

03062
12/6

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
DEL C.C.H.
CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO

Estudios sobre la Regulación de los Flujos del Carbono y del
Nitrógeno en Neurospora crassa.

TESIS

que para obtener el grado de Maestra en Investigación

Biomédica Básica

presenta la Licenciada:

Georgina Hernández Delgado.

1983

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUCCION..... | 1 |
| I. Activación de Aconitico..... | 1 |
| 1.-Uña de activación de aconitico en procar- violencia..... | 1 |
| 2.-Uña de activación de aconitico en <u>Neurospora</u> <u>crassa</u> | 2 |
| 3.-Activación del estado de la glutamina en <u>Neurospora crassa</u> | 5 |
| II. Regulación de la glutamina sintetasa..... | 7 |
| 1.-Regulación por los aminoácidos glicina, serina y alanina..... | 7 |
| 2.-Regulación por la fuente de carbono..... | 10 |
| III. Objetivos..... | 11 |
| MATERIAL Y METODOS..... | 13 |
| I. Cepas..... | 13 |
| II. Condiciones de Crecimiento..... | 13 |
| III. Concentración Intracelular de Metabolitos..... | 13 |
| 1. Aminoácidos..... | 13 |
| 2. Aconitico..... | 13 |
| 3. α -Cetoglutarato..... | 14 |
| 4. Glucosa..... | 14 |
| 5. α -Cetoglutarato Sintetizado de <u>aconitico</u> | 15 |
| IV. Concentración Extracelular de Aconitico..... | 15 |
| V. Incorporación de la Glutamina..... | 16 |
| VI. Determinación de Actividades Enzimáticas..... | 16 |
| 1. Glutamina Sintetasa..... | 16 |
| 2. Transaminasa de Glutamina..... | 17 |
| 3. Transaminasa de Glutámico..... | 17 |
| VII. Purificación de la Glutamina sintetasa..... | 17 |

| | |
|---|----|
| VIII. Mecanismo de replicación de la Glutamina Sintetasa de la Cepa Mutante Radiactivamente <u>in vitro</u> | 18 |
| IX. Electroforesis y Fluorografía..... | 18 |
| RESULTADOS Y DISCUSION..... | 20 |
| I. Regulación de la síntesis de la glutamina por los aminoácidos glicina, serina y alanina..... | 20 |
| 1. Inhibición de la actividad de la GS por glicina, serina y alanina..... | 20 |
| 2. Síntesis <u>in-vitro</u> de la glicina y serina por transaminación..... | 21 |
| 3. Inhibición <u>in-vivo</u> de la GS por glicina, serina y alanina..... | 23 |
| 3.1. Efecto sobre la asimilación primaria de nitrógeno..... | 23 |
| 3.1.a. En el crecimiento y regulación de la GS de la cepa silvestre..... | 23 |
| 3.1.b. En el crecimiento de cepas mutantes en las enzimas de asimilación de nitrógeno..... | 25 |
| 3.2. Efecto sobre la reasimilación del nitrógeno..... | 27 |
| 3.2.a. En el crecimiento y regulación de la GS..... | 28 |
| -De la cepa silvestre..... | 28 |
| -De una aislada reguladora de la GS | 31 |
| 3.2.b. En el crecimiento y en la reasimilación de nitrógeno en cepas con bloques en la reasimilación..... | 32 |
| -Cepa GDM ⁺ ! disminuye precisamente la capacidad para sintetizar glutamato..... | 33 |
| -Cepa GDM ⁺ GGGAT ⁺ ! disminuye más la capacidad para sintetizar glutamato..... | 34 |
| -Cepa GDM ⁺ GS ⁺ ! disminuye la capacidad para sintetizar glutamato y glutamina | 36 |
| II. Regulación del flujo de la fuente de carbono por el flujo de nitrógeno hacia la síntesis de la glutamina..... | 40 |

| | |
|------------------------|----|
| CONCLUSIONES | 47 |
| REFERENCIAS | 48 |
| TABLAS Y FIGURAS | 52 |
| AGRADECIMIENTOS | 76 |

INTRODUCCION

Como antecedentes a este trabajo de investigación revisaré en primer lugar, cuales son las vías de asimilación de amonio en procaríotes, así como lo que conocemos actualmente sobre la asimilación de amonio en el hongo *Neurospora crassa* que ha sido el resultado del trabajo realizado por el grupo de J. Mora. En el grupo se estudia la asimilación del nitrógeno inorgánico a compuestos orgánicos cuando el nitrógeno inorgánico está presente en el medio de cultivo como fuente de nitrógeno así como cuando se obtiene a partir de la degradación intracelular de un aminoácido como glutamina y el amonio resultante de la degradación es resasimilado en este aminoácido.

La síntesis de la glutamina constituye un punto importante donde confluyen los flujos del nitrógeno y del carbono y su regulación ha sido estudiada a diferentes niveles. Como segunda parte de estos antecedentes revisaré lo que se conoce en diferentes organismos sobre la regulación de la actividad de la glutamino sintetasa en particular lo que se refiere a su inhibición por algunos aminoácidos. También revisaré lo que se ha estudiado sobre la regulación de la glutamino sintetasa de hongos por la fuente de carbono.

Estos puntos servirán como marco de referencia para señalar los objetivos particulares de este proyecto de investigación dentro del proyecto general sobre la regulación del metabolismo nitrogenado de *Neurospora crassa*.

I. Asimilación de amonio

I.1. Vías de asimilación de amonio en procaríotes.

La asimilación de amonio se puede definir como la incorporación de una fuente de nitrógeno inorgánico a moléculas orgánicas. La manera en que los seres vivos asimilan y distribuyen el nitrógeno en diferentes compuestos orgánicos que forman parte de sus macromoléculas esenciales se ha estudiado tanto en microorganismos procaríotes y eucariotes como en plantas y animales superiores. Los diferentes enfoques experimentales, que van desde la descripción, fisiología y regulación de las enzimas que participan en dichos procesos.

hasta el aislamiento y regulación de los genes que codifican para estas enzimas, han ayudado a establecer los mecanismos de asimilación y distribución del amonio en los distintos sistemas estudiados. Hay solamente dos enzimas capaces de assimilar el amonio -nitrógeno inorgánico- en aminoácidos -nitrógeno orgánico-. Estas enzimas son la deshidrogenasa glutámica biosintética (GDH) y la glutamino sintetasa (GS). Así, glutamato y glutamina son los productos primarios de la asimilación de nitrógeno inorgánico y ocupan una posición central en el metabolismo intermedio. Estos aminoácidos donan su nitrógeno para la síntesis de todos los otros compuestos nitrogenados que la célula requiere para la síntesis de macromoléculas.

Los estudios iniciales sobre la asimilación de amonio que se realizaron en Klebsiella aerogenes definieron dos vías de asimilación de amonio (fig.1). En la primera vía (fig.1.A) la GDH asimila principalmente el amonio cuando este se encuentra en altas concentraciones en el medio de cultivo y la GS participa en la síntesis de glutamina (1,2). En cambio en cultivos en quimicostato limitados de amonio se demostró que la única enzima que asimila amonio es la GS y la síntesis de glutamato ocurre a partir de glutamina, catalizada por la enzima glutamato sintasa GOGAT (fig 1b)(1,2). Se ha propuesto que la mayor afinidad por amonio de la GS comparada con la GDH presenta una ventaja metabólica en la asimilación de amonio en bajas concentraciones por la GS (1). Después de estos estudios en K.aerogenes la proposición sobre estas dos vías se ha generalizado a otras enterobacterias como Escherichia coli y Salmonella typhimurium (3,4,5). Esta generalización no está basada en estudios fisiológicos rigurosos y así hay un reporte (6) que indica que en E. coli en concentraciones bajas de amonio no se reprime totalmente la GDH lo que podría indicar que la participación de las vías GDH-GS o GS-GOGAT no siempre es excluyente. Para definir mejor este problema faltarían estudios genético-fisiológicos sobre el crecimiento tanto de la cepa silvestre como de cepas mutantes en diferentes enzimas de las vías de asimilación en cultivos continuos con diferentes grados de limitación de amonio como fuente de nitrógeno.

1.2. Vías de asimilación de amonio en Neurospora crassa.

El papel de las diferentes enzimas en la asimilación del nitrógeno inorgánico del medio a glutamato o glutamina ha sido estudiado en el grupo de Jaime Mora tomando como modelo experimental un microorganismo eucariote: el hongo ascomiceto Neurospora crassa.

Los enfoques experimentales tanto estructurales como

genéticos y fisiológicos abordados han establecido que en N. crassa existen cuatro enzimas que participan en la síntesis de glutamato y glutamina. Estas son la GDH biosintética dependiente de NADPH y la GOGAT dependiente de NADH que sintetizan glutamato y dos isozimas de la GS constituidas por monómeros denominados α y β ($GS\alpha$ y $GS\beta$) que sintetizan glutamina.

La GDH se purificó a homogeneidad (7,8) y es un hexámero constituido por subunidades iguales con un peso molecular de 48 000(7,8). Los estudios de Fincham y colaboradores (9,10,11,12,13) han establecido su estructura oligomérica, su secuencia de aminoácidos y han demostrado una aparente correlación entre los sitios de diferentes mutaciones puntuales y la posición de los aminoácidos en el polipéptido.

