

03062

1979

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE  
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES.

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE  
NITROGENO.

U.N.A.M.

ANALISIS GENETICO DE MUTACIONES QUE AFECTAN LA  
ACTIVIDAD DE GLUTAMATO SINTASA EN Neurospora  
crassa.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA PRESENTA

DAVID RENE ROMERO CAMARENA.

CUERNAVACA, MOR., 1986.

TESIS CON  
FALLA DE ORDEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

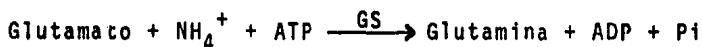
Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

## INTRODUCCION

En todos los seres vivos, la asimilación de amonio en componentes orgánicos se lleva a cabo a través de la biosíntesis de glutamina y glutamato.

La única enzima encargada de la biosíntesis de glutamina es la glutamino sintetasa o GS (E.C.6.3.1.2) la cual cataliza la siguiente reacción:



Por otro lado, la biosíntesis de glutamato puede alcanzarse por dos vías distintas. Una de ellas involucra a la enzima glutamato deshidrogenasa o GDH (E.C.1.4.1.4) la cual cataliza la siguiente reacción:



La otra vía encargada de la biosíntesis de glutamato es la glutamato sintasa o GOGAT (E.C.1.4.1.14) la cual produce dos moléculas de glutamato a partir de una molécula de glutamina y una de  $\alpha$ -cetoglutarato.



La dependencia por cofactor varía según el organismo -- del que se trate, siendo habitualmente NADPH en bacterias, (42,43), NADH en levaduras, hongos y algunos tejidos vegetales y ferredoxina en otros vegetales (43). Como se vé, la biosíntesis de glutamato puede lograrse mediante GDH o a través de la acción concertada de GS y GOGAT.

¿Cuál es la razón de que existan dos sistemas para biosíntesis de glutamato. Evidentemente existen diferencias bioquímicas importantes entre ambas vías. Una diferencia entre ellas que ha sido ampliamente comentada es la diferencia en afinidad por amonio de ambas vías. La mayoría de las GDH descritas poseen una Km alta por amonio (usualmente mayor a 5 mM) mientras que la Km por amonio de GS (la cual es la enzima asimiladora de  $\text{NH}_4^+$  en la vía GS-GOGAT) es usualmente de 0.5 mM o aún menor. Esto implica un desfaseamiento en las condiciones nitrogenadas en las cuales cada vía puede actuar óptimamente. Bajo este razonamiento, la GOGAT es una enzima que permitiría la síntesis de glutamato cuando hay poco amonio disponible, mientras que la GDH podría sintetizar glutamato solamente en condiciones en que existiera una abundancia de amonio disponible.

Existen organismos que han resuelto el problema de sintetizar glutamato utilizando solamente alguna de estas dos vías. De esta manera, organismos como Bacillus subtilis y Bacillus megaterium utilizan la vía GS-GOGAT para la producción de ácido glutámico. La vía por GDH no es operativa en estos organismos, ya sea debido a su ausencia o a las altas Km's por amonio (hasta 0.17M,9,10). Por otro lado, la síntesis de glutamato en animales superiores se realiza por medio de la vía GDH, caraciéndose de evidencias para la presencia de una vía GS-GOGAT en estos organismos.

En contraste a los organismos mencionados anteriormente, existen otros en los cuales ambas vías de biosíntesis de glutamato pueden coexistir. En plantas se ha reportado la existencia de ambas vías, pero la evidencia presente sugiere

que la biosíntesis de glutamato se lleva a cabo por la vía GS-GOGAT (31). En otros organismos, como la bacteria - Klebsiella aerogenes (39) y el alga Lemna minor (35), el esquema de regulación para ambas especies sugiere su papel en la asimilación de diversas concentraciones de amonio. Cuando se crecen ambos organismos en condiciones de limitación de amonio se encuentran actividades altas de GS y GOGAT, mientras que la GDH se encuentra muy reprimida. En exceso de amonio, las actividades de GS y GOGAT se reprimen y se eleva la actividad de GDH. Esto sugiere que en estos organismos la vía GS-GOGAT es la responsable de la biosíntesis de glutamato en condiciones de limitación de amonio, mientras que GDH lo hace en exceso de amonio.

Salmonella typhimurium y Escherichia coli poseen tanto GDH como GS y GOGAT. En estas especies, la regulación de las diferentes enzimas en limitación y exceso de nitrógeno no ha permitido llegar a conclusiones claras con respecto al papel relativo de ambas vías. Por ejemplo, en E. coli la GDH se reprime solo ligeramente en cultivos limitados de amonio, mientras que se encuentra una alta actividad de GOGAT en exceso de amonio (39). Sin embargo, en E. coli, estudios de marcaje in vivo con  $^{15}\text{N}$  y separación por cromatografía líquida de alta presión de los metabolitos resultantes, proveen evidencia compatible con el papel de GOGAT en la asimilación de concentraciones limitantes de amonio. Después de suministrar  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  a  $1\ \mu\text{M}$ , se observa un marcaje diez veces mayor de la poza de glutamina comparado a la poza de glutamato (20). Además, el patrón obtenido en presencia de inhibidores como metionina sulfoximina, azaserina y aminoaceticato es compatible con la conclusión de -- que la vía GS-GOGAT es la principal responsable de la asimilación de concentraciones limitantes de amonio, mientras que la vía por GDH tiene un papel secundario en estas - -

condiciones. Sin embargo, es lamentable que estos estudios no se hayan llevado a cabo a  $75 \mu\text{M}$  de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , concentración limitante para el crecimiento de E. coli.

#### Genética de GOGAT.

El análisis de mutaciones que afectan la actividad de GOGAT ha proveído evidencia adicional sobre el papel de GOGAT en el metabolismo celular.

En B. subtilis, pueden obtenerse auxótrofos de glutamato por mutaciones en cualquiera de dos genes (gltA o gltB) los cuales se piensa que son los genes estructurales para ambas subunidades de GOGAT (2,8). Esto permite concluir que GOGAT es la única enzima que sintetiza el glutamato necesario para crecimiento en B. subtilis.

En Salmonella typhimurium, pueden obtenerse auxótrofos de glutamato solamente cuando se mutan simultáneamente dos genes, gdhA y gltB. Mutaciones en gdhA llevan a una pérdida de la actividad de GDH (36), mientras que mutaciones en gltB llevan a la falta de actividad de GOGAT (15). Mientras que las mutantes afectadas en gdhA son crípticas fenotípicamente, las mutantes afectadas en gltB presentan dos fenotipos distintivos: uno de ellos es la incapacidad de crecer en concentraciones limitantes de amonio ( $75 \mu\text{M}$ ), mientras que el otro es la incapacidad de crecer en varios aminoácidos como única fuente de nitrógeno (fenotipo  $\text{Asm}^-$ ) (15). La incapacidad de las mutantes gltB para crecer en limitación de amonio es compatible con su probable papel en la asimilación de amonio.

En S. typhimurium, como en otros procariotes, la GOGAT está compuesta por dos polipéptidos, en este caso de 153,000 y 53,000 (27). Esto podría presuponer la existencia de dos genes, uno codificando para la subunidad ligera y otro para la pesada. Compatible con esto, Brenchley y Col. (27) han encontrado que mutaciones en el locus gltD (el cual está muy ligado a gltB) provocan la pérdida de la actividad de GOGAT. Evidencias bioquímicas sugieren que gltB y gltD codifican para las subunidades pesada y ligera de GOGAT, respectivamente (27). Estos dos genes están organizados como un operón (27).

En Escherichia coli se requieren dos mutaciones para provocar una auxotrofia por glutamato (1). Una de ellas, gdhA1, es enteramente similar a la mutación gdhA de S. typhimurium (1). La otra mutación, gltB31, afecta la actividad de GOGAT, provocando una incapacidad de crecer en cloruro de amonio a 75  $\mu\text{M}$ , así como un fenotipo  $\text{Asm}^-$  (43). Mientras que existe evidencia para proponer que gdhA es el gene estructural para GDH (38), la evidencia para proponer que gltB es el gene estructural para GOGAT era ambigua. Si bien la mutante gltB31 carece tanto de actividad de GOGAT como de material que cruce con anticuerpos específicos para GOGAT, estos resultados podrían explicarse o por mutación en el gene estructural para GOGAT o por mutación en un regulador para GOGAT. Por otro lado, Servín y Bastarrachea (40) han encontrado que células que llevan la mutación gltB31, la cual se pensaba que afectaba solamente GOGAT, afecta también el sistema de transporte de amonio. Este es un dato difícil de explicar asumiendo que el locus definido por la mutación gltB31 es el gene estructural para GOGAT.

