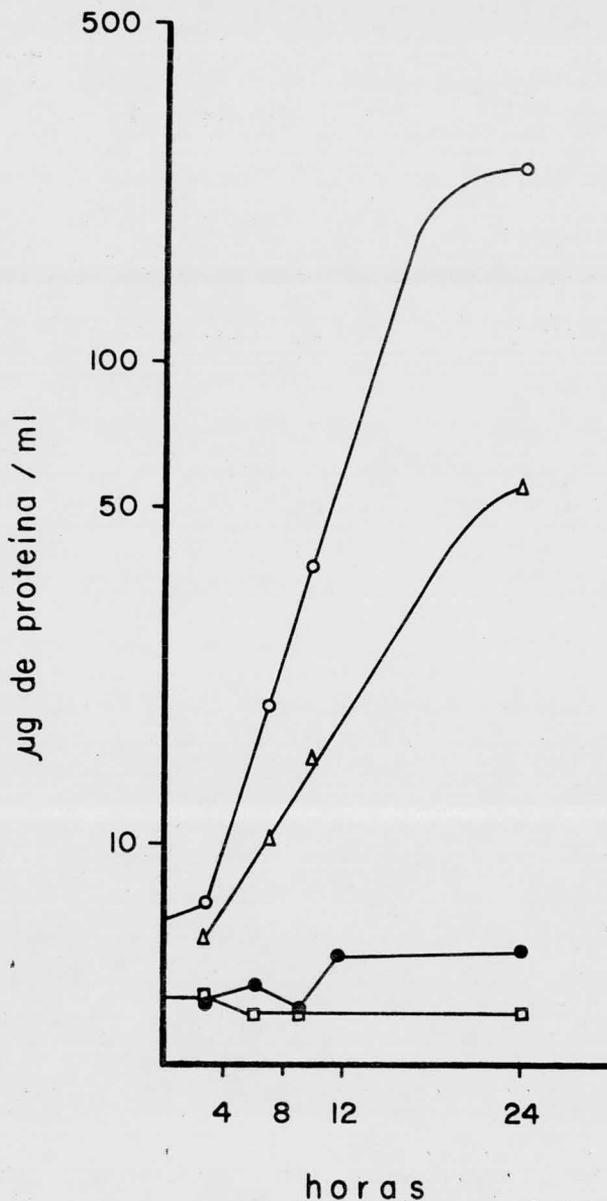
\* Conidias de la cepa arg-8 fueron inoculadas en medio mí nimo, y a las 0 horas (A) y 10 horas (B) después de la inoculación se realizó el aminograma en el extracto soluble en ácido.

\*\* No se detectó.

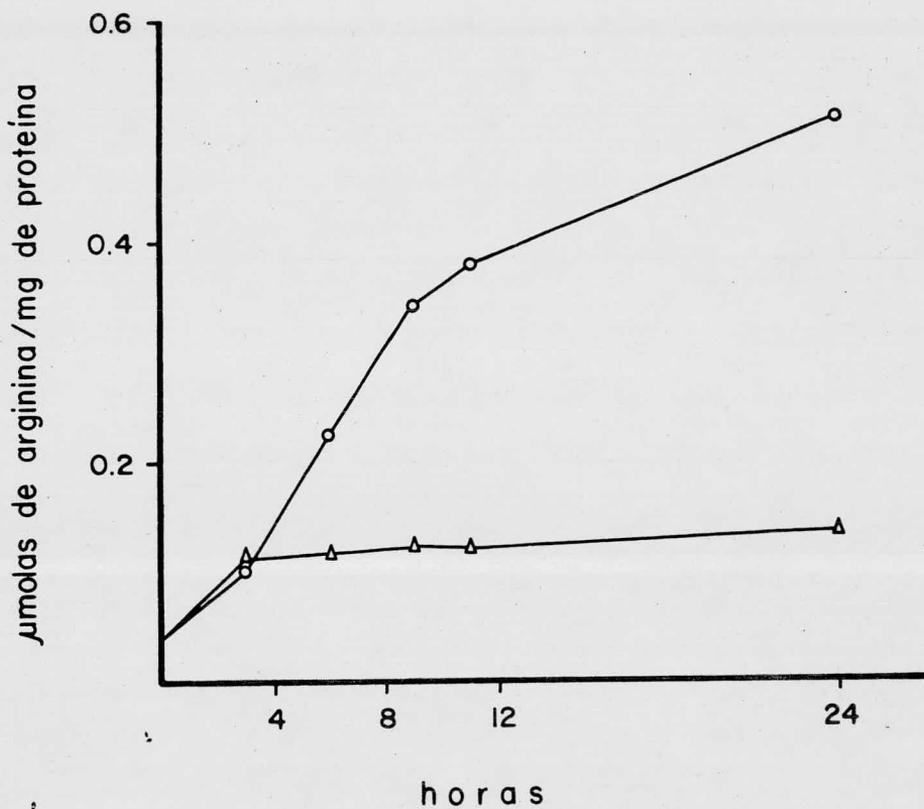
Fig. 1 Vía biosintética y catabólica de arginina.- Abreviaturas: glu., glutámico, Nac. O., Nacetil ornitina, NacG., N acetil glutámico, NacGP., N acetil glutamil fosfato, NacSAG., N acetil semialdehído glutámico, orn., Ornitina, glm, glutamina, CP. carbamil fosfato, Cit., citrulina, A.A. ácido aspártico, A.A.S., ácido arginino succinico, A.F., ácido fumárico, arg.- arginina, C.G. cetoglutarato, S.A.G.- semialdehído glutámico, ΔPAC., Δ<sub>1</sub> pirrolin ácido - carboxílico, prol.- prolina, S.P. síntesis de proteína. ENZIMAS: -- 1) acetil ornitina glutamato quinasa, 2) N acetil glutamato quinasa, 3) N acetil glutamil fosfato reductasa, 4) acetil ornitina amino -- transferasa, 5) carbamil fosfato sintetasa, 6) ornitino transcarbamilasa, 7) arginino succinico sintetasa, 8) arginino succinasa, 9) -- arginasa, 10) ornitino  $\delta$  transaminasa, 11) pirrolin, 5, carboxilato reductasa.