La participación de la GOGAT en la asimilación de amonio en hongos filamentosos se demostró por primera vez en N. crassa, basándose en la observación de que en una cepa mutante que carece de la actividad de la GDH (tabla 1) crece linealmente como la cepa silvestre en cultivos limitados de amonio (14). La GOGAT de N. crassa dependiente de NADH, se purificó a homogeneidad y está constituida por un solo tipo de monómero con un peso molecular mayor de 200 000 (15).

La GS de N. crassa se purificó a homogeneidad usando la cromatografía de afinidad como el paso determinante en el esquema de purificación (16). Inicialmente se reportó que el monómero de la GS tiene un peso molecular de 47 000, sin embargo, si una preparación de enzima pura de la cepa silvestre se somete a electroforesis en geles de acrilamida con dodecil sulfato de sodio y urea, se observa que está constituida por dos monómeros, denominados α y β que difieren ligeramente en peso molecular (17). Existe una correlación entre el tipo de monómero y la forma oligomérica de la GS; así, los monómeros α ($GS\alpha$) se constituyen principalmente en un tetramero mientras que los monómeros β ($GS\beta$) forman un octámero (18).

En N. crassa se tienen dos enzimas capaces de sintetizar glutamato que son la GDH y la GOGAT y otras dos que sintetizan glutamina: la $GS\alpha$ y la $GS\beta$. De gran interés resulta el conocer la razón de esta duplicación de enzimas;

Una posible explicación es que estas enzimas operen en vías excluyentes de asimilación de amonio según la cantidad de amonio disponible en el medio. En este sentido se han realizado estudios fisiológicos para conocer la participación y regulación de las enzimas cuando N. crassa crece en exceso o en limitación de amonio. Estos estudios llevaron a proponer que cuando N. crassa crece exponencialmente en exceso de amonio éste es fijado por la GDH y la GS octamérica (19)

(fig. 1). Se ha demostrado que en exceso de diferentes fuentes de nitrógeno tales como amonio, glutamato y glutamina la actividad de la GDH y la GS se regulan a nivel de la concentración y de la síntesis de novo de estas enzimas (7,20,21). Usando un sistema de traducción in-vitro se ha establecido que las diferentes velocidades de síntesis de la GS in-vivo corresponden a una diferencia similar en el nivel del RNA mensajero específico que codifica para la enzima (19,22). La actividad de la GS es alta en glutamato intermediario en amonio y baja en glutamina (19) indicando que la actividad de la GDH se alivia en exceso y pasa a glutamato y glutamina (7). En relación a la GOGAT, se observa una actividad baja de esta enzima en amonio en exceso y mucho menor en presencia de glutamato y glutamina (15).

El crecimiento de N. crassa en amonio limitado se logra con un cultivo alimentado a velocidad constante con un volumen pequeño de una solución de cloruro de amonio (23). En esta condición se sintetiza principalmente la GS tetramérica, que corresponde con la síntesis pericéntrica de este monómero a partir de RNA mensajero en un sistema de traducción in vitro (19). En amonio limitado se encuentra la mayor actividad de la GOGAT (15,19) y la GDH disminuye ligeramente. (19). Estos datos llevaron a proponer que la vía que opera en limitación de amonio en N. crassa es la de GS-GOGAT (19).

Los estudios sobre la expresión de las GS, así como de las actividades de la GDH y la GOGAT en cultivos creciendo en amonio en exceso y cambiados a limitación de amonio y viceversa apoyan las proposiciones mencionadas sobre la participación de dos diferentes vías de asimilación de amonio (19).

Otra posible explicación sobre el porqué de la duplicación de enzimas para la síntesis de glutamato y glutamina es que estén distribuidas en distintos compartimentos celulares. En tejidos verdes de plantas superiores se ha visto por ejemplo que hay por lo menos dos GS, una esta localizada en el cloroplasto y otra en el citoplasma (24). Recientemente se ha estudiado en el laboratorio la localización intracelular de la GS, GDH y GOGAT de N. crassa. Las enzimas no se encuentran compartimentalizadas en mitocondrias ni en vesículas y las tres actividades enzimáticas se encuentran en el citosol (25).

Actualmente se está abordando un enfoque experimental (A. Lomnitz y J. Mora, en preparación) basado en estudiar el crecimiento en diferentes concentraciones de amonio de cepas mutantes en una o dos de las enzimas involucradas en las vías de asimilación de este compuesto. El objetivo de este estudio es precisar la función individual y colectiva de dichas enzimas. Estos estudios revelan que, si bien, en exceso de

amonio la asimilación de este ocurre principalmente por la GDH y en limitación de amonio participa perencialmente la GS, la participación de las cuatro enzimas de las vías no es totalmente excluyente. Así, por ejemplo, en N. crassa la GOGAT no se reprime totalmente en exceso de amonio (15,19). Recientemente se estudió el posible papel de esta enzima en condiciones de crecimiento en exceso de amonio. Se ha propuesto que la GOGAT es una enzima sujeta a regulación rápida que permite controlar finamente la relación entre las pozas de glutamato y glutamina, que debe ser muy importante para la célula ya que estos aminoácidos donan su nitrógeno para la síntesis de todos los otros compuestos que se requieren para la síntesis de las macromoléculas (25).

Podemos pensar que debido a que la síntesis de glutamato y glutamina es una encrucijada metabólica fundamental para el flujo de carbono y nitrógeno de la célula seguramente está sujeta a una regulación muy compleja ya que además involucra a más de una enzima que sintetiza cada uno de estos aminoácidos. En este sentido, resultaría una simplificación el proponer la participación excluyente de las dos vías de amonio descritas. Seguramente los diferentes enfoques experimentales que se están abordando en el laboratorio ayudarán a precisar definitivamente el papel de las distintas enzimas en la asimilación de amonio en N. crassa.

I.3. Reasimilación del amonio de la glutamina en Neurospora crassa:

Cuando a un microorganismo se le da un aminoácido como fuente de nitrógeno este tiene que ser degradado hasta amonio para que se pueda sintetizar glutamato y glutamina y poder así distribuir el nitrógeno para la síntesis de diferentes compuestos nitrogenados. Sin embargo, en el caso de que la glutamina sea utilizada como la fuente de nitrógeno la estrategia celular podría ser diferente, ya que este compuesto al donar su nitrógeno por transamidación resulta siempre en la síntesis de glutamato.

Sin embargo, en el laboratorio se vio que en N. crassa la glutamina como fuente de nitrógeno también es degradada hasta amonio para ser después resintetizada. Esta hipótesis partió de los estudios sobre el metabolismo nitrogenado de N. crassa en que se restringe el crecimiento del hongo. Se encontró que existe una acumulación de algunos aminoácidos como arginina y glutamina al disminuir el crecimiento exponencial (26) o en ausencia de crecimiento, como sucede en conidias de cepas auxótrofas deprivadas del aminoácido que requieren (27). La acumulación de estos aminoácidos es paralela a un aumento en la actividad específica de la GS que, por lo menos en un caso

, involucra síntesis de novo de la enzima (27). La paradoja fue el encontrar que mutaciones en las enzimas que asimilan amonio previenen la utilización del nitrógeno de la glutamina del medio para la síntesis de los aminoácidos que se acumulan (27). Así, en presencia de glutamina como fuente de nitrógeno cepes mutantes que carecen de la actividad de las enzimas que asimilan amonio en glutamato excretan amonio al medio de cultivo, lo que indica que la fijación del amonio en glutamato es necesaria para que se dé la transferencia del nitrógeno de la glutamina hacia arginina. De igual manera se observó que se requiere resintetizar la glutamina, pues auxótrofos de glutamina acumulan glutamato y no arginina en el medio de cultivo (27).

Para explicar estos efectos, se propuso que la glutamina que entra a la célula es degradada a nitrógeno inorgánico y esqueletos de carbono, los cuales son reasimilados en glutamato y glutamina que se requieren para la resíntesis de arginina y otros aminoácidos (27). Se propuso que la degradación y la resíntesis de la glutamina dan origen a la operación de un ciclo, aparentemente fútil (27). En el primer paso, una transaminación específica para glutamina resulta en la formación de diferentes aminoácidos y de α -cetoglutarato por una transaminasa de glutamina (T-gln); el segundo paso consiste en la hidrólisis del α -cetoglutarato a α -cetoglutarato y amonio por una ω -amidasa; finalmente el amonio se reasimila por la GDH y la GS dando glutamato y glutamina respectivamente. Hay evidencia de que en animales superiores opera la vía de degradación de la glutamina que se ha designado como la vía de la ω -amidasa (28,29). La presencia de la T-gln ha sido reportada hace mucho tiempo en N. crassa (30). El ciclo propuesto en N. crassa provee un mecanismo para que las células que no están creciendo utilicen y distribuyan el carbono y el nitrógeno del medio hacia la síntesis y la acumulación de aminoácidos como arginina y glutamina (27).

Estudios recientes (J. Calderon, E. Morett y J. Mora, en preparación) han demostrado la participación de la vía de la T-gln - ω -amidasa en la degradación de la glutamina en cultivos de N. crassa durante el crecimiento y en ausencia del mismo. Los enfoques experimentales seguidos incluyen, por un lado, la demostración de que existen las actividades enzimáticas de la T-gln y la ω -amidasa en este hongo así como el acoplamiento de las dos actividades in-vitro. Por otro lado, se ha encontrado evidencia de la operación de esta vía in vivo a través de demostrar la presencia de α -cetoglutarato en el micelio, proveniente de cultivos creciendo tanto en glutamina como en amonio como únicas fuentes de nitrógeno. Igualmente se ha demostrado in-vivo que el glutamato y la glutamina se marcan en presencia de sacarosa-14C y de

como fuente de nitrógeno.