Los datos reportados en la tesis de Maestría de Irene Castaño (6) constituyen un intento para la resolución de

estas discrepancias. En este trabajo se encontró que la mutación gltB31 está compuesta en realidad de dos mutaciones ligadas. Una de ellas es una delección de los genes -- estructurales para GOGAT, los cuales, por analogía con S. typhimurium, se denominaron gltB y gltD. La segunda alteración es en un posible gene regulador positivo para GOGAT, - el cual se denominó gltE. Los genes gltB y gltD se encuentran organizados como un operón, con un tercer gene dentro de este operón, el cual se ha llamado gltG.

Se piensa que gltG es un posible regulador positivo para los genes encargados de degradar sustratos Asm. Dado - que el operón tendría una estructura gltB - gltD - gltG, - las mutaciones que afectan la actividad de GOGAT tendrían - un fenotipo Asm<sup>-</sup> solo si la mutación fuera polar sobre gltG. Por tanto, el fenotipo Asm<sup>-</sup> sería debido a la falta de - - síntesis de un regulador, y no una consecuencia metabólica de la falta de GOGAT.

Aunque este modelo es todavía especulativo, provee una explicación plausible para las anomalías descritas anteriormente. Sería interesante analizar si la falta de crecimiento de la mutante gltB31 en limitación de amonio es debida a la pérdida de alguno de los posibles reguladores o una consecuencia de la pérdida de GOGAT. Sin embargo, es importante hacer notar que esta sería la primera descripción de -- genes regulatorios para GOGAT en cualquier organismo.

Antecedentes para esta investigación.

Del análisis de los apartados anteriores es evidente - que se ha alcanzado un profundo conocimiento sobre la fisiología y sobre todo la genética de la asimilación de nitróge



no en organismos procariotes. Sin embargo, el conocimiento en estas áreas no se ha desarrollado a la misma magnitud en organismos eucariotes. Si bien se cuenta con amplia información fisiológica sobre las vías primarias de asimilación de nitrógeno en eucariotes superiores, como plantas, la genética de estos sistemas no ha avanzado a la par.

Por tanto, desde hace algunos años, el grupo del Dr. Jaime Mora, se ha abocado al estudio de las vías primarias de asimilación de nitrógeno en eucariotes sencillos, como el hongo Neurospora crassa.

En este hongo, así como en algunos procariotes, glutamato puede sintetizarse a través de GDH o a través de la acción concertada de GS y GOGAT (32).

Estudios fisiológicos en Neurospora crassa indican que la asimilación de nitrógeno en condiciones de exceso de amonio se lleva a cabo primordialmente a través de GDH. Esto se infiere de la baja actividad de GOGAT presente en esta condición, así como de la alta actividad de GDH observada. En contraste, cuando este hongo está creciendo en condiciones de limitación de amonio, la GOGAT se encuentra en condiciones de máxima inducción, mientras que la GDH se mantiene a niveles similares a los observados en exceso de amonio (23). Si bien estos datos apoyan el uso de una vía GDH para condiciones de exceso y una vía GS-GOGAT para condiciones de limitación de amonio, es extraño que la GDH no se reprima en limitación de amonio. Como una hipótesis alternativa, se ha propuesto que GDH es la responsable de la asimilación de amonio en ambas condiciones, con la vía GS-GOGAT funcionando como un "balanceador" de las concentraciones relativas de glutamato y glutamina (25). Esta enzima (GOGAT) es reprimida fuertemente por glutamato y a una extensión menor por glutamina (18).

El aislamiento y caracterización de mutantes carentes - de las actividades de GDH o GOGAT ha sido crucial para la - proposición del papel relativo de ambas vías para la biosíntesis de glutamato. Se han descrito en N. crassa varias - mutaciones que afectan el gene estructural para GDH (mutantes am). Las mutantes am requieren glutamato para su crecimiento óptimo pero crecen, aunque pobremente, en exceso de amonio (13). Hummelt y Mora (17) han encontrado que una - mutante am crece de manera similar a la cepa silvestre en cultivos limitados de amonio, presumiblemente debido a la - presencia de GOGAT (18).

Se ha descrito que una mutación que afecta el locus - - en(am) evita el escaso crecimiento de las mutantes am en - exceso de amonio (18). De esta manera, dobles mutantes - - am;en(am) se comportan ahora como auxótrofos estrictos por glutamato. Por otro lado, el único efecto fenotípico de la mutación en(am) en un fondo genético silvestre es la incapacidad de crecer en condiciones limitantes de amonio (18). Más aún, esta mutante está parcialmente bloqueada en la degradación de glutamina (5). Hummelt y Mora (18) y posteriormente Dunn-Coleman y colaboradores (12) han descrito - que la mutante en(am) carece de actividad de GOGAT. El - - locus en(am) ha sido rebautizado como en(am)-2 (12) y esta será la designación que utilizaré en este trabajo.

Si bien el análisis fisiológico de las mutantes am y - en(am)-2 ha sugerido el papel de GDH y GOGAT en el metabolismo de este hongo, es importante señalar que solamente en el caso de las mutantes am se sabía de su naturaleza estructural. Hasta el momento de iniciar este trabajo, la información existente sobre la mutante en(am)-2(C24) era insuficiente para asignarle un papel estructural o regulatorio - para GOGAT. Este era un punto claramente importante, dado

que si esta mutación estuviera afectando un gene regulatorio para GOGAT las conclusiones fisiológicas deberían reevaluarse, como sucedió para la mutante gltB31 de E. coli, descrita en el apartado anterior.

Aun más, a pesar de su relevancia fisiológica los estudios genéticos sobre la GOGAT de eucariotes son escasos. - Con la excepción de N. crassa, en eucariotes solamente se han descrito mutaciones que afectan la actividad de GOGAT - en la planta Arabidopsis thaliana (41), pero estas no han sido caracterizadas a profundidad.

Por tanto, dado la carencia de datos genéticos sobre la GOGAT de eucariotes así como su relevancia para la fisiología de N. crassa, se decidió emprender un análisis genético de la GOGAT de este hongo. En este trabajo se describe el aislamiento de tres nuevas mutantes que afectan la actividad de GOGAT, su alelismo por criterios de mapeo y complementación con la mutación en(am)-2(C42), así como la conclusión de que en(am)-2 es el gene estructural para GOGAT por criterios de dosis génica y presencia de antígeno inactivo en las mutaciones.

## MATERIAL Y METODOS

Cepas. Todas las cepas usadas en este trabajo provienen de la colección del Dr. Jaime Mora o del Fungal Genetics Stock Center en el Department of Microbiology, University of - - Kansas Medical School, Kansas City, Ks. Como cepas silvestres de referencia se utilizaron las cepas 74-A o 73-a. Las cepas flA y fl a se utilizaron para pruebas de tipo de apareamiento. Otras cepas básicas fueron am132 (alelo am132), en(am)-2 (alelo C24), in1 (alelo 89601), ad-8 (alelo - - - Y112M343) y T(II+I) NM177. Las dobles mutantes utilizadas en este trabajo fueron obtenidas por cruzamiento de las cepas anteriormente mencionadas.

Medios y condiciones de crecimiento. Todas las cepas fueron crecidas por 24 h. a 25°C en medio mínimo N de Vogel - (7) complementado con 1.5% de sacarosa. Para algunos experimentos se utilizó una variante del medio N de Vogel la - cual carece de fuente nitrogenada, llamada SN (23). Otras fuentes nitrogenadas en lugar o además de nitrato de amonio, se añadieron como se describe en Resultados. Para crecer - algunas cepas, se añadió adenina (2 mM) o inositol (100 -- µg/ml). El micelio fue crecido a partir de un inóculo coni - dial en medio líquido burbujeado con aire hidratado.

Preparación de extractos libres de células y determinación de actividad de GOGAT. Todos los pasos se realizaron a 4°C. El micelio se filtró a través del papel filtro whatman No. 41 y se lavó con agua bidestilada. Posteriormente el micelio se deshidrató con acetona y se secó al vacío. Los polvos de acetona resultantes se molieron con hielo seco y se resuspendieron en un amortiguador de fosfato de potasio -- 0.1 M, pH 7.6 más 2-mercaptoetanol al 0.5% en una relación

100 mg de polvo a 1.2 ml de amortiguador.

Las suspensiones se centrifugaron por 15 minutos a 12 500 X g., usándose los sobrenadantes como extractos libres de - - células. La actividad de GOGAT se midió como el consumo de NADH dependiente de glutamina y  $\alpha$ -cetoglutarato a 25°C, de acuerdo al protocolo de Boland y Benny (3). La única modificación a este procedimiento fue la utilización de un amortiguador a pH7.75 como amortiguador de ensayo. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry et. al (26) utilizándose albúmina sérica bovina como referencia.

Mutagénesis y selección de mutantes. Se prepararon suspensiones conidiales de la cepa am132 y de la cepa am132;in1 - y se ajustaron a  $2 \times 10^7$  conidias por ml. Se incubaron - - 20 ml de cada suspensión con 1.32 mM de N-metil-N'-nitro- - -N- nitrosoguanidina por 25 minutos en la oscuridad a 25°C con agitación ocasional. Bajo estas condiciones, se obtuvo de un 5 a un 10% de sobrevivencia para ambas cepas.