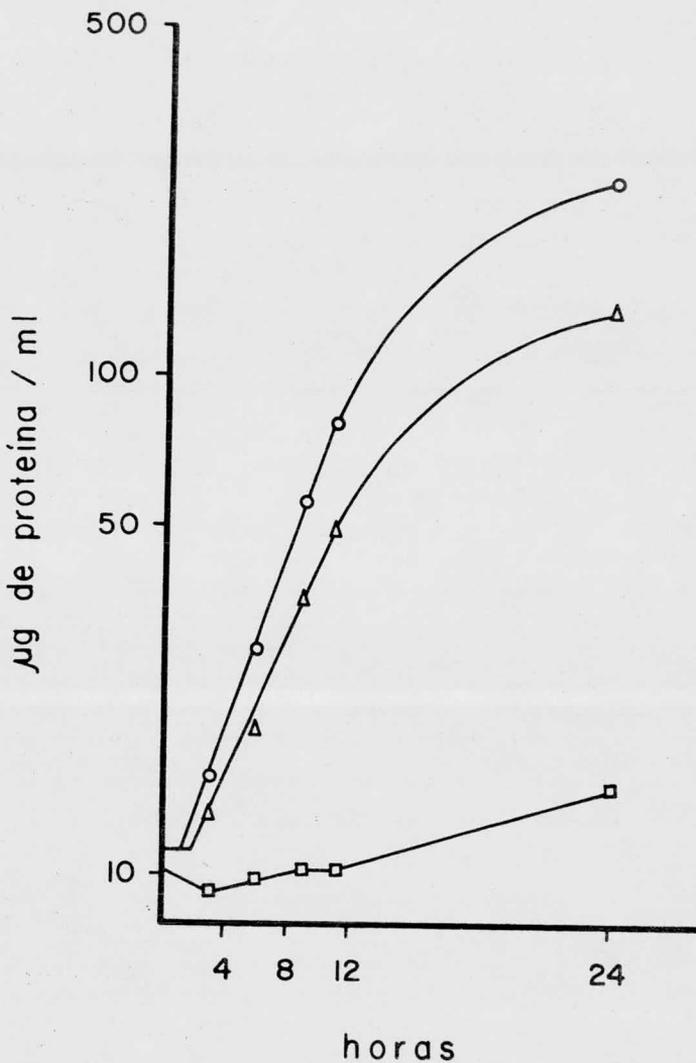
GRAFICA 2.- Efecto de la deprivación de prolina sobre el catabolismo de arginina. Se incubaron conidias de la cepa arg-8 en MM adicionado con 100 ug/ml. del aminoácido como sigue: Arginina 0 hs., (○); 3 hs., (□); ornitina 6 hs., (●); MM, (△).