Para definir el papel de las GS, GDH y GOGAT en la reasimilación del amonio que viene de la degradación de la glutamina se está estudiando la fisiología de diferentes mutantes en una o mas de estas enzimas (J. Calderón y J. Mora, en preparación)(ver adelante).

Se puede ver la degradación y síntesis de la glutamina como la manera que tiene la célula de reciclar y mantener fluyendo el carbono y el nitrógeno; y así poder cambiar los perfiles de los diferentes compuestos nitrogenados que se requieran para diferentes estados metabólicos. Quizá esta sea una función fundamental para la célula sin la cual no podría subsistir.

II. Regulación de la Glutamina Sintetasa.

La GS cataliza la incorporación de una molécula de amonio en el grupo amido de la glutamina siendo la única enzima amido sintetasa presente en los sistemas biológicos. Debido a que la síntesis de glutamina ocupa un sitio estratégico en el metabolismo celular la GS ha sido estudiada en gran detalle, sobre todo en lo que se refiere a sus mecanismos de regulación.

II.1. Regulación por los aminoácidos glicina, serina y alanina.

La GS de enterobacterias, algas azul-verdes, hongos, plantas y animales superiores está sujeta a retroinhibición por varios metabolitos que incluyen aminoácidos, nucleótidos y aminosazúcares. La GS mejor estudiada en cuanto a su regulación por retroinhibición es la de E. coli (31,32). Stadtman y colaboradores probaron mas de 50 compuestos y encontraron que la GS de E. coli es inhibida por nueve de estos metabolitos: CTP, AMP, glucosamina 4-p, histidina, triptófano, carbamoil fosfato, alanina, glicina y serina. La inhibición de la GS por estos metabolitos se ha interpretado como la base de un sistema de retroregulación en el cual los productos finales de un camino metabólico muy ramificado inhiben la primera enzima de la vía. En experimentos iniciales sobre la inhibición de la GS de E. coli solamente se había mostrado una inhibición parcial de la actividad enzimática debida a altas concentraciones del inhibidor. Después de que se determinó que las subunidades de la GS de E. coli están sujetas a un mecanismo de adenilación-desadenilación se estableció que la susceptibilidad a retroinhibición depende en gran parte del

estado de adenilación de la enzima y que en condiciones experimentales apropiadas, según el grado de adenilación de las preparaciones, se puede inhibir completamente la actividad biosintética de la GS (32). Se puede generalizar diciendo que la enzima adenilada es mas sensible a la inhibición que la no adenilada y que el grado de inhibición depende importantemente de los cationes divalentes usados en las condiciones de ensayo (31). La enzima no adenilada solo es susceptible a inhibición en presencia de manganeso (32). La actividad biosintética de la GS adenilada es mas susceptible a retroinhibición por histidina, triplofano, CTP y AMP y menos sensible a glicina y alanina que la GS no adenilada. Sin embargo, todavía no se puede concluir definitivamente sobre el significado de la adenilación de la GS de E. coli en el control por retroinhibición (32).

Una característica importante de la GS es la naturaleza acumulativa de la retroinhibición obtenida por mezclas de los inhibidores mencionados. Esto es, que la actividad fraccional obtenida con cualquier combinación de dos o mas inhibidores es aproximadamente igual al producto de la actividad fraccional obtenida con cada inhibidor por separado (32). Calculando la inhibición acumulativa que debería obtenerse si cada inhibidor actúa en sitios separados o en un sitio común de la enzima, se dedujo que hay sitios separados para cada inhibidor (32). Sin embargo, por otros criterios se dedujo que hay un mecanismo excluyente de inhibición entre glicina, serina y alanina (32). Este mecanismo acumulativo de retroinhibición puede tener importancia fisiológica y se propone, que si bien cada inhibidor requiere concentraciones altas (1-100 mM) para producir el 50% de inhibición, si todos los inhibidores o productos finales están presentes la síntesis de la glutamina que es el precursor común estaría completamente inhibida (32).

La GS de Bacillus subtilis es inhibida por distintos metabolitos dependiendo del catión que se use para medir actividad (33). La inhibición por glicina y alanina es mayor en presencia de manganeso que con magnesio. Con amonio y ATP limitantes se observa menor inhibición por glicina y alanina que cuando se usan estos sustratos a saturación, lo que podría indicar que estos aminoácidos tienen efectos acoplados con los sustratos (33).

La GS del alga azul-verde Anabaena cylindrica se inhibe con concentraciones bajas de glicina y alanina (34). Estas concentraciones que oscilan entre 2 y 5 mM, son similares a las pozas intracelulares de aminoácidos que se han reportado para bacterias. Por lo anterior, se sugiere, que estos aminoácidos pudieran estar regulando la actividad enzimática in vivo (34). Esta hipótesis se ve apoyada en función de que las pozas intracelulares de glicina y alanina son

comparativamente mas altas que las pozas de otros aminoácidos (34). No se encontró ningún efecto inhibitorio de diferentes cetoácidos sobre la GS de Anabaena (35). Sin embargo, el ácido glioxílico y el ácido pirúvico si tienen un efecto de proteger a la GS de la inhibición por aminoácidos. El glioxílico es competitivo con respecto a glicina y serina y parece que previene alostéricamente a la GS de la inhibición por alanina (35).

En cuanto a la GS de hongos hay un reporte preliminar sobre el efecto de ciertos metabolitos sobre la GS de N. crassa (36). En este se indica que hay inhibición in-vitro de la GS de N. crassa por glicina, serina y alanina.

Hay varios estudios sobre la inhibición in vitro de la GS de plantas por aminoácidos (37,38). Se reportó que la GS de hoja de chícharo se inhibe por diferentes aminoácidos (37). La inhibición de la GS depende del catión que se use. Así, con magnesio se ve una ligera inhibición por glicina y alanina; en cambio con manganeso esta inhibición es mayor. Con cobalto como catión la inhibición por serina y alanina es menor que con manganeso pero con otros aminoácidos se observa mayor inhibición. Se vió que la alanina, glicina y serina son inhibidores incompetitivos con respecto a glutamato y amonio. Con mezclas de dos o tres inhibidores se ve una inhibición acumulativa. También se ha estudiado la inhibición in vitro de la GS de semilla de frijol (38) en la que se observa una inhibición parcial por glicina y alanina. La inhibición por glicina es mayor si se usan concentraciones bajas de glutamato. La alanina inhibe a la GS en forma no competitiva y la glicina de una inhibición de tipo mixto. También se observo una inhibición acumulativa en presencia de dos aminoácidos inhibidores o de un aminoácido y un nucleótido. Proponen que esta inhibición acumulativa apoya que cada aminoácido tiene un sitio de unión diferente, o sea que no son excluyentes (38).

En mamíferos encontramos estudios sobre la inhibición de la GS tanto de hígado de rata como de cerebro de borrego (39). La glicina, serina y alanina inhiben la actividad de la GS dependiente de manganeso y no la dependiente de magnesio y es mayor la inhibición en la GS de hígado que en la de cerebro. En la GS de hígado la inhibición es mayor si se aumenta la concentración de glutamato y es independiente de la concentración de amonio lo que puede indicar que se requiere del glutamato para que el aminoácido inhibidor se una a la enzima. La glicina y la serina no inhiben acumulativamente a la GS de hígado como ocurre con la GS de E. coli (32). El glioxalato y el piruvato son, por mucho, los compuestos mas activos como sustratos de la T-gln de hígado, por lo que la glutamina puede donar su grupo amino para la síntesis de glicina y alanina en la célula (39), lo que sugiere que éstos

aminoácidos pudieran ser productos finales de la glutamina. Se observó que el α -cetoglutarato tiene un efecto de estimulación de las GS de hígado y de cerebro, el citrato tiene un efecto similar pero en menor grado (32). Otros ácidos orgánicos que se probaron no tienen ningún efecto.

Se concluyó que la retroinhibición acumulativa de la GS por múltiples productos finales de la glutamina es un fenómeno regulatorio general que se ha conservado durante la evolución (31). La GS de distintos organismos difiere significativamente en sus propiedades fisicoquímicas y catalíticas; por lo tanto, la conservación del mecanismo regulatorio de retroinhibición por productos finales como un principio general de control, sugiere que este mecanismo complejo presenta una ventaja selectiva en la regulación de la GS (31). A pesar de que se ha visto que todas las GS son inhibidas por glicina, serina y alanina y que se ha sugerido que este mecanismo regulatorio tan conservado evolutivamente puede ser importante para la regulación de esta enzima en la célula, no se encuentran reportes que indiquen un papel in vivo de esta inhibición.

II.2. Regulación por la fuente de carbono.

La síntesis de glutamato y de glutamina juega un papel clave en el metabolismo de carbono y de nitrógeno. Por un lado constituye los únicos puntos en donde se fija el nitrógeno inorgánico en esqueletos de carbono para dar nitrógeno orgánico. Por otro lado, la biosíntesis de diferentes compuestos que forman parte de las macromoléculas esenciales depende de la concentración de glutamato y glutamina existente pues estos aminoácidos son los donadores universales de nitrógeno en la célula. Por lo tanto, también se ha estudiado la regulación de la GS, principalmente de levaduras y hongos, por la fuente de carbono.