Las conidias de ambas suspensiones se concentraron por centrifugación y se lavaron dos veces con 20 ml de agua estéril. Después de el tratamiento mutagénico, las conidias de la cepa am132;in1 se enriquecieron por incubación en 250 ml de medio N de Vogel complementado con sacarosa al 1.5%. Estas se incubaron por 60 horas a 37°C con agitación. Las - conidias mutagenizadas de la cepa am132 se enriquecieron ba - jo estas mismas condiciones. Sin embargo, en este caso, - cada 12 horas se filtró el cultivo a través de gasa para - eliminar cualquier crecimiento micelial. Cada 24 horas las conidias restantes se transfirieron a medio fresco. Las - - poblaciones enriquecidas de ambas cepas se concentraron por centrifugación, se lavaron con agua destilada estéril y se resuspendieron en agua estéril.

Estas se platearon en cajas Petri con medio N de Vogel complementado con 0.02% de glucosa, 0.02% de fructosa, 1% de sorbosa, 1.36 mM de ácido glutámico y 25 mM de alanina y 2% de agar. Para la cepa am132in1 se añadió además inositol a 100 µg/ml. Las cajas se incubaron a 37°C hasta que aparecieron colonias (2 a 5 días) y las colonias resultantes se transfirieron a tubos de medio N suplementado con 1.5% de sacarosa, 1.36 mM de ácido glutámico, 25 mM de alanina y 2% de agar.

Técnicas genéticas. Las cruzas se realizaron en Corn Meal Agar 2 X (Difco Laboratories, Detroit, Mich.). Las pruebas en parche para auxotroffias, así como los análisis de proge- nie y pruebas de tipo de apareamiento y fertilidad se reali- zaron de acuerdo a técnicas ya descritas (7). Las pruebas de complementación se realizaron en tubos con 3 ml de medio N líquido complementado con 1.5% de sacarosa. Estos tubos se inocularon con conidias de las mutantes por probar (a -  $10^5$  conidias/ml de cada una) y se incubaron por 5 días a - 30°C. Todas las mutantes se transfirieron a un fondo gené- tico común por dos retrocruzas sucesivas con la cepa am132.

Construcción de diploides parciales. Por técnicas ya des- critas (30, 33, 34) se construyeron cepas diploides para - - segmentos del brazo derecho del grupo de ligamiento II. - El diploide parcial heterocigótico (i.e. am132;en(am)-2(C24)/ en(am)-2+) se obtuvo cruzando la cepa am132;en(am)-2(C24) - (tipo de apareamiento A) con la cepa T(II+I) NM177 (tipo de apareamiento a). Se buscó entre la progenie un aislado de fenotipo am, tipo de apareamiento a y estéril. Este se usó como el diploide parcial heterocigótico. El diploide par- cial homocigótico proviene de una crusa de la cepa am132, - tipo de apareamiento A con la cepa T(II+I)NM177, tipo de - apareamiento a. Se buscó entre la progenie un aislado de -

fenotipo am, tipo de apareamiento a y estéril, el cual se utilizó como el diploide parcial homocigótico. La nomenclatura para los diploides parciales fue de acuerdo a Metzberg et.al. (30).

Preparación de anticuerpos anti-GOGAT. Se purificó parcialmente (150 veces) la GOGAT de la cepa am132 a partir de -- cultivos crecidos en limitación de amonio como se describió previamente (3,18) con las siguientes modificaciones. El -- corte con sulfato de amonio se realizó entre 30% y 45% de saturación; se varió además las dimensiones de la columna de DEAE-Sephadex A-25 a 2.0 x 10.5 cm. La preparación obtenida fue usada como antígeno. Se inyectaron intramuscularmente conejos blancos Nueva Zelanda (1.5 kg) con 200 µg de la proteína en adyuvante completo de Freund. A intervalos de 12 días, se dieron dos inyecciones de refuerzo con 100 µg de proteína en adyuvante incompleto de Freund. Diez -- días después de la última inyección, se sangraron los conejos por la vena de la oreja y se fraccionó el suero con sulfato de amonio para obtener la fracción total de gamma-globulinas. El precipitado final se disolvió en PBS, se dializó contra el mismo amortiguador y se almacenó a -20°C.

Inmunoprecipitación directa de GOGAT. Se incubaron fracciones de extracto conteniendo una cantidad constante de proteína total con varias cantidades de anticuerpo anti-GOGAT. La incubación se realizó por 12 hrs. a 4°C en amortiguador G (fosfato de potasio 0.1 M, 25 mM de bisulfito de sodio, - 6 mM de 2-mercaptoetanol, pH7.6) conteniendo 1 mg de albúmina sérica bovina por ml. El volumen de reacción fue de - 0.15 ml. Después de la incubación, se centrifugaron las reacciones en un gradiente discontinuo de sacarosa (0.5 M a 1.0 M de sacarosa en amortiguador G con 1 mg de albúmina --

sérica bovina por ml) a 7.5 Krpm por 30 minutos en el rotor Sorvall HB-4. Se midió la actividad de GOGAT en alícuotas de los sobrenadantes y las pastillas se procesaron para -- electroforesis en geles de SDS como se describe a continuación.

Electroforesis. Los inmunoprecipitados se resuspendieron en Tris 0.1 M, pH6.8, 1% SDS y 1% de 2-mercaptoetanol y se hirvieron en baño maría por 3 minutos. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en -- placas con 7.5% de poliacrilamida y 0.1% de SDS, como lo -- describe Laemmli (22). Los geles se tiñeron con Azul de -- Coomassie R-250. Los marcadores de peso molecular provie-- nen de Sigma (Sigma chemical Co., St. Louis, Mo.).



## RESULTADOS

Caracterización fenotípica de auxótrofos de glutamato. Los auxótrofos de glutamato descritos en este trabajo se aislaron como mutaciones en un segundo sitio que eliminan el -- crecimiento residual de la cepa am132 en exceso de amonio - (25 mM de nitrato de amonio). Se aislaron tres auxótrofos de glutamato de entre ca. 600 supervivientes al tratamiento de mutagénesis y selección descrito en Material y Métodos. Dos de estos auxótrofos (alelos DR-1 y DR-2) provienen de - la cepa am132 mientras que el tercero (alelo DR-3) proviene de la cepa am132;in1. A diferencia de las cepas progenitoras, ninguno de estos auxótrofos es capaz de crecer en nitrato de amonio como fuente de nitrógeno. Todos estos auxótrofos fueron capaces de crecer cuando se agregó glutamato, alanina ó glutamato más amonio al medio de crecimiento. -- Estas características fenotípicas coinciden con las descritas para la cepa am132;en(am)-2(C24).

Se midieron las actividades específicas de GOGAT en estas mutantes y se compararon con la actividad de la cepa - am132 en cultivos crecidos por 24 h. a 25°C en glutamato - 0.5 mM como única fuente de nitrógeno. Estas condiciones - de cultivo permiten una inducción media de la actividad de GOGAT. Todas las mutantes obtenidas (tabla 1) mostraron - menos del 10% de la actividad de GOGAT encontrada en células de am132. Como se describió previamente (12,18), la cepa mutante am132;en(am)-2(C24) carece de actividad detectable de GOGAT. Extractos de estas mutantes no inhiben ni incrementan la actividad de extractos silvestres (datos no mostrados).

Análisis genético de auxótrofos de glutamato. Todas las mutantes obtenidas se cruzaron con la cepa am132. Entre los productos de estas cruzas, aproximadamente el 50% de las clonas crecieron escasamente en amonio (i.e. clase mutante am) mientras que aproximadamente el 50% fueron auxótrofos totales de glutamato (i.e. clase mutante en(am);am). Por tanto, las mutaciones responsables de la auxotrofia total por glutamato se comportan como factores mendelianos sencillos. Cruzas de las tres mutantes con la cepa silvestre 74-A produjeron tres clases fenotípicas: 25% de mutantes am, 25% de mutantes en(am);am y 50% de clonas tipo silvestre. Se han reportado segregaciones de este tipo en cruzas de la cepa am1;en(am)-2(C24) con la cepa silvestre 74-A (18). Estos resultados sugieren que en un fondo genético silvestre, las mutaciones que confieren un requerimiento total por glutamato son crípticas en exceso de amonio, esto es, permiten crecimiento en medio mínimo el cual coincide con el crecimiento de la cepa silvestre 74-A.

Para determinar el ligamiento entre las mutaciones responsables del requerimiento total por glutamato, se realizaron cruzas de las tres mutantes aisladas en este trabajo entre sí y con la cepa mutante am132;en(am)-2(C24) en todas las combinaciones posibles. Para todas las cruzas, en  $5 \times 10^4$  ascosporas viables sometidas a selección para la capacidad de crecer en medio mínimo con nitrato de amonio, no se detectaron colonias recombinantes. Estos datos sugieren que todas las mutaciones están afectando el mismo gene, el cual se ha denominado previamente como en(am)-2.