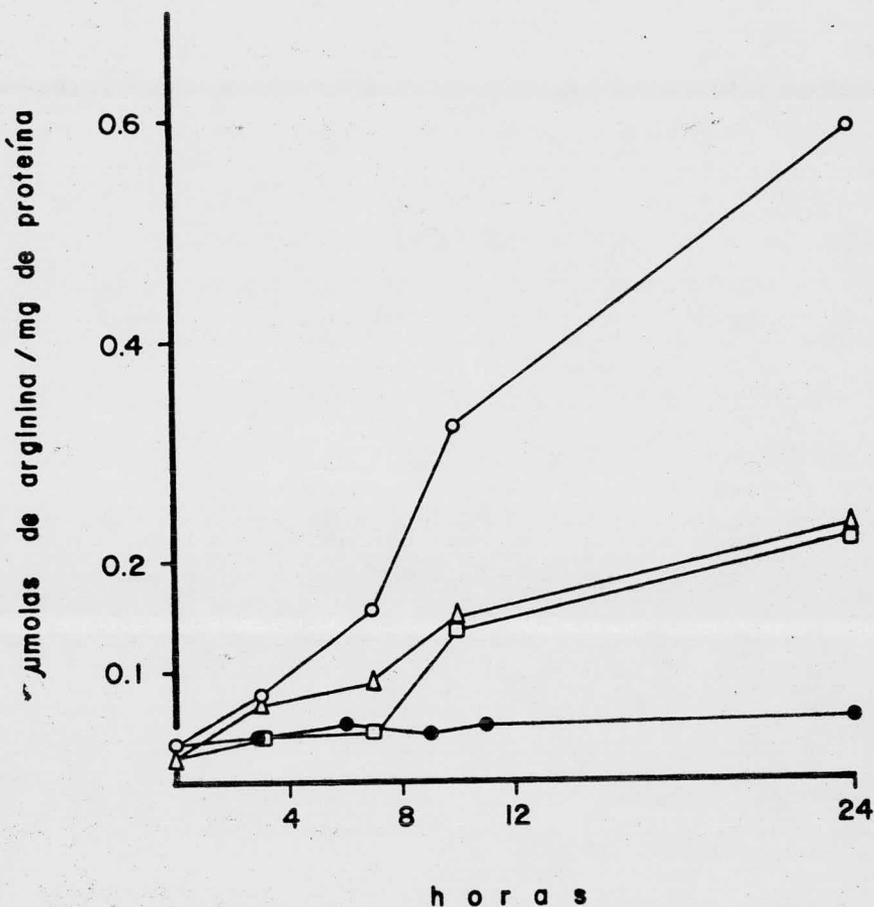
GRAFICA 3.- Efecto de la depivación de prolina o triptofano sobre el catabolismo de arginina. Se incubaron conidias de la cepa arg-8;trip-2 en MM adicionado con 20 ug/ml de indol y/o 100 ug/ml. de prolina como sigue: prolina más indol 0 hs., (○); arginina más indol 0 hs., (△); prolina 0 hs., y 6 hs. después, prolina fué removida y arginina más indol fueron adicionados, (□); indol 0 hs., y arginina a 6 hs., (●).



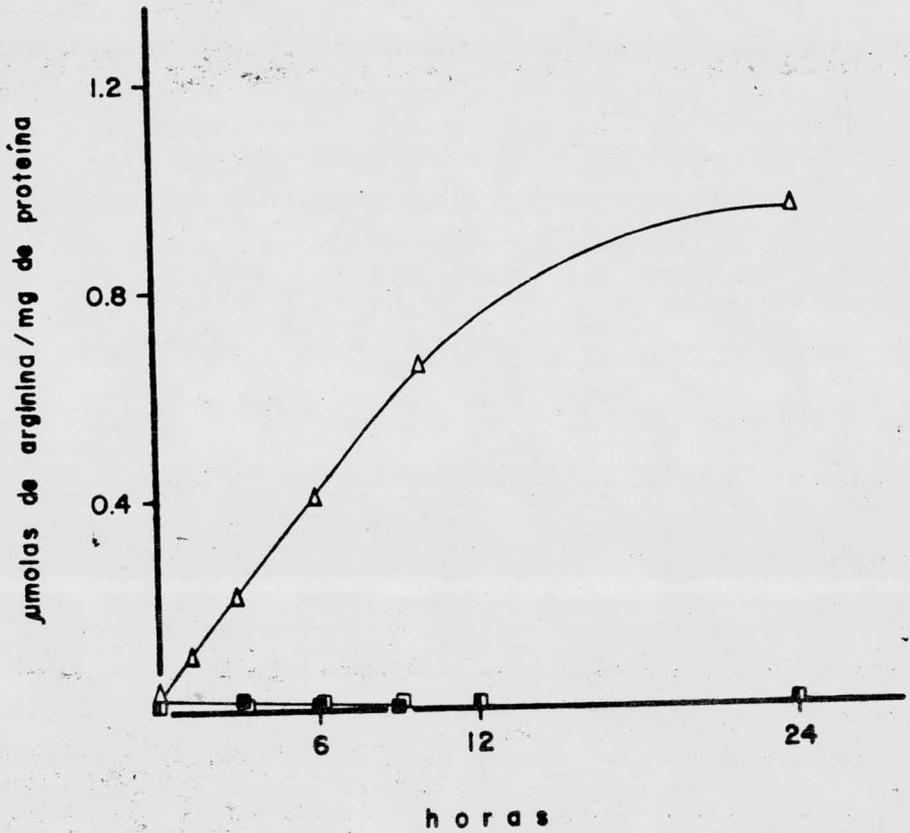
GRAFICA 4.- Efecto de la deprivación de prolina o uridina sobre la acumulación de arginina. Se incubaron conidias de la cepa pir-3a; arg-8 en MM adicionado con 100 µg/ml. de uridina, (○); ó 100 µg/ml de prolina (▲).