J. Mora y colaboradores estudiaron la regulación de la GS de *N. crassa* cuando este hongo se priva de la fuente de carbono (40). Si el micelio de *N. crassa* creciendo exponencialmente se cambia a un medio donde se priva de la fuente de carbono, se observa una degradación de la GS octamérica que estaba presente, esta degradación es mayor en presencia de glutamina durante la privación. En este último caso también se observó que la degradación de la GS coincidía con la disminución en el RNA mensajero específico de esta enzima (C. Quinto, R. Felacios y J. Mora, comunicación personal). Si el micelio se priva de la fuente de carbono y de nitrógeno hay una degradación de la GS y de la proteína total, acompañada de una excreción de amonio al medio de cultivo. Cuando se vuelve a adicionar la fuente de carbono se

observa un aumento en la concentración y la actividad de la GS y una reincorporación del amonio del medio en proteínas (40). Se propuso que la degradación específica de la GS en ausencia de la fuente de carbono es un mecanismo regulatorio que proviene la síntesis de la glutamina para preservar esqueletos de carbono y energía para el mantenimiento de la célula (40).

Otros estudios en Candida utilis indican resultados similares ya que la GS de esta levadura también se degrada en ausencia de una fuente de carbono (41,42). Así mismo, en C. utilis se reportó la degradación de la GDH biosintética en ausencia de la fuente de carbono (43). Esta enzima también ocupa un punto central en el metabolismo de carbono y de nitrógeno al catalizar la síntesis de glutamato a partir de amonio, y acetoglutarato.

III. Objetivos.

El estudio del metabolismo nitrogenado de N. crassa llevado a cabo en el laboratorio de J. Mora nos ha permitido proponer y conocer las diferentes estrategias celulares posibles para asimilar el amonio cuando está presente como fuente de nitrógeno o cuando es el producto de la degradación de compuestos orgánicos, como son los aminoácidos incluyendo a la glutamina. En base a este conocimiento, y a que la síntesis de glutamato y glutamina así como la distribución del nitrógeno de los mismos hacia otros esqueletos de carbono, constituyen los puntos en donde confluyen los flujos de carbono y de nitrógeno de la célula, el trabajo de investigación que describiré tiene como objetivos responder las siguientes preguntas.

1.- ¿Cuál es el papel fisiológico de la inhibición de la GS de Neurospora crassa por los aminoácidos glicina, serina y alanina ?

La glutamina dona su nitrógeno amido para la síntesis de todos los compuestos que se reportaron como inhibidores de la GS, pero se desconoce si lo hace para sintetizar glicina, serina y alanina (32). Es por esto que resulta de gran interés conocer el significado de la inhibición de la GS por estos aminoácidos. Se ha propuesto que estos aminoácidos se pueden sintetizar por transaminaciones dependientes de glutamina o que se pueden derivar indirectamente de la glutamina a través de su conversión a glutamato por la GOGAT y posterior a transaminación por una transaminasa dependiente de glutamato, por lo que podrían considerarse como productos finales de la glutamina (32,39). Sin embargo sólo ha sido demostrada la actividad de la GOGAT en microorganismos

(1,2,3,4,5,14,15,44,45) y plantas (46,47) y en relación a la transaminasa de glutamina, sólo ha sido reportada presente en animales superiores (28,29) y en N. crassa (30). No se conoce cual es el papel de la inhibición de las GS por glicina, serina o alanina en ninguno de los sistemas experimentales estudiados, por lo que resulta de gran interés conocer el significado fisiológico de esta inhibición sobre la GS de N. crassa.

Los enfoques experimentales que se siguieron para responder esta pregunta consisten en probar el efecto de estos aminoácidos in-vivo, determinando su efecto en el crecimiento del hongo, la actividad específica y la síntesis de la GS en condiciones en que se asimila amonio primariamente. Igualmente se estudió su efecto en el crecimiento que resulta cuando se reasimila el amonio de la glutamina. Esto último se llevó a cabo en mutantes que disminuyen de diferente manera y grados la capacidad para reasimilar el amonio, debido a que presentan bloqueos en una o dos de las enzimas involucradas en las vías de asimilación de amonio.

2.- ¿Existe alguna relación entre la regulación de los flujos del carbono y del nitrógeno en N. crassa ?

Para que ocurra la síntesis de todos los compuestos nitrogenados de la célula se requiere que existan ciertas pozas intracelulares de glutamato y de glutamina, ya que la síntesis de estos aminoácidos constituye el punto donde confluyen el flujo del carbono y del nitrógeno celular. En nuestro laboratorio se ha pensado que puede existir una regulación coordinada entre el flujo de carbono y la síntesis de glutamina. En relación a esto se ha reportado que en N. crassa hay una degradación específica de la GS cuando se le priva de la fuente de carbono (40). Sin embargo no se había estudiado que sucede con el flujo de la fuente de carbono en condiciones en las que se inhibe la síntesis de glutamina, y consecuentemente disminuyen ambos flujos, el de carbono y el de nitrógeno.

Dados los hallazgos de la primera parte de este trabajo, se estudió esta posible relación regulatoria entre los flujos de carbono y de nitrógeno en Neurospora crassa a través de bloquear la síntesis de la glutamina con inhibidores de la GS y determinar como se utiliza la fuente de carbono midiendo la concentración intracelular de algunos metabolitos que se derivan de ella.

MATERIAL Y METODOS.

I. Cepas.

Todas las cepas de Neurospora crassa se obtuvieron del Fungal Genetics Stock Center en Humbolt State University Foundation, Arcata, Calif. U.S.A. o de la colección de J. Mora. El nombre con el que se les designará en este trabajo y las características de las cepas utilizadas se muestra en la tabla 1.

II. Condiciones de Crecimiento.

Los cultivos líquidos de N. crassa se crecieron burbujeando con aire y partiendo de conidias obtenidas de "slants" en medio sólido con la fuente de nitrógeno óptima para cada cepa. Se usó el medio mínimo de Vogel (51) que contiene NH_4NO_3 25 mM como fuente de nitrógeno y se le adicionó sacarosa 1.5 % como fuente de carbono. Como se indica en los experimentos correspondientes, el NH_4NO_3 se sustituyó por otras fuentes de nitrógeno. La temperatura de crecimiento usada fue de 37°C , a menos que se indique lo contrario. El crecimiento se siguió midiendo proteína por el método de Lowry (52):

III. Concentración Intracelular de Metabolitos.

III.1. Aminoácidos.

Las muestras para determinar las pozas intracelulares de aminoácidos se obtuvieron filtrando el micelio y homogenizándolo en etanol al 80 %. Estos homogenados se hirvieron por 10 minutos y se filtraron en filtros de Milipore Corp (tipo RA 1.2, μm). Los filtrados se liofilizaron y las muestras se resuspendieron en buffer pH 2.8. Los aminoácidos se separaron usando un Analizador de Aminoácidos Aminco y se cuantificaron en un fluorómetro Aminco después de acoplarlos a orto-ftalaldehído (14).

III.2. Amonio.

Para determinar la poza intracelular de amonio se usó una variación del método de Tompa, et al (1) y de Tschili, et al (53). Se colectó el micelio filtrando en filtro Millipore Corp. (1.2 μ) y se lavó dos veces con agua. Para extraer el amonio la pastilla de micelio se resuspendió, agitando, en HClO₄ 0.25 M, se centrifugó a 3 000 rpm a 4° C por 5 minutos y se descartó el precipitado. Al sobrenadante se le agregó 1 ml de KH₂PO₄ 1M pH 7.6 y se descartó el KClO₄ formado por centrifugación a 3 000 rpm por 10 minutos. La cantidad de amonio en el sobrenadante se determinó midiendo la velocidad inicial de la reacción de la GDH bovina comercial, agregando los otros sustratos requeridos que son α cetoglutarato y NADH. La concentración final de los sustratos usada fue: α cetoglutarato 20 mM, NADH 0.1 mM en buffer de fosfato de potasio 50 mM pH 7.6. Para 1 ml de muestra se uso 0.5 ml de una solución al 5 % de la GDH bovina (Sigma, aproximadamente 1 400 unidades de enzima por ml) en el mismo buffer. La velocidad inicial de la reacción se midió siguiendo la oxidación del NADH por su cambio en absorbancia a 340 nm. Esta velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de amonio hasta 1 mM. Para expresar la concentración intracelular de amonio como mM se tomó en cuenta la relación entre el aumento de la proteína y el aumento en el volumen de las hifas de N. crassa crecida en una fuente de nitrógeno en exceso (25).

III.3. α Cetoglutarato.