Posteriormente, se realizó un análisis de complementación. Se encontró que la mutante en(am)-2(C24), así como las mutantes aisladas en este trabajo, son recesivas frente al alelo silvestre en heterocariones forzados. Heteroca---

riones conteniendo núcleos de cualquiera de las cepas - - am132;en(am)-2 así como de una cepa que lleva el alelo silvestre de en(am)-2 (como am132;ad-8) fueron capaces de crecer en nitrato de amonio como única fuente de nitrógeno. - Por otro lado, heterocariones obtenidos mezclando las mutantes en todas las combinaciones apareadas, fueron incapaces de crecer en medios con nitrato de amonio como única fuente de nitrógeno. Este análisis de complementación demuestra - que todas las mutantes pertenecen a un solo grupo de complementación y son por tanto alelos de la mutación en(am)-2(C24) aislada previamente.

Mapeo del locus en(am)-2 por cobertura en duplicaciones. Para la identificación de en(am)-2 como el gene estructural para la GOGAT de N. crassa un enfoque valioso es el estudiar el efecto de la dosis génica de en(am)-2 sobre la actividad de GOGAT. En N. crassa, pueden hacerse modificaciones en - el número de genes mediante el uso de translocaciones insercionales (30,33,34). El cruzamiento de una cepa con tal rearrreglo con una cepa silvestre produce una duplicación de la región cubierta por la translocación en un tercio de la -- progenie viable (33, 34). La progenie con la duplicación - parcial puede ser fácilmente identificada por su incapacidad para producir ascosporas en cruces, el cual es un fenotipo comúnmente asociado con duplicaciones parciales en N. crassa (33, 34).

No se han descrito hasta el momento translocaciones -- insercionales que lleven en(am)-2<sup>+</sup> en el segmento transpuesto. Sin embargo, Perkins (34) y Metzenberg et.al. (30) han estudiado una translocación insercional (T(II→I) NM177) la cual cubre la región donde en(am)-2 ha sido localizado previamente. En esta cepa, un segmento intersticial de el grupo de ligamiento II se encuentra insertado en el grupo de -

ligamiento I, cerca de el locus para tipo de apareamiento. Con el propósito de determinar si el locus en(am)-2<sup>+</sup> se encuentra localizado en el segmento transpuesto de esta cepa, en(am)-2 se localizó por el método de cobertura en duplicaciones (33, 34).

El principio de esta clase de mapeo se muestra en la Fig. 1. El cruzamiento de una cepa con secuencia normal la cual porta un alelo mutante recesivo de en(am)-2 (i.e. - am132;en(am)-2(C24), tipo de apareamiento A) con la cepa que porta la translocación (T(II+I)NM177, tipo de apareamiento a) daría diferentes resultados si el locus en(am)-2<sup>+</sup> está o no contenido en el segmento transpuesto. Si el locus en(am)-2<sup>+</sup> se encuentra en el segmento transpuesto, dos tercios de la progenie viable deberían mostrar un fenotipo en(am)-2<sup>+</sup>, mientras que un tercio sería de fenotipo en(am)-2. Más aún, la mayoría de la clase mutante en(am)-2 debería de ser de tipo de apareamiento A y fértiles, mientras que la clase en(am)-2<sup>+</sup> debería de ser de tipo de apareamiento a y la mitad de ellas incapaces de producir ascoporas en cruzas. En contraste, si el locus en(am)-2<sup>+</sup> no se encuentra en el segmento transpuesto, un tercio de la progenie sería de fenotipo en(am)-2<sup>+</sup>, tipo de apareamiento a y fértiles, mientras que dos tercios de la progenie mostrarían un fenotipo en(am)-2. Además, la mitad de la clase mutante en(am)-2 sería de tipo apareamiento A y fértiles y la mitad sería de tipo de apareamiento a e incapaces de producir ascoporas en cruzas.

En la tabla 2 se muestran los resultados de una cruz del tipo descrito anteriormente. Para su análisis, solamente se considerará la progenie que heredó el alelo am132, debido a que en un fondo genético silvestre una mutación en en(am)-2 es críptica (ver la sección anterior). Como puede

verse en la tabla 2, las relaciones fenotípicas  $en(am)-2^+$  - vs.  $en(am)-2$  ajustan a una relación 2:1, indicando que el locus  $en(am)-2^+$  se encuentra en el segmento transpuesto de la cepa T(II+I)NM177. Los resultados de las pruebas de tipo de apareamiento y fertilidad están también cerca de lo esperado, aportando apoyo adicional para esta conclusión.

Efecto de la dosis génica de  $en(am)-2^+$  sobre crecimiento y actividad de GOGAT. Habiendo demostrado que  $en(am)-2^+$  se encuentra en el segmento transpuesto de la cepa T(II+I)NM177, se construyeron dos cepas con duplicaciones parciales (ver Material y Métodos) llevando uno o dos alelos  $en(am)-2$  silvestres. Estas cepas se construyeron en un fondo genético am132. Estos diploides parciales se crecieron en medio mínimo con nitrato de amonio como única fuente de nitrógeno y se midió la actividad específica de GOGAT en extractos libres de células. Como se muestra en la tabla 3, se encontró una ligera diferencia entre las actividades de GOGAT de la cepa haploide am132 y las de el diploide parcial heterocigótico (compare la línea 1 con la 2 en la tabla 3). Sin embargo, cuando el diploide parcial lleva dos copias de  $en(am)-2^+$ , la actividad específica de GOGAT fue un 50% mayor que la encontrada en el diploide parcial heterocigótico (líneas 2 y 3, tabla 3). Por lo tanto, el gene  $en(am)-2^+$  muestra un efecto de dosis génica sobre la actividad específica de GOGAT.

Las diferencias encontradas en la actividad específica de GOGAT en los diploides parciales tienen una clara influencia sobre la velocidad de crecimiento de estas cepas en medio mínimo con nitrato de amonio como única fuente de nitrógeno. Después de una fase lag de 8 horas, las cepas am132, am132;en(am)-2(C24)/en(am)-2<sup>+</sup> y am132;en(am)-2<sup>+</sup>/en(am)-2<sup>+</sup> crecieron con tiempos de duplicación de 7, 9 y 4

horas, respectivamente. Por lo tanto, existe una relación inversa entre los niveles de actividad de GOGAT y el tiempo de duplicación.

Material que cruza con anticuerpos en extractos mutantes. - Se utilizó una preparación de GOGAT purificada parcialmente (150 veces) para inducir anticuerpos anti-GOGAT en conejos. Esta preparación de anticuerpos neutraliza la actividad de GOGAT en extractos libres de células de la cepa am132 (Fig. 2).

Para detectar la presencia de material que cruce con anticuerpos (cross-reacting material o CRM) en extractos de cepas mutantes se utilizó una técnica basada en el desplazamiento de curvas de inmunoprecipitación. Brevemente, el anticuerpo se pretrata con extractos provenientes de células mutantes, incubándose a 4°C el tiempo suficiente para permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno (si es que este último existe). Estos complejos se eliminan por centrifugación y el anticuerpo restante en el sobrenadante se utiliza para titular la actividad de GOGAT de un extracto libre de células de la cepa am132.

Si el extracto de la mutante por analizar carece de CRM, no se eliminará anticuerpo durante el pretratamiento, por lo que la calidad de anticuerpo en las preparaciones de anticuerpo pretratadas y sin pretratar será idéntica. Por tanto, al titular la actividad GOGAT de la cepa am132 se obtendrán curvas idénticas, independientemente de la preparación de anticuerpo utilizado. Por otro lado, si el extracto de la mutante por analizar tiene CRM, se eliminará anticuerpo durante el pretratamiento, por lo que la cantidad de anticuerpo en la preparación pretratada será menor que en la preparación sin pretratar. En este caso, al titular

la actividad de GOGAT de la cepa am132 con la preparación pretratada se obtendrá una menor precipitación de actividad en enzimática en comparación a la precipitación obtenida con la preparación sin pretratar. El grado de desplazamiento de la curva proporciona una medida indirecta de la cantidad de CRM presente en el extracto de la cepa mutante.

En la Fig. 2 se muestran los resultados de un experimento similar al descrito. La curva 1 (Fig. 2) muestra la -- inactivación de la actividad de GOGAT de la cepa am132 a diferentes concentraciones de anticuerpo sin pretratar. Por otro lado, si se pretrata el anticuerpo con 1 mg de proteína total de extractos de la cepa am132;en(am)-2(C24) y luego se titula la actividad de GOGAT de la cepa am132 se obtiene un ligero desplazamiento en el perfil de neutralización (Fig. 2, curva 2). Por último, la cepa am132;en(am)-2 (DR-2) posee suficiente CRM en 1 mg de proteína total como para desplazar fuertemente el perfil de neutralización, de tal manera que la actividad de GOGAT de la cepa am132 solamente se neutraliza un 30% a la mayor concentración de anticuerpo probada (Fig. 2, curva 3).