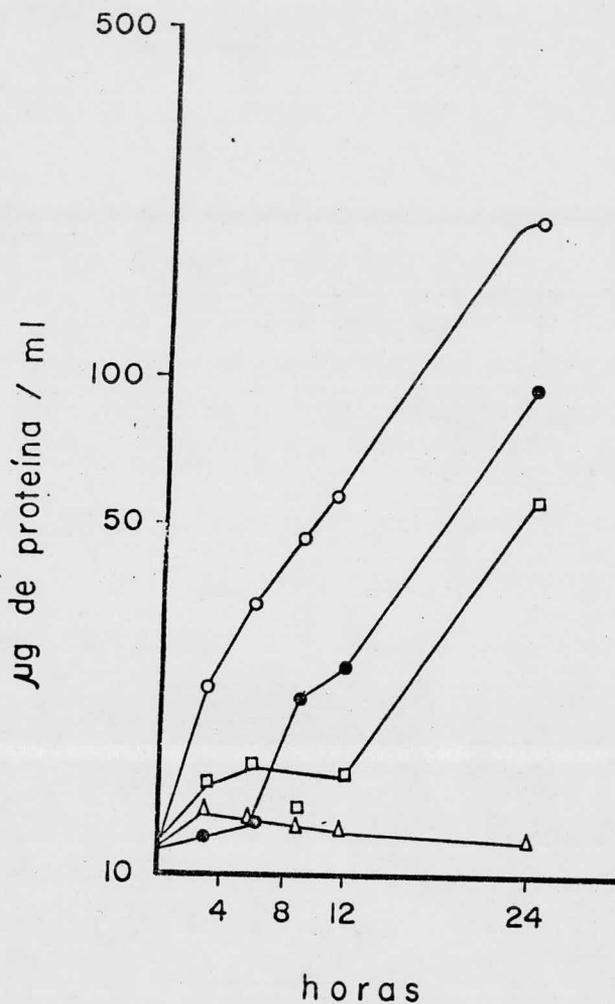
GRAFICA 5.- Efecto de la deprivación de prolina o uridina - sobre el catabolismo de arginina. Se incubaron conidias de - la cepa pir-3a; arg-8 en MM adicionado con 100 ug/ml. de cada suplemento como sigue: arginina más uridina 0 hs., (○); - prolina 0 hs., y 3 hs., después, prolina fué removida y argi - nina más uridina fueron adicionados, (Δ); uridina a 0 hs., - y arginina a 3 hs., (◻).



GRAFICA /6.- Efecto de la fuente de carbono sobre la acumulacion de arginina . Se incubaron conidias de la cepa arg-8 en MM con sacarosa, (O); glicerol, (Δ); sin fuente de carbono, (●), y en glicerol con glutamina como fuente de nitrogeno (◻)



GRAFICA 1.- Efecto de la deprivación de prolina sobre la biosíntesis de arginina. Acumulación de arginina por conidias de la cepas arg-8 (Δ) arg-5;arg-8 (◻) y arg-6;-arg-8 (■).



GRAFICA 7.- Efecto de la fuente de carbono sobre el catabolismo de arginina. Se incubaron conidias de la cepa arg-8 - en: MM con sacarosa como fuente de carbono y arginina 100 - µg/ml. adicionada a 0 hs., (○); y a 3 hs. (△); MM con glicero<sup>l</sup> como fuente de carbono durante 3 hs. y a este tiempo las conidias fueron transferidas a un medio con sacarosa y arginina (□); MM sin fuente de carbono 3 hs. y a este tiempo las conidias fueron transferidas a un medio con sacarosa y arginina. (●)

**T  
E  
S  
I  
S**

**TESIS POR  
COMPUTADORA  
UNICO SISTEMA  
EN MEXICO**

**MEDICINA 25 LOCAL 3**

**550-72-57**

**CIUDAD UNIVERSITARIA**

**MEXICO**