Como el α cetoglutarato es otro sustrato de la GDH, el método usado para determinarlo se basó en medir la velocidad inicial de la reacción de la GDH bovina comercial (ver sección III.2.). El α cetoglutarato se extrajo resuspendiendo el micelio en HClO₄ 0.6 M. Después de descartar el micelio por centrifugación el sobrenadante se llevó a pH 7.6 con suficiente K₂PO₄ 2M y se quitó el KClO₄ formado. Para medir la cantidad de α cetoglutarato en el sobrenadante, a una alícuota de este (0.2 ml a 1 ml) se le agregaron los otros sustratos de la GDH bovina (Sigma) al 15 % en buffer de fosfatos 100 mM pH 7.6 completando el volumen a 1 ml con el mismo buffer. La velocidad inicial de la reacción que se determinó como se describió en la sección III.2 es proporcional a la concentración de α cetoglutarato hasta 0.8 mM. La concentración intracelular de este se exprese en nmoles por mg de proteína.

III. 4. Glucosa.

La glucosa intracelular del micelio se extrajo con HClO_4 como se describió en la sección III.3, neutralizando con K_3PO_4 y se determinó por el método colorimétrico reportado por Werner, et al (54) usando glucosa oxidasa. La solución standard de glucosa así como los reactivos usados se obtuvieron ya preparados comercialmente (Laboratorios Lakeside). La concentración intracelular de glucosa se expresa en μmoles por mg de proteína.

III.5. α Cetoglutarato Sintetizado de novo.

Para determinar el α cetoglutarato que se sintetiza de novo en un determinado tiempo de crecimiento del micelio, se dió un pulso de 15 minutos con $6 \mu\text{Ci} / \text{ml}$ de sacarosa- ^{14}C . Antes de darle el pulso, la muestra de micelio se concentró 20 veces en un volumen final de 1 ml de medio de cultivo con la misma fuente de nitrógeno pero con la sacarosa al 0.15 %, con el objeto de facilitar la incorporación de la sacarosa- ^{14}C a la célula y aumentar el marcaje radiactivo intracelular. La extracción del α cetoglutarato se hizo como se mencionó en la sección III.3 usando 1 ml de HClO_4 . Para cuantificar específicamente el α cetoglutarato marcado radiactivamente con ^{14}C , el cual fue sintetizado in vivo a partir de la sacarosa marcada que se le dió al cultivo, se siguió el siguiente procedimiento. Todo el α cetoglutarato intracelular se convirtió a glutamato incubando el sobrenadante con GDH bovina (Sigma), amonio y NADH. La concentración de sustratos y de enzima utilizados fue el doble de lo que se usó en la sección III.3 y la reacción se corrió hasta que había reaccionado todo el α cetoglutarato y ya no se detectaba un cambio en la densidad óptica. La reacción se paró con etanol al 80 % final y se descartó la proteína precipitada por centrifugación. El sobrenadante de cada muestra se liofilizó para determinar el glutamato- ^{14}C . Este aminoácido se separó usando un Analizador de Aminoácidos Amino. Se recolectaron fracciones cada 30 segundos y se determinó la radiactividad incorporada en cada una de ellas usando un contador de centelleo. El glutamato radiactivo se identificó según el tiempo de elución del glutamato en este analizador. Con estas condiciones de marcaje radiactivo se obtuvo un pico de radiactividad en las primeras fracciones que corresponden a la mayoría de los cetosácidos y otro en la fracción en la que migra el glutamato que viene del α cetoglutarato marcado. No se obtuvo radiactividad en ningún otro aminoácido.

IV. Concentración Extracelular de Amonio.

Se recolectaron muestras de 10 ml del medio de cultivo por filtración a través de filtros de Millipore Corp. ($0.45 \mu\text{m}$). Para determinar el amonio presente se agregaron 0.1 ml de NaOH 10 M y se midió el amonio en un electrodo Orion (Cambridge, Mass. USA) con una membrana específica para este compuesto. No hay interferencia de otros aminoácidos presentes en el medio durante los primeros diez minutos después de agregar la NaOH. Este electrodo es confiable a concentraciones de amonio mayores a 0.02 mM.

V. Incorporación de la Glutamina.

La incorporación de la glutamina al micelio se determinó midiendo la desaparición de la glutamina- ^{14}C del medio de cultivo. La glutamina- ^{14}C utilizada fue purificada previamente pasándola por una columna de Dowex-1 equilibrada con agua. Al medio de cultivo se le adicionaron 10 000 cpm/ml de la glutamina- ^{14}C purificada. A distintos tiempos de crecimiento se tomaron muestras de 1 ml quitando el micelio por centrifugación. Para determinar la glutamina presente, cada muestra se pasó por una columna de Dowex-50 equilibrada con agua. Se lavó con agua y se eluyó la glutamina con citrato de sodio 0.3 N. Se recolectaron fracciones de 2 ml y se determinó la radiactividad incorporada en cada una de ellas en un contador de centelleo. La concentración de la glutamina en el medio de cultivo es proporcional a las cpm obtenidas. La concentración de glutamina incorporada se toma como la diferencia entre la concentración inicial de glutamina (5 mM) y la concentración extracelular obtenida en cada tiempo de crecimiento.

VI. Determinación de Actividades Enzimáticas.

Para determinar las actividades enzimáticas que se describen a continuación, se prepararon polvos de acetona del micelio filtrado, lavando con agua, acetona y secado al vacío. Los siguientes pasos se realizaron a 4°C . Los polvos de acetona se trituraron con hielo seco, se resuspendieron en los buffers de extracción correspondientes usando una dilución de 100 mg de peso seco por ml de buffer y se centrifugaron a 12 000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se usó para medir las actividades enzimáticas.

VII. La Glutamina Sintetasa

El primer paso en la síntesis de glutamina es la

... 5 mM, EDTA 0.5 mM y sulfato de potasio 50 mM, pH 7.2. La actividad de sintetasa y de transferasa de la GS se determinó según el método de Ferguson y Sims (41). La actividad específica de la GS se expresa como unidades por miligramo de proteína. Una unidad es la cantidad de enzima que transforma 1 μ mol de sustrato por minuto.

VI. 2. Transaminasa de Glutamina.

Se usó un buffer de extracción de pirofosfato de sodio 50 mM, pH 8.5. Se midió colorimétricamente el α -cetoglutarato sintetizado, por una modificación del método descrito por Cooper et al (55,56) (J. Calderón y J. Mora en preparación). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 0.5 ml, fosfato de piridoxal 0.2 mM, buffer de borato de sodio 150 mM pH 7.5, glutamina 20 mM y el cetosácido mencionado en cada reacción a una concentración de 120 mM. La transaminasa de glutamina se midió en presencia de δ -dialo-5-oxo-L-norleucina (DON) 0.3 mM que es un inhibidor de la actividad de la ω -amidasa que permite la acumulación óptima del α -cetoglutarato. (J. Calderón y J. Mora, en preparación). La reacción se incubó a 37° C y se paró con ácido 5-sulfosalicílico al 20 %. Se separó la proteína precipitada por centrifugación a 3 000 rpm por 10 minutos. Al sobrenadante se le agregaron 0.25 ml de una solución de HCl 3 N y vainillina al 4.5 % en etanol al 50 % y se incubó por 30 minutos a 92° C. A continuación se le agregaron 0.25 ml de NaOH 5 N y se leyó la absorbancia a 500 nm. La absorbancia es directamente proporcional a la concentración de α -cetoglutarato.

VI. 3. Transaminasa de Glutamato.

El buffer de extracción y la mezcla de reacción utilizados fueron los mismos que en la anterior, excepto que se usó glutamato 20 mM como sustrato en vez de glutamina y no se usó DON. La reacción se paró con ácido tricloroacético al 17 %, se descartó la proteína precipitada por centrifugación y el sobrenadante se neutralizó con NaOH. Se determinó el α -cetoglutarato sintetizado según la velocidad de la reacción de la GDH bovina como se indicó en la sección III.3.

VII. Purificación de la Glutamina Sintetasa.

La preparación de la GS α pura se obtuvo a partir de la cepa 1b-RB, que contiene solamente el polipéptido α de la GS

(50), crecida en glutamato 5 mM a 37°C por 36 horas. Se siguió el esquema de purificación reportado anteriormente (18). La GS₂ pura se disolvió en el mismo buffer de extracción reportado para la GS β (16) (sección VI.1). A partir de la cepa silvestre crecida en glutamato a 25°C por 12 horas, siguiendo el esquema de purificación reportado (16) se obtuvo una preparación enriquecida en la GS β .

Para observar el grado de pureza de las preparaciones obtenidas, estas se sometieron a electroforesis como se describe en la sección IX (fig 2).

VIII. Inmunoprecipitación de la GS Marcada Radiactivamente in vivo.

A los cultivos con glutamina como fuente de nitrógeno se les dio un pulso de 1 hora con una mezcla tritiada de aminoácidos. Se usaron 10 μ Ci / ml en glutamina como única fuente de nitrógeno y 20 μ Ci / ml en presencia de glutamina y otros aminoácidos. Para aumentar el marcaje radiactivo, estos cultivos se concentraron en un medio con una concentración de aminoácidos 5 veces menor a la original durante el tiempo que duro el pulso. A los cultivos con amonio como fuente de nitrógeno se les dió un pulso de 1 hora con 10 μ Ci / ml de leucina-3H. Se prepararon extractos libres de células usando el buffer A (imidazol 50 mM, glutamato 50 mM, EDTA 0.5 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, bisulfito de sodio 25 mM, pH 7.2) con 1 mg / ml de albumina serica bovina. El extracto se centrifugó a 18 000 rpm por 1 hora y este sobrenadante se usó para medir incorporación de isotopos. Se tomaron muestras para determinar la incorporación de aminoácidos radiactivos en las proteínas totales precipitandolas con ácido tricloroacético. La GS se aisló por inmunoprecipitación indirecta como se reportó anteriormente (19), incubando el extracto con anticuerpos de conejo anti-GS purificados y con anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo. Para comparar la concentración de la GS sintetizada de novo en diferentes condiciones de cultivo, se ajustó para tener las mismas cpm incorporadas en las proteínas totales en cada muestra que se inmunoprecipitó. Los inmunoprecipitados se sometieron a electroforesis y fluorografía.