En conclusión, estos datos muestran claramente la presencia de antígenos enzimáticamente inactivos en ambas mutantes, aunque a diferentes niveles.

Análisis del polipéptido de GOGAT en cepas mutantes. Con el propósito de encontrar diferencias estructurales entre el polipéptido de GOGAT de las mutantes en(am)-2 y el de la cepa am132, se inmunoprecipitaron los polipéptidos respectivos y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

Se ha descrito que la GOGAT de N. crassa está compuesta por un solo polipéptido con un peso molecular de 200 000 - (18). Como se ve en la Fig. 3 (carril a) el anticuerpo precipita un polipéptido de 200 000 de peso molecular a partir de extractos libres de células de la cepa am132. Algunas - mutantes que afectan en(am)-2 (alelos DR-1 y DR-2, Fig. 3 - carriles c y d) muestran también el polipéptido de 200 000 de peso molecular, correspondiente a GOGAT. Por tanto, esto indica que el CRM detectado en la cepa am132;en(am)-2 - (DR-2) por el ensayo mostrado en la Fig. 2 (curva 3) es un polipéptido del mismo peso molecular que la GOGAT de la - - cepa silvestre. Además, ambas cepas presentan una banda - tenue de 180 000 de peso molecular, la cual no se encuentra en extractos celulares de la cepa am132 y que podría tener relación con el polipéptido para GOGAT.

Los alelos restantes de en(am)-2, C24 y DR-3 no mues--- tran el polipéptido de 200 000 de peso molecular ni polipép- tidos de peso molecular menor. Sin embargo, al menos en la cepa am132;en(am)-2(C24) se han detectado niveles bajos de CRM por procedimientos inmunoquímicos (Fig. 2, curva 2). - Las posibles razones para esta discrepancia se analizan en la sección de Discusión.



## ALGUNOS RESULTADOS ADICIONALES

La mutación en(am)-2(C24) no confiere un fenotipo Asm<sup>-</sup>. Se ha descrito que cepas de Klebsiella aerogenes, K. pneumoniae, Salmonella typhimurium y Escherichia coli alteradas en la formación de GOGAT presentan fenotipos distintivos. Estos fenotipos son la incapacidad de crecer en condiciones de limitación de amonio así como la incapacidad de crecer en diversos aminoácidos como única fuente de nitrógeno. Este último fenotipo se ha denominado Asm<sup>-</sup>. En común, la mutante en(am)-2(C24) es incapaz de crecer en limitación de amonio. Sin embargo, no se sabe si esta mutación confiere un fenotipo Asm<sup>-</sup>. Dada la carencia de datos acerca de los diferentes fenotipos que confiere la pérdida de GOGAT en eucariotes sencillos, nos pareció importante analizar si la mutación en(am)-2(C24) confiere un fenotipo Asm<sup>-</sup>.

Para tal fin, se inocularon cultivos estacionarios conteniendo diferentes aminoácidos como única fuente de nitrógeno con la cepa silvestre 74-A o con la cepa mutante en(am)-2(C24). Estos cultivos se incubaron 72 hrs a 30°C sin agitación. Ocasionalmente se agitaron los cultivos para impedir la formación de micelio aéreo. Concluida la incubación, se recuperó el micelio resultante y se determinó la concentración de proteína en el cultivo, como una manera semicuantitativa de determinar el grado de crecimiento. En la Tabla 4 se presentan los datos de un experimento de este tipo. Arbitrariamente, definimos una diferencia significativa como aquella en la que la concentración de proteína varíe en más de un 20%. En este experimento, además de incluir seis sustratos Asm (Ala, Arg, His, Met, Pro y Ser) se incluyeron 5 más de los cuales no se sabe si son sustratos Asm (Ile, Leu, Phe, Thr y Val).

Como se ve en la Tabla 4, la cepa en(am)-2(C24) fue capaz de crecer en todos los sustrato probados de manera similar a como lo hace la cepa silvestre. Sin embargo, es interesante hacer notar el que existen dos sustratos en los cuales la mutante en(am)-2(C24) presenta un comportamiento anómalo. Para el caso de His, la cepa en(am)-2(C24) alcanza solamente la mitad del crecimiento obtenido por la cepa silvestre, mientras que el Ile la cepa en(am)-2(C24) crece tres veces más que la cepa silvestre (Tabla 4). Hasta el momento, desconocemos la razón de estas diferencias, pero podría estar relacionado a diferencias no identificadas en el fondo genético de ambas cepas. Sin embargo, el crecimiento que presenta la cepa en(am)-2(C24) en todos los sustratos Asm, nos lleva a concluir que esta mutación, a diferencia de en los organismos procariotes, no confiere un fenotipo Asm<sup>-</sup>.

Inhibición in vitro de la actividad de GOGAT por L-metionina sulfona (MSF).- Para el análisis genético de un paso metabólico, un enfoque interesante consiste en el aislamiento de mutantes resistentes a inhibidores específicos de este paso. Dentro de las posibles alteraciones por obtener, algunas interesantes serían aquellas en las que se produjera una enzima alterada la cual fuera ahora resistente al inhibidor o mutaciones en reguladores o zonas regulatorias que condujeran a la sobreproducción de la enzima normal. La aplicación de este enfoque para el análisis genético de GOGAT ha sido obstaculizada por la falta de inhibidores específicos de ella. El inhibidor comúnmente utilizado, azaserina, presenta como principal inconveniente el ser un inhibidor general de amidotransferasas.

Sin embargo, existen otros inhibidores. El grupo de Brenchley ha reportado la inhibición de la actividad de la GOGAT de K. aerogenes (4) con el análogo de glutamina L-metionina sulfona.

Si bien este inhibidor es capaz de inhibir a la glutamino - sintetasa, se requiere una concentración de MSF mayor que la necesaria para inhibir totalmente la GOGAT. Por otro lado, MSF es activo como inhibidor de la GOGAT de Sacharomyces cerevisiae. En este caso, MSF actúa como un inhibidor competitivo con respecto a la glutamina de la GOGAT de esta levadura, de tal manera que mientras la Km por Gln es del orden de 300  $\mu$ M, la Ki por MSF es de 5  $\mu$ M (28).

En vista de estos antecedentes, decidimos probar la -- efectividad de MSF como inhibidor de la GOGAT de N. crassa. Para tal fin, se obtuvieron extractos de la cepa am132 crecida en limitación de amonio y se determinó la susceptibilidad de la actividad de GOGAT a inhibición in vitro por MSF. Como se vé en la Fig. 4, la actividad de GOGAT se inhibe totalmente por la adición de MSF a una concentración de 0.2 mM. La actividad de glutamino sintetasa (medida por el ensayo de sintetasa) es insensible a inhibición aún a 1 mM de MSF. Dado que se ha reportado que MSF no inhibe a GDH (4) pensamos que contamos con un inhibidor específico de la actividad de GOGAT.

Inhibición del crecimiento de la cepa am132 con MSF. - Habien do determinado que MSF es capaz de inhibir in vitro la actividad de GOGAT, se decidió analizar la capacidad de MSF para inhibir el crecimiento de cepas que sintetizan glutamato solamente a través de la vía GS-GOGAT. En la tabla 5 se presenta la sensibilidad a MSF de diversas cepas. Mientras que la cepa silvestre es resistente a las concentraciones probadas de MSF, una cepa carente de GDH (am132) es hipersensible a este inhibidor, siendo inhibido su crecimiento a 0.5 mM de MSF. La hipersensibilidad a MSF de la cepa am132 puede contrastarse por la adición de glutamato al medio de cultivo, lo

cual es consistente con un bloqueo de la vía GS-GOGAT.

Una posibilidad para explicar la hipersensibilidad a MSF de la cepa am132 sería que MSF inhibiera in vivo la actividad de GOGAT. Esta hipótesis predice que cepas que -- hiperprodujeran GOGAT en un fondo genético am132 serían resistentes a los efectos de MSF, mientras que cepas que produjeron niveles normales de GOGAT serían sensibles a este inhibidor. La confirmación experimental de esta predicción se logró a través del análisis de los niveles de resistencia de diploides parciales en un fondo genético am132. Como se describió en la tabla 3 y en la sección correspondiente, la cepa am132;en(am)-2(C24)/en(am)-2<sup>+</sup> sintetiza GOGAT de manera similar a la cepa am132, mientras que la cepa -- am132;en(am)-2<sup>+</sup>/en(am)-2<sup>+</sup> produce más GOGAT (50% más que la cepa am132;en(am)-2(C24)/en(am)-2<sup>+</sup>). Al analizar los niveles de resistencia a MSF de estas cepas (tabla 5) se observó que la cepa am132;en(am)-2(C24)/en(am)-2<sup>+</sup> es hipersensible a inhibición por MSF mientras que la cepa am132;en(am)-2<sup>+</sup>/en(am)-2<sup>+</sup> es parcialmente resistente a una concentración de MSF (0.5 mM) la cual inhibe totalmente el crecimiento de la cepa am132. Estos datos satisfacen la predicción previamente planteada.