IX. Electroforesis y Fluorografía.

Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida en placa en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) y urea 7 M (17). Los geles se tificaron con azul de Coomassie. Los geles de inmunoprecipitados de la GS marcada radiactivamente in vivo (sección VIII) se sometieron a fluorografía (57). En algunos casos los fluorogramas se

analizaron densitométricamente a 600 nm de absorbancia.

RESULTADOS Y DISCUSION

I. Regulación de la síntesis de la glutamina por los aminoácidos glicina, serina y alanina en Neurospora crassa.

1. Inhibición de la actividad de la GS por glicina, serina y alanina.

Un primer nivel de regulación de la GS por diferentes metabolitos es la inhibición alostérica de estos sobre la actividad enzimática in-vitro. Para estudiar la inhibición de las GS (α y β) de N. crassa por los aminoácidos glicina, serina y alanina que, como ya mencioné, se han reportado como inhibidores de todas las GS estudiadas se determinó esta inhibición in-vitro tanto a partir de extractos crudos como de preparaciones de GS pura de N. crassa.

En los extractos celulares tanto de la cepa silvestre enriquecido en la GS β como de la cepa 1b-R8 que contiene solamente la GS α , se observó que la glicina, serina y alanina dan de un 15% a un 40% de inhibición de la actividad de la GS usando concentraciones hasta de 200 mM de cada uno de estos aminoácidos. Se procedió a purificar las dos isozimas de la GS de N. crassa para estudiar la inhibición in-vitro de las isozimas puras y ver si se obtenía un mayor grado de inhibición que el que se obtuvo partiendo de extractos celulares.

La GS α se purificó de la cepa 1bR-8 (GS β), mutante que se obtuvo a partir del auxótrofo parcial de glutamina, la gln-1b, por su capacidad de crecer en amonio como fuente de nitrógeno (tabla 1) (50). La cepa auxótrofa de glutamina, gln-1b, presenta cierta actividad de la GS (49) por conservar la GS α ya que tiene una alteración en el punto isoelectrico del monómero β de la GS (50) La mutante protótrofa 1b-R8 solamente tiene la GS α activa y perdió el monómero β alterado que tenía la cepa de la cual se obtuvo (50). Para purificar la GS α esta cepa se creció durante 36 horas en un cultivo con glutamato como fuente de nitrógeno. El esquema de purificación que se siguió fue similar al reportado para purificar la GS α de otras mutantes auxótrofos parciales de glutamina como la gln-1c (18). Después del último paso de purificación la preparación se dializó contra el buffer de extracción utilizado para la GS (ver Material y Metodos) con el objeto de quitar el glutamato presente en el buffer utilizado durante la purificación. En la

figura 2.A se muestra la electroforesis en gel de acrilamida-SDS-urea de la preparación de la GS α pura obtenida, en el cual se observa una banda perencial que corresponde con el peso molecular de la GS α .

La preparación de GS β que se usó se obtuvo a partir de la cepa silvestre crecida durante 12 horas a 25°C en cultivos con glutamato como fuente de nitrógeno. El esquema de purificación que se siguió fue el reportado inicialmente para la purificación de la GS de la cepa silvestre de N. crassa (16). Como se observa en la figura 2.A, se obtuvo una preparación de GS pura enriquecida perencialmente en la GS β .

La figura 2 muestra la inhibición de la actividad de la GS α y β por los aminoácidos glicina, serina y alanina. Se midió la actividad de síntesis de la GS en presencia de distintas concentraciones de estos aminoácidos. Se observa que las dos GS son inhibidas por los tres aminoácidos, presentando una inhibición mayor con glicina (fig. 2.B) que con serina (fig. 2.C) o alanina (fig. 2.D). Este resultado está de acuerdo con un reporte anterior sobre la inhibición de la GS de N. crassa por distintos metabolitos (36). En el experimento de la figura 2 se usaron concentraciones elevadas de los aminoácidos inhibidores para poder detectar una inhibición máxima de 60 %, aunque para otras GS estudiadas como la de E. coli (. 32) se utilizan concentraciones similares, hasta de 100 mM para obtener una inhibición parcial de la actividad. Sin embargo resultados recientes (J. Guzman y J. Mora, en preparación) usando un método directo para medir la actividad de síntesis de la GS ya que se cuantifica la glutamina radiactiva sintetizada a partir de glutamato radiactivo y amonio, que son los sustratos naturales de la GS, y usando una concentración menor de glutamato muestran una inhibición de la actividad in-vitro de las GS de N. crassa con concentraciones menores de cada uno de los aminoácidos. Se ha reportado que la inhibición de la GS por glicina, serina o alanina puede depender tanto de la concentración de glutamato (33,37,38) como del catión (31,33,37) que se usen en la reacción. Se realizaron experimentos variando la concentración de glutamato y el catión para precisar mejor el grado de inhibición de las GS de N. crassa por la glicina, serina y alanina.

Se observa que, igual que todas las otras GS estudiadas, la actividad de las isozimas de la GS de N. crassa es inhibida in-vitro en cierto grado por glicina, serina y alanina.

2. Síntesis in-vitro de la glicina y alanina por transaminación.

El posible significado fisiológico de la inhibición de la GS por glicina, serina y alanina no es tan claro, ya que se desconoce si estos aminoácidos son un producto de la transaminación de la glutamina. Esto a diferencia de otros metabolitos que son inhibidores de la GS como histidina, triptófano, carbamoil fosfato, etc. que, como son productos finales de la glutamina se ha propuesto que el efecto de la inhibición de la actividad de la GS obedece a una retroregulación por productos finales en la primera enzima de la vía de biosíntesis (GS).

En algunos sistemas experimentales se ha estudiado la capacidad de sintetizar glicina, serina y alanina a partir de la glutamina por transaminación. Esto podría ocurrir por ejemplo en hígado de rata ya que la T-gln presente tiene gran afinidad por los cetoácidos de glicina y alanina que son glioxílico y pirúvico (39). En este caso la hipótesis que se propuso es que glicina y alanina pueden considerarse como productos finales de la glutamina y su efecto regulatorio sobre la actividad de la GS podría corresponder a una retroinhibición por productos finales de la vía como ocurre con los otros inhibidores de esta enzima (39). En microorganismos como E. coli se ha especulado que estos aminoácidos pueden venir de la transaminación de la glutamina (31) o venir de una transaminasa de glutamato y que este aminoácido a su vez viene de la glutamina por la GDHAT (32). Por lo tanto, también se ha propuesto que en este caso la glicina, serina y alanina pueden considerarse como un producto final de la glutamina (31,32). Sin embargo, en casi todos los sistemas estudiados falta evidencia experimental para comprobar la proposición de que estos aminoácidos sean productos finales de la glutamina, y podría ser que la inhibición de la GS por los mismos no obedezca a una regulación de retroinhibición sino que puedan ser representantes de una señal regulatoria diferente que queda por investigarse.

Para saber si en N. crassa estos aminoácidos se pueden sintetizar a partir de glutamato o de glutamina por transaminación, se decidió buscar la actividad de una transaminasa de glutamina o de glutamato in-vitro usando como sustratos los cetoácidos glioxalato y piruvato. La tabla 2 muestra que hay actividad in-vitro tanto con glutamato como con glutamina como aminoácidos donadores en presencia de glioxalato o pirúvico como cetoácidos que al incorporar el grupo amino de la glutamina o el glutamato sintetizan glicina y alanina respectivamente. La actividad de transaminasa de glutamato es mayor que la de glutamina, lo que indica que hay una mayor síntesis in-vitro de alanina y glicina a partir de glutamato. Aunque no se probó la síntesis de serina por transaminasas de glutamato o de glutamina, este aminoácido se puede sintetizar a partir de glicina.

Se concluye que en N. crassa tanto el glutamato como la glutamina pueden donar su nitrógeno amino para la síntesis de glicina, serina y alanina; siendo mucho mayor la síntesis in-vitro a partir de glutamato y muy reducida a partir de glutamina. Aunque, no se puede concluir si in-vivo también ocurre una síntesis perencial a partir de glutamato, es probable que así sea.

Los diferentes enfoques experimentales que se presentarán a continuación tratarán de proponer un significado fisiológico de la inhibición in-vitro de la GS de N. crassa por glicina, serina y alanina.

3. Inhibición in-vivo de la GS por glicina, serina y alanina.

3.1. Efecto sobre la asimilación primaria de amonio.

Una primera línea experimental que se siguió para conocer el papel de la glicina, serina y alanina en la síntesis de la glutamina fue comparar el crecimiento de la cepa silvestre de N. crassa en presencia de uno de los sustratos de la GS como fuente de nitrógeno en presencia y en ausencia de cada uno de los aminoácidos mencionados.

3.1.a. En el crecimiento y regulación de la GS de la cepa silvestre.

La figura 3.A presenta el crecimiento de la cepa silvestre en glutamato y en glutamato mas glicina, serina y alanina como fuente de nitrógeno. El tiempo de duplicación de esta cepa en glutamato es de 2.5 horas, si además de glutamato está presente glicina o serina el tiempo de duplicación aumenta a 4 y 5 horas respectivamente, mientras que en presencia de alanina la cepa crece casi igual que con glutamato. Este resultado podría indicar un cierto efecto de la glicina y la serina en la síntesis de la glutamina. Cuando la glicina, la serina o la alanina están presentes se observan pozos intracelulares muy elevadas de cada uno de estos aminoácidos indicando que están entrando eficientemente a la célula (datos no presentados). En apoyo de lo anterior se observa que la velocidad de crecimiento con cada uno de estos aminoácidos como fuente de nitrógeno (fig. 3.B) se relaciona con el efecto que estos aminoácidos tienen en la velocidad de

(fig. 4.B). Quizá estos resultados se pueden explicar porque la GS_{α} tiene una velocidad máxima mucho menor que la GS_{β} (J. Guzmán y J. Mora, en preparación) y la disminución en la síntesis de la GS_{α} puede contribuir poco a la actividad enzimática que se mide. Por lo que una disminución en la síntesis de la GS_{α} puede no ser detectada como una disminución de la actividad de sintetasa de la GS.

Es posible que la presencia de una mayor relación β/α resulte en una mayor actividad enzimática de la GS que sería inhibida in vivo en menor grado por glicina. Esto se vería apoyado por que una preparación de GS_{β} pura tiene una mayor actividad específica y mayor relación S/T que una preparación de GS_{α} (J. Guzmán y J. Mora, en preparación). Así mismo se ha observado que en diferentes preparaciones de GS puras, que contienen una diferente proporción de la GS_{β} con respecto a la GS_{α} , la relación S/T de la actividad de la GS es mayor entre menor sea la cantidad de GS_{α} presentes, lo que podría correlacionar con una menor capacidad para sintetizar glutamina. Experimentos en curso tratarán de comprobar esta proposición.

La glicina, serina y alanina disminuyen la velocidad de crecimiento de la cepa silvestre en presencia de alguno de los sustratos de la GS como fuente de nitrógeno. Además, la glicina tiene un efecto en disminuir la síntesis de la isozima α de la GS de N. crassa. Este efecto producido por la glicina puede ser representativo del efecto producido por los otros dos aminoácidos. En los experimentos que se presentaran más adelante se probó el efecto de la glicina, serina y alanina en la actividad y en la síntesis de la GS y los tres tienen un efecto similar.

3.1.b. En el crecimiento de cepas mutantes en las enzimas de asimilación de amonio.

Con el objeto de aumentar el posible efecto de la glicina, serina y alanina en el crecimiento celular en presencia de alguno de los sustratos de la GS, se estudió el efecto en una mutante que tiene disminuida la capacidad de asimilar el amonio en glutamina.

Como antecedente, se sabía de un efecto de la glicina sobre el crecimiento de una mutante deficiente en su capacidad de asimilar el amonio y que carece de la GDH (48). Se reportó que la cepa GDH^{\ominus} de N. crassa presenta un crecimiento residual en amonio como fuente de nitrógeno el cual es inhibido si se agrega glicina o serina en altas concentraciones en el medio

de cultivo. Este efecto no se observó con otros aminoácidos que se probaron (48). Este resultado puede ser un ejemplo de un efecto de la glicina y de la serina in-vivo, sin embargo se desconoce la razón de este efecto. Cuando se demostró en N. crassa la presencia de la GOGAT (14) se postuló que la mutante GDH^o puede crecer en amonio limitado igual que una cepa silvestre, gracias a la participación de la GOGAT junto con la GS en la asimilación del amonio limitado (14). Además, se reportó que la cepa GDH^o presenta una mayor actividad de la GOGAT en amonio en exceso que la cepa silvestre (15). La elevada actividad de GOGAT y por lo tanto la posibilidad de asimilar el amonio por la vía GS-GOGAT le daría a esta cepa cierta capacidad de crecer en amonio en exceso. La baja capacidad de crecimiento de esta cepa en amonio en exceso indicaría que la vía GS-GOGAT solo le da a la célula una baja capacidad para asimilar el amonio (15, 25). Para tratar de explicar el efecto de la glicina y la serina en la inhibición del crecimiento residual de la cepa GDH^o en amonio se determinó si la actividad de la GOGAT de N. crassa es inhibida por glicina. No se observó ninguna inhibición de la actividad de la GOGAT pura de N. crassa por glicina (G. Hummelt y J. Mora, datos no publicados). Por lo tanto se podría deducir que el efecto de la glicina en inhibir el crecimiento de la cepa GDH^o en amonio podría estar dado por la inhibición de la GS por este aminoácido que traería como resultado una inhibición en la asimilación del amonio y en el crecimiento de la célula.

Se midió el efecto de la glicina, serina y alanina en el crecimiento de una mutante auxótrofa parcial de la glutamina (GS^o) (tabla 1) en presencia de glutamato como fuente de nitrógeno. Esta mutante GS^o conserva la GS α activa y tiene una alteración en el peso molecular de la GS β , presentando un polipéptido de 30 000 daltones de peso molecular (17). Esta mutante conserva la capacidad, menor que la de la cepa silvestre, para crecer en glutamato como fuente de nitrógeno si el hongo se crece a 37°C, lo que debe estar dado por la actividad residual de la GS que presenta (17). La figura 5.A muestra el crecimiento de la cepa GS^o en glutamato y en glutamato mas glicina, serina y alanina. Se observa que mientras que el tiempo de duplicación en glutamato es de 4.5 horas, en glutamato mas alanina disminuye a 6 horas. Sin embargo, si además de glutamato se agrega glicina o serina la cepa GS^o no crece durante las primeras 12 horas. El efecto que se observa con glicina y serina es claramente diferente al que se observa con alanina. Esta cepa GS^o también es incapaz de crecer en glicina o serina como únicas fuente de nitrógeno, este efecto es exclusivo de estos dos aminoácidos ya que esta cepa puede crecer en otros aminoácidos ya sea usados como fuente de nitrógeno o junto con glutamato (datos no presentados). Este efecto drástico de abolir el crecimiento de la cepa GS^o con glicina y serina se observó usando una concentración elevada de estos aminoácidos (50 mM) como se

muestra en la figura 5.A ; si se usa una menor concentración de los aminoácidos de 10 mM o 20 mM se obtiene un menor efecto en el crecimiento (datos no presentados). Por lo tanto, en lo sucesivo se usará la concentración de 50 mM de los aminoácidos inhibidores.

Para descartar que el efecto de la glicina y serina en el crecimiento de la GS estuviera dado por una inhibición en la entrada de glutamato a la célula en presencia de estos aminoácidos, se midieron las pozas intracelulares de glutamato en estas cuatro condiciones de crecimiento de la cepa GS[Ⓢ] a las 12 horas de crecimiento. Como se observa en la tabla 3, las pozas de glutamato son similares tanto en glutamato como en glutamato mas alguno de los tres aminoácidos lo que indica que el efecto observado en el crecimiento con glicina y serina no se explica por una inhibición en la entrada del glutamato por la competencia entre estos aminoácidos. Las pozas intracelulares de glicina, serina y alanina son muy elevadas cuando cada uno de estos aminoácidos estan presentes como fuente de nitrógeno (datos no presentados).

Se propone que la inhibición del crecimiento de la cepa GS[Ⓢ] se debe a un efecto in vivo de la inhibición de la GS por los aminoácidos glicina y serina.

Esta proposición se ve apoyada por los resultados que se muestran en la figura 5.B. La glutamina, producto de la GS, revierte el efecto de la glicina y la serina en la cepa GS[Ⓢ]. En presencia de glutamina como fuente de nitrógeno la cepa GS[Ⓢ] tiene un crecimiento óptimo, si además de la glutamina se agrega glicina o serina esta cepa sí crece, a diferencia de lo que ocurre en presencia de glutamato, sustrato de la GS, mas uno de estos aminoácidos. Se puede concluir que la glicina y la serina tienen un efecto drástico in vivo ya que anulan el crecimiento en glutamato de la cepa GS[Ⓢ], que tiene reducida la capacidad de sintetizar glutamina por efecto de la mutación y la elevada concentración intracelular de estos aminoácidos inhibidores de la GS podría inhibir totalmente la actividad de la enzima anulando así la posibilidad de sintetizar glutamina a partir de glutamato.

La evidencia presentada demuestra que la inhibición del crecimiento por glicina, serina y alanina depende de la actividad y de la concentración de sustratos de la GS[Ⓢ].