Por tanto, concluimos que la razón de la hipersensibilidad de la cepa am132 a MSF es debida a la inhibición in vivo de la actividad de GOGAT. Sin embargo, no podemos excluir hasta el momento el que además de la inhibición in vivo de GOGAT, exista inhibición in vivo de GS.

## DISCUSION

En este trabajo se describe el aislamiento y caracterización de tres nuevas mutantes de N. crassa las cuales carecen de actividad de GOGAT. Los datos de mapeo y complementación presentados en este trabajo indican que estas mutaciones son alélicas entre sí y que están afectando el locus en(am)-2 previamente descrito (12, 18). Todas estas mutaciones fueron recesivas frente a el alelo silvestre en heterocariotes forzados y para el caso de la mutación en(am)-2(C24), aún en diploides parciales.

La pérdida de actividad de GOGAT en estas mutantes podría ser explicada en el contexto de diferentes hipótesis, las cuales se plantean a continuación.

- 1). Mutaciones en el gene estructural para GOGAT.
- 2). Mutaciones en loci encargados de la regulación transcripcional de GOGAT. Ejemplos de este tipo de mutaciones serían la pérdida de un activador o la creación de un superrepressor.
- 3). Mutaciones en una enzima procesadora post-traduccional. En una modalidad, esta hipotética enzima procesadora sería la encargada de procesar un precursor de GOGAT a la forma enzimáticamente activa. La pérdida de este procesador conduciría a la pérdida de actividad de GOGAT. En una segunda alternativa, la enzima procesadora formaría parte de un sistema en el cual la GOGAT procesada sería enzimáticamente inactiva. En este caso, la sobreproducción de un procesador con efectos negativos conduciría a la pérdida de actividad de GOGAT.

De una manera primaria, algunas de estas hipótesis - - podrían descartarse considerando el comportamiento en complementación de las mutantes aisladas. Si las mutaciones - estuvieran provocando la pérdida de actividad de GOGAT por crear un superrepresor o por la sobreproducción de un procesador con efectos negativos, se esperaría que las mutaciones fueran dominantes frente a el alelo silvestre. Contrario a esta expectativa, todas las mutantes fueron recesivas frente a el alelo silvestre. Estos datos, si bien hacen - improbables hipótesis como la creación de un superrepresor o la sobreproducción de un procesador negativo, no pueden - distinguir entre hipótesis que postulan mutación en el gene estructural o mutación de un activador o mutación en un - - procesador positivo, ya que cualquiera de estas sería recesiva frente a el alelo silvestre.

Sin embargo, la decisión entre estas alternativas puede alcanzarse por dos líneas de evidencia. La primera de - - ellas es que en(am)-2 muestra un efecto de dosis génica sobre la actividad de GOGAT. Una cepa que porta dos copias - génicas en(am)-2<sup>+</sup> posee niveles de GOGAT superiores en un - 50% a los encontrados en el diploide heterocigótico. Dado que la duplicación del gene en(am)-2<sup>+</sup> no genera una duplicación de la actividad de GOGAT, no podemos excluir la presencia de factores, como compensación metabólica, los cuales - limiten la actividad de GOGAT. Sin embargo, esto no excluye la existencia de dosis génica, ya que se han reportado - incrementos similares a los encontrados en este trabajo para loci de levadura (19) y Drosophila (11) donde existe - - dosis génica. Generalmente se encuentra una relación directa entre dosis génica y la actividad enzimática correspondiente para el caso de genes estructurales, como en los loci génicos de levaduras para fosfatasa alcalina (19), adenilato ciclasa (29) y proteinasa B (45). En contraste, no se -

ha encontrado un efecto de dosis génica para el caso de genes reguladores positivos, como GAL4 (21) y PH09 (19) en levadura.

El hallazgo de un efecto de dosis génica de en(am)-2 sobre la actividad de GOGAT es un dato que favorece el que en(am)-2 sea el gene estructural para GOGAT, a la vez que hace improbables otras hipótesis como la de un activador o un procesador positivo.

La segunda línea de evidencia que indica que en(am)-2 es el gene estructural para GOGAT, es el hallazgo de altos niveles de material que cruza con anticuerpos (CRM) en algunas cepas mutantes. Como puede verse en la Fig. 2, la cepa mutante am132;en(am)-2(DR-2) presenta cantidades altas de CRM, mientras que la cepa mutante am132;en(am)-2(C24) presenta bajos niveles de CRM. Sin embargo, ambas cepas mutantes carecen de actividad enzimática de GOGAT.

El peso molecular de el polipéptido para GOGAT en al menos dos de las mutantes en(am)-2 (DR-1 y DR-2, Fig. 3) es similar al de la enzima silvestre. Esta es evidencia adicional para la presencia de proteína enzimáticamente inactiva en estas cepas. Creemos que la banda tenue de un peso molecular de 180 K en ambas cepas mutantes podría deberse a degradación proteolítica de proteínas mutantes de 200 K, como se ha reportado para el caso de proteínas mutantes de E. coli (44) o aún proteínas silvestres de N. crassa (16). Esto podría explicar también nuestra incapacidad para visualizar un polipéptido mutante en la cepa am132;en(am)-2(C24), a pesar de su detección por procedimientos inmunoquímicos (Fig. 2, curva 2).

La existencia de CRM concomitante con una baja o nula actividad enzimática es un criterio común que suele indicar una mutación estructural (14, 24, 37). Si estas mutaciones estuvieran afectando un activador transcripcional, todas las mutantes deberían carecer de CRM, el cual no es el caso. Por otro lado, si el afectado fuera un procesador positivo, todas las mutantes deberían presentar niveles similares de CRM, el cual no es el caso. Por tanto, nuestros resultados indican que las mutaciones descritas en este trabajo están localizadas muy probablemente dentro del gene estructural para GOGAT. Es importante hacer notar que esta es la primera demostración sobre la naturaleza estructural de mutaciones que afectan la actividad de GOGAT en cualquier eucariote.

Una pregunta que surge en este momento es el por qué todas las mutantes aisladas están afectando el gene estructural y no genes regulatorios. Una posibilidad es que la extensión de esta búsqueda sea aún incompleta y que la falta de mutantes regulatorias sea un reflejo de esta circunstancia. Una segunda posibilidad es que el hipotético regulador para GOGAT lo sea también de otras funciones vitales para el crecimiento celular, formando una red regulatoria. Por tanto, una mutación que afectara este regulador para evitar la actividad de GOGAT afectaría otras funciones al mismo tiempo. Una posible manera de seleccionar mutantes regulatorias podría consistir en el aislamiento de mutantes resistentes a L-metionina sulfona (MSF) en un fondo genético am132.

Como se muestra en este trabajo, una probable causa de la hipersensibilidad de mutantes am hacia MSF es por inhibición de la actividad de GOGAT. Si bien una selección de mutantes MSF<sup>r</sup> podría conducir al aislamiento de nuevas -



mutantes estructurales (por una mutación que disminuya la afinidad por MSF o por duplicación) así como de transporte, también podría conducir a la sobreproducción de la actividad de GOGAT, uno de los fenotipos concebibles para mutación en un gene regulatorio. Si la hipótesis de la red regulatoria es correcta, esto provocaría la sobreproducción de otras actividades al igual que la GOGAT. Ciertamente, esto podría ser una situación metabólicamente problemática, pero decididamente lo será menos que la pérdida de todas las actividades de esta hipotética red regulatoria.

El análisis genético y molecular de la GOGAT de N. crassa se encuentra aún en sus comienzos. Algunos puntos de relevancia para la investigación futura en esta área serán:

- a) La determinación del nivel de regulación bajo el cual se controla GOGAT;
- b) el aislamiento y caracterización de mutaciones en genes regulatorios;
- c) la clonación y análisis del gene estructural para GOGAT.

Es de esperarse que los resultados de este trabajo, así como las mutantes y anticuerpos derivados de él, contribuyan a este esfuerzo.

Tabla 1.- Actividad específica de GOGAT en auxótrofos de glutamato.

Genotipo	Actividad específica, GOGAT <sup>a</sup>
<u>am132</u>	11.25 ± 1.05
<u>am132;en(am)-2(C24)</u>	<1.05
<u>am132;DR-1</u>	<1.05
<u>am132;DR-2</u>	<1.05
<u>am132;DR-3</u>	<1.05

<sup>a</sup>La actividad específica de GOGAT se determinó después de 24 h. de crecimiento a 25°C en 0.5 mM de glutamato como única fuente de nitrógeno. La actividad específica - - (media ± SD para determinaciones en duplicado) se expresa como nM de NADH oxidado. min<sup>-1</sup>. mg de proteína en el extracto<sup>-1</sup> a 25°C.

Tabla 2.- Localización de en(am)-2<sup>+</sup> en el segmento translocado de la cepa T(II→I)NM177.

Cruza	Progenie		
	Silvestre	am	am,en(am)
T(II→I)NM177, M. t. <u>a</u>			
<u>am132;en(am)-2(C24)M. t. A</u>	69	62 <sup>a</sup>	32 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>La mayor parte de los aislados en esta categoría (58/62) fueron de tipo de apareamiento (M. t.) a. Dentro de estos aislados se encontró tanto progenie fértil (36/62) como incapaz de producir ascosporas en cruza (26/62).

<sup>b</sup>La mayoría de los aislados en esta clase fueron M. t. A (24/32) y todos ellos fértiles.

Tabla 3.- Efecto de la dosis génica de en(am)-2<sup>+</sup> sobre la actividad específica de GOGAT.

Cepa control y diploides parciales <sup>a</sup> .	Dosis génica de en(am)-2 <sup>+</sup>	Actividad específica de GOGAT <sup>b</sup>
<u>am132</u>	1	23.3 ± 1.13
<u>am132;en(am)-2(C24)/en(am)-2<sup>+</sup></u>	1	19.7 ± 0.79
<u>am132;en(am)-2<sup>+</sup>/en(am)-2<sup>+</sup></u>	2	30.38 ± 1.58

<sup>a</sup> La segunda y tercera cepas son diploides parciales que llevan una duplicación de la región en(am)-2 en el grupo de ligamiento II; la primera cepa es euploide y tiene una secuencia génica normal.

<sup>b</sup> La actividad específica de GOGAT se determinó después de 24 h. de crecimiento a 25°C en 25 mM nitrato de amonio como única fuente de nitrógeno. La actividad específica se expresó como nM de NADH oxidado . min<sup>-1</sup> . mg de proteína en extracto<sup>-1</sup> a 25°C.

Tabla 4.- Pruebas de crecimiento de 74-A y en(am)-2 en dife-  
rentes fuentes de nitrógeno.\*

Medio**	Tiempo (hrs.)	mg de protefina/ml de cultivo 74-A	<u>en(am)-2</u>
SN	0	6.48	4.62
SN	72	5.5	3.7
SNA1a	72	551.8	508.49
SNArg	72	830.1	875.4
SNHis	72	118.5	58.3
SNile	72	78.4	247.05
SNLeu	72	429.2	402.8
SNLys	72	15.6	39.2
SNMet	72	554.7	515.09
SNPhe	72	277.3	270.7
SNPro	72	332.5	261.7
SNSer	72	58.3	77.7
SNThr	72	162.9	159.2
SNTrp	72	4.2	14.1
SNVal	72	104.7	79.2

\* Se llevó a cabo en cultivos estacionarios (20 ml) a 30°C. por 72 hrs. (Slants Vogel). Al cabo de este tiempo se filtró todo el cultivo y se determinó protefina.

\*\* En todos los casos se agregó el volumen apropiado del aminoácido (esterilizado por filtración) a una concentración final de 0.2%.

Tabla 9.- Efecto de L-metionina sulfona sobre el crecimiento de cepas de N. crassa.  
Ensayos en caja.

Cepas	Vogel	Vogel+0.2mM MSF	Vogel+0.5mM MSF	Vogel Glu5mM MSFO.5mM
74-A	+	+	+	+
<u>am132</u>	+	+/-	-	+
<u>am132;en(am)-2(C24)/en(am)-2<sup>+</sup></u>	+	+/-	-	NP
<u>am132;en(am)-2<sup>+</sup>/en(am)-2<sup>+</sup></u>	+	+	+/-	NP

Temperatura: 30°C.      Tiempo de registro: 48 hrs.      NP=No probado.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
 DE LA UNAM

Secuencia normal.  
 $(am_1 32; en(am)-2 (C24))$

Translocación.  
 $(T(II \rightarrow I) NM177)$

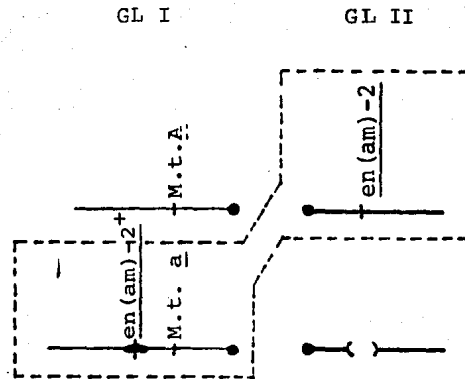


Fig. 1.-Generación de diploides parciales durante meiosis de una cruce de una cepa con secuencia normal por una translocación insercional. En la última, un segmento pequeño del brazo derecho del grupo de ligamiento (GL) II (línea gruesa) se encuentra ahora en el brazo derecho de GL I (línea delgada). Por segregación independiente en ausencia de entrecruzamiento, se obtiene progenie con una duplicación parcial del tipo mostrado dentro de la línea interrumpida. Por sencillez, solo se muestra una cromátida de cada par. M.t., tipo de apareamiento; ●, centrómero.

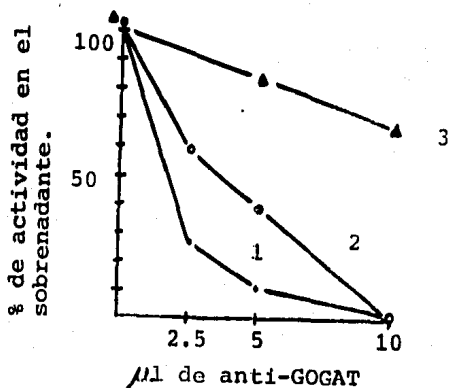


Fig.2.- Titulación de anti-GOGAT en mutantes y en la cepa silvestre. A cada tubo, se añadieron cantidades variables de anti-GOGAT y un mg de proteína de un extracto libre de células de am<sub>132</sub>;en(am)-2(C24), (curva 2) o de am<sub>132</sub>;en(am)-2(DR-2) (curva 3). Los tubos se incubaron por 12 h a 4°C y se centrifugaron. Posteriormente se añadió un mg de proteína de un extracto libre de células de la cepa am<sub>132</sub>, al sobrenadante de cada tubo. Después de 5 h a 4°C se determinó la actividad de GOGAT en los sobrenadantes. Se muestra también la titulación de la actividad de GOGAT en un mg de proteína de la cepa am<sub>132</sub> (curva 1).



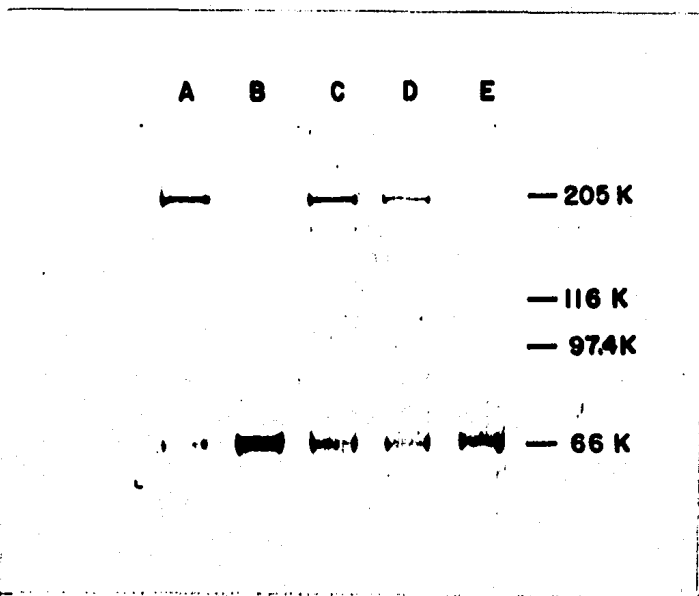


Fig.3.- Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de la GOGAT inmunoprecipitada de cepas mutantes y de la cepa silvestre. Para cada cepa se inmunoprecipitaron 0.5 mg de proteína de extractos, como se describió en Material y Métodos. Los inmunoprecipitados se sometieron a electroforesis y se tiñeron con Azul brillante de Coomassie. (A) am<sub>132</sub>, (B) am<sub>132</sub>;en(am)-2 (C24), (C) am<sub>132</sub>;en(am)-2 (DR-1), (D) am<sub>132</sub>;en(am)-2 (DR-2), (E) am<sub>132</sub>;en(am)-2 (DR-3). En la parte derecha de la figura se indica la posición de los marcadores de peso molecular. La banda en 66K de peso molecular es albúmina sérica bovina, la cual se utilizó como marcador interno de peso molecular.

EFFECTO DE LA ADICION DE L-METIONINA SULFONA  
SOBRE LA ACTIVIDAD IN VITRO DE GOGAT Y GS.

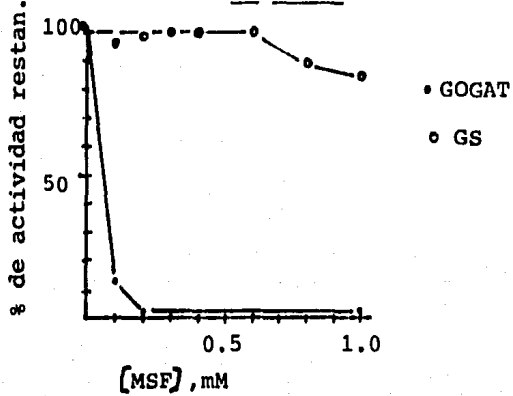


Fig.4

## REFERENCIAS

1. Berberich, M.A. 1972. A glutamate-dependent phenotype in E. coli K-12: the result of two mutations. Biochem. Biophys. Res. Commun. 47: 1498-1503.
2. Bohannon, D.E., M.S. Rosenkrantz, A.L. Sonenshein. 1985. Regulation of Bacillus subtilis glutamate synthase genes by the nitrogen source. J. Bacteriol. 163: 957-964.
3. Boland, M.J., A.G. Benny. 1977. Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules. Purification and properties of NADH-dependent glutamate synthase from lupin nodules. Eur. J. Biochem. 79: 355-362.
4. Brenchley, J.E. 1973. Effect of methionine sulfoximine and methionine sulfone on glutamate synthesis in Klebsiella aerogenes. J. Bacteriol. 114: 666-673.
5. Calderón, J., J. Mora. 1985. Glutamine cycling in Neurospora crassa. J. Gen. Microbiol. 131: 3237-3242.
6. Cataño Navarro, Irene Beatriz. 1986. Aislamiento y caracterización de mutaciones que afectan la síntesis de GOGAT de E. coli. Tesis para obtener el grado de Maestro en Investigación Biomédica Básica. UACPyP del C.C.H. U.N.A.M.
7. Davis, R.H. and F.J. de Serres. 1970. Genetic and microbiological research techniques for Neurospora crassa. Methods in Enzymol. 17A: 79-143.
8. Deshpande, K.L., J.F. Kane. 1980. Glutamate synthase from Bacillus subtilis: in vitro reconstitution of an active amidotransferase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 93: 308-314.
9. Deshpande, K.L., J.R. Katze, K.F. Kane. 1980. Regulation of glutamate synthase from Bacillus subtilis by glutamine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 95: 55-60.

10. Deshpande, K.L., J.R. Katze, J.F. Kane. 1981. Effect of glutamine on enzymes of nitrogen metabolism in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 145: 768-774.
11. Devlin, R.H., D.G. Holm, T.A. Grigliatti. 1982. Autosomal dosage compensation in Drosophila melanogaster strains trisomic for the left arm of chromosome 2. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 1200-1204.
12. Dunn-Coleman, N.S., E.A. Robey, A.B. Tomsett, R.H. Garrett. 1981. Glutamate synthase levels in Neurospora crassa mutants altered with respect to nitrogen metabolism. Mol. Cell. Biol. 1: 158-164.
13. Fincham, J.R.S. The occurrence of glutamic dehydrogenase in Neurospora and its apparent absence in certain mutant strains. J. Gen. Microbiol. 5: 793-806.
14. Free, S.H., R.T. Schimke, W.F. Loomis. 1976. The structural gene for  $\alpha$ -mannosidase-1 in Dictyostelium discoideum. Genetics. 84: 159-174.
15. Fuchs, R.L., M.J. Madonna, J.E. Brenchley. 1982. Identification of the structural gene for glutamate synthase and genetic characterization of this region of the Salmonella typhimurium chromosome. J. Bacteriol. 149: 906-915.
16. Gaertner, F.H., K.W. Cole. 1976. The protease problem in Neurospora. Structural modification of the arom multienzyme system during its extraction and isolation. Arch. Biochem. Biophys. 177: 566-573.
17. Hummelt, G., J. Mora. 1980. NADH-dependent glutamate synthase and nitrogen metabolism in Neurospora crassa. Biochem. Biophys. Res. Commun. 92: 127-133.
18. Hummelt, G., J. Mora. 1980. Regulation and function of glutamate synthase in Neurospora crassa. Biochem. Biophys. Res. Commun. 96: 1688-1694.

19. Kaneko, Y., A. Toh-e, Y. Oshima. 1982. Identification of the genetic locus for the structural gene and a new regulatory gene for the synthesis of repressible alkaline phosphatase in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. 2: 127-137.
20. Kim, C.H., T.C. Hollocher. 1982.  $^{13}\text{N}$  isotope studies on the pathway of ammonia assimilation in Bacillus megaterium and Escherichia coli. J. Bacteriol. 151: 358-366.
21. Klar, A.J., H.O. Halvorson. 1976. Effect of GAL4 gene dosage on the level of galactose catabolic enzymes in Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 125: 379-381.
22. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London). 227: 680-685.
23. Lara, M., L. Blanco, M. Campomanes, E. Calva, R. Palacios, J. Mora. 1982. Physiology of ammonium assimilation in Neurospora crassa. J. Bacteriol. 150: 105-112.
24. Lehman, J.F., R.L. Metzenberg. 1976. Regulation of phosphate metabolism in Neurospora crassa. Identification of the structural gene for repressible alkaline phosphatase. Genetics. 84: 175-182.
25. Lomnitz Adler, Rafael Alberto. 1983. Análisis molecular de la Fisiología de la asimilación de amonio en Neurospora crassa. Tesis para obtener el título de Licenciado en Investigación Biomédica Básica. UACPyP. del C.C.H. UNAM.
26. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
27. Madonna, M.J., R.L. Fuchs, J.E. Brenchley. 1985. Fine structure analysis of Salmonella typhimurium glutamate synthase genes. J. Bacteriol. 161(1): 353-360.
28. Masters Jr., D.S., A. Meister. 1982. Inhibition by homocysteine sulfonamide of glutamate synthase purified from Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 257: 8711-8715.

29. Matsumoto, K., I. Uno, T. Ishiwawa. 1984. Identification of the structural gene and nonsense alleles for adenylate cyclase in Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 157: 277-282.
30. Metzzenberg, R.L., M.K. Gleason, B.S. Littlewood. 1974. Genetic control of alkaline phosphatase synthesis in Neurospora: the use of partial diploids in dominance studies. Genetics. 77: 25-43.
31. Mifflin, B.J., P.J. Lea. 1980. Ammonia Assimilation en the Biochemistry of Plants. Vol. 5, pp. 169-202. Academic Press, Inc.
32. Mora, J., G. Dávila, G. Espín, A. González, J. Guzmán, G. Hernández, G. Hummelt, M. Lara, E. Martínez, Y. Mora, D. Romero. 1980. Glutamine metabolism in Neurospora crassa. p. 185-211. En J. Mora y R. Palacios (eds.) Glutamine: Metabolism, enzymology and regulation. Academic Press, Inc.
33. Perkins, D.D. 1972. An insertional translocation in Neurospora that generates duplication heterozygous for mating type. Genetics. 71: 25-51.
34. Perkins, D.D., E.G. Barry. 1977. The cytogenetics of Neurospora. Adv. Genet. 19: 133-285.
35. Rhodes, D., G.A. Rendon, G.R. Stewart. 1976. The regulation of ammonia assimilating enzymes in Lemna minor. Planta (Berl.). 129: 203-210.
36. Rosenfeld, S.A., S.M. Dendinger, C.H. Murphy, J.E. Branchley. 1982. Genetic characterization of the glutamate dehydrogenase gene (gdhA) of Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 150: 795-803.
37. Sánchez, F., G. Dávila, J. Mora, R. Palacios. 1979. Immunochemical characterization of glutamine synthetase from Neurospora crassa glutamine auxotrophs. J. Bacteriol. 139: 537-543.

38. Sánchez-Pescador, R., E. Sanvicente, F. Valle, F. Bolívar. 1982. Recombinant plasmids carrying the glutamate dehydrogenase structural gene from Escherichia coli K-12. Gene. 17: 1-8.
39. Senior, P.J. 1975. Regulation of nitrogen metabolism in Escherichia coli and Klebsiella aerogenes: studies with continuous-culture technique. J. Bacteriol. 123: 407-418.
40. Servín-González, L., F. Bastarrachea. 1984. Nitrogen regulation of synthesis of the high affinity methylammonium transport system of Escherichia coli. J. Gen. Microbiol. 130: 3071-3077.
41. Somerville, C.R., W.L. Ogren. 1980. Inhibition of photosynthesis in Arabidopsis mutants lacking leaf glutamate synthase activity. Nature (London): 257-259.
42. Stewart, G.R., A.F. Mann, P.A. Fentem. 1980. Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase. En the Biochemistry of Plants. Vol. 5, pp. 271-325. Academic Press, Ing.
43. Tyler, B. 1978. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. Ann. Rev. Biochem. 47: 1127-1162.
44. Villarejo, M.R., I. Zabin. 1974.  $\beta$ -galactosidase from termination and deletion strains. J. Bacteriol. 120: 466-474.
45. Zubenko, G.S., A.P. Mitchell, E.W. Jones. 1979. Septum formation, cell division and sporulation in mutants of yeast deficient in proteinase B. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76: 2395-2399.