3.2. Efecto sobre la reasimilación del amonio.

El trabajo desarrollado por J. Calderón y J. Mora ha demostrado que cuando se usa glutamina como fuente de nitrógeno en N. crassa esta es degradada principalmente hasta amonio y resintetizada nuevamente. En este ciclo de la glutamina (fig. 6) intervienen dos enzimas que degradan la glutamina hasta amonio, estas son, la T-glú que transfiere el grupo amino de la glutamina a diferentes α -cetoácidos lo que resulta en la síntesis de los aminoácidos correspondiente y el α -cetoácido de la glutamina que es el α -cetoglutarato; la α -glú que se encarga de hidrolizar el α -cetoglutarato en α -cetoglutarato y amonio. La presencia de estas dos actividades enzimáticas en N. crassa y su funcionamiento *in-vivo* ha sido demostrado (J. Calderón, E. Morett y J. Mora, en preparación). Este ciclo provee la degradación irreversible de la glutamina hasta amonio ya que el α -cetoglutarato es un compuesto que se cicliza rápidamente lo que hace imposible la reacción reversible de la T-glú y sólo el producto que no se cicliza es hidrolizado por una α -amidasa muy activa hasta α -cetoglutarato y amonio. Otra enzima que ya he mencionado que tiene como sustrato a la glutamina y la degrada a glutamato es la GOGAT (fig. 6). La participación de esta enzima en la degradación de la glutamina cuando este aminoácido es la fuente de nitrógeno está siendo estudiada actualmente (J. Calderón y J. Mora, en preparación). Anteriormente se había propuesto que el amonio que viene de la glutamina puede ser reasimilado tanto en glutamato por la GDH como en glutamina por la GS (27). Recientemente se ha demostrado la síntesis de glutamina- ^{14}C a partir de la sacarosa- ^{14}C en presencia de glutamina (J. Calderón y J. Mora, en preparación).

Por otro lado, se había observado que si se crece a N. crassa a $37^{\circ}C$ en presencia de glutamina, producto de la GS, como fuente de nitrógeno hay cierta actividad de la enzima que es mayor a la actividad que se observa en presencia de glutamina a $25^{\circ}C$ y que se debe a que a $25^{\circ}C$ se reprime más la síntesis de la GS y por lo tanto de la glutamina (19,21,22). La existencia de una actividad elevada de la GS en presencia de glutamina a $37^{\circ}C$ podría relacionarse con que se requiere mayor resíntesis de glutamina en esta condición de crecimiento. Si el amonio de la glutamina se reasimila en glutamato o glutamina la célula puede sintetizar, a partir de estos aminoácidos, todos los otros compuestos nitrogenados que requiere para la síntesis de macromoléculas, ya sea por transaminaciones dependientes de glutamato o glutamina para obtener diferentes aminoácidos (fig. 6) y por transamidación de la glutamina a otros esqueletos de carbono para la síntesis de otros aminoácidos, bases nitrogenadas, aminoazúcares y vitaminas.

En base lo anterior, se decidió revisar los resultados

que se muestran en la figura 5. Surgió la pregunta de que por que no se revierte totalmente el crecimiento de la cepa GS en glicina, serina o alanina en presencia de glutamina como fuente de nitrógeno. Esto es, que si bien esta cepa crece en presencia de glutamina mas estos aminoácidos a diferencia de lo que ocurre con glutamato (fig. 5.A), este crecimiento es menor al que se observa cuando glutamina es la única fuente de nitrógeno (fig. 5.B). Se planteó la hipótesis de que la menor velocidad de crecimiento de la cepa GS^o que se observa a 37 C en glutamina mas cada uno de los aminoácidos inhibidores de la GS (fig. 5.B) podría estar correlacionado con que aún en presencia de glutamina se requiere una resíntesis de este aminoácido que se degrada hasta amonio para lo cual se requiere de la actividad de la GS que se encontraría inhibida por la presencia de estos aminoácidos glicina, serina y alanina.

3.2.a. En el crecimiento y regulación de la GS.

Como primer enfoque se estudio cual es el efecto de estos aminoácidos en el crecimiento y la regulación de la GS de N. crassa en presencia de glutamina a 37°C. Como ya mencione, se había propuesto que se requiere una mayor resíntesis de glutamina en esta condición de crecimiento que cuando la temperatura es de 25°C. Los estudios sobre la regulación de la GS en presencia de glutamina como fuente de nitrógeno estan orientados a conocer cuál es la función de esta enzima en dicha condición de crecimiento.

-De la cepa silvestre.

La figura 7 muestra el efecto de la glicina, serina y alanina en el crecimiento, la actividad específica y la síntesis de la GS de la cepa silvestre de N. crassa en glutamina vs. glutamina mas estos aminoácidos como fuente de nitrógeno. Además de la glicina, serina y alanina se agregó como control otro aminoácido que es la leucina. La razón que nos llevo a usar leucina como control es que tanto la glutamina como la glicina, serina y alanina entran a la célula por la misma permeasa y en presencia de una elevada concentración de estos aminoácidos la entrada de glutamina disminuye comparandola con la condición en la que glutamina es la única fuente de nitrógeno. Por lo tanto, para descartar que el posible efecto sea únicamente por disminuir la entrada de la glutamina, se uso leucina que compete igualmente por la entrada pero no es inhibidor de la GS. Los aminoácidos glicina, serina, alanina y leucina alteran muy ligeramente la velocidad de crecimiento de la cepa silvestre comparandola con la

velocidad de crecimiento que se obtiene en glutamina como única fuente de nitrógeno. La diferencia entre el tiempo de duplicación que se observa en presencia de alguno de los aminoácidos y el que se observa en glutamina es cuando mucho de 1 hora en presencia de serina (fig 7.A).

La figura 7.B. muestra la actividad específica de sintetasa de la GS a las 10 horas de crecimiento del hongo, determinada en extractos celulares previamente dializados. Se observa que en glutamina mas glicina, serina o alanina la actividad es 5 veces mayor que cuando glutamina es la fuente de nitrógeno. Mientras que en glutamina mas leucina la diferencia es de 3 veces comparandola con glutamina. El menor aumento de la actividad en leucina puede deberse a que ya que este aminoácido no es inhibidor de la actividad la poza de glutamina disminuye solo como resultado de una menor entrada de este aminoácido por leucina. Sin embargo, la actividad que se observa en presencia de glicina, serina o alanina es mayor y puede deberse a una regulación específica de estos aminoácidos que discutiré mas adelante.

La figura 7.C muestra la electroforesis en geles de acrilamida -SDS- urea de los inmunoprecipitados de la GS de cada una de estas condiciones de crecimiento. Se observa que mientras que en glutamina y en glutamina mas leucina hay una concentración similar de los monómeros α y β de la GS, en glutamina mas glicina serina o alanina la relación entre la GS α y la GS β es diferente, siendo mayor la concentración de la GS β .

Para determinar la velocidad relativa de síntesis de la GS en cada una de estas condiciones de crecimiento los cultivos recibieron un pulso de una hora con una mezcla de aminoácidos tritiados. Para aislar la GS sintetizada de novo se usó la inmunoprecipitación indirecta sometiendo a los inmunoprecipitados a electroforesis y fluorografía. Se determinaron las cpm incorporadas en la proteína total de cada extracto y se ajustó a tener las mismas cpm incorporadas en proteínas total en cada condición antes de hacer el inmunoprecipitado, esto nos permite conocer la cantidad relativa de enzima sintetizada en cada condición. En la figura 7.D. se muestran estos resultados, o sea la fluorografía de los geles tenidos por proteína de la figura 7.C. Se observa que la mayor actividad de la GS obtenida (fig. 7.A.) corresponde con una mayor síntesis de la enzima en estas condiciones. Así mismo, la diferencia que se observa en cuanto a la relación entre los monómeros α y β de la GS (fig. 7.B) corresponde con una diferencia en la síntesis de novo de los monómeros en glutamina mas glicina, serina o alanina como fuente de nitrógeno. En glutamina como fuente de nitrógeno se sintetiza casi la misma concentración de la GS α que de la GS β dando una relación de β/α de 1; sin embargo en glutamina mas

glicina, serina o alanina aumenta la síntesis de la GS, dando una relación β/α de 3, 2 y 2.6 respectivamente. En glutamina mas leucina, que se usó como control, la relación β/α es igual a la observada en glutamina.

El efecto de aumentar la síntesis de la GS β y cambiar la relación β/α parece ser específico de los aminoácidos glicina, serina y alanina ya que no se observa en presencia de leucina ni de otros aminoácidos como aspártico, prolina, histidina ni de otros productos finales de la glutamina como glucosa-6 P, y guanosina que se probaron (datos no presentados).

El efecto de la glicina, serina y alanina en el aumento de la síntesis de la GS de *N. crassa* es un tipo de regulación por estos aminoácido que no ha sido reportado para otra GS.

Se puede observar un doble nivel de regulación en sentido opuesto de la glicina, serina y alanina en la actividad y en la síntesis de la glutamina en *N. crassa*. Con esto mediero a que por un lado, hay un efecto inhibidor que disminuye la actividad de la GS *in-vivo* (figs. 3,4 y 5). Por otro lado, se observa un aumento en la actividad de la GS que corresponde con un aumento del polipéptido β de la GS.

-De una mutante regulatoria de la GS.

Se probó también el efecto de la glicina en presencia de glutamina en el crecimiento, y la regulación de la actividad y la síntesis de la GS de una mutante regulatoria, la cepa GS, que conserva solo el polipéptido α de la GS (tabla 1). la figura 8.A muestra el crecimiento de esta cepa en glutamina que es óptimo y hay un tiempo de duplicación de 2 horas, mientras que en glutamina mas glicina el tiempo de duplicación es de 3.5 horas. La actividad de sintetasa de la GS de este cepa es muy baja ya que solamente presenta el polipéptido α que tiene una velocidad máxima pequeña (J. Guzman y J. Mora, en preparación). La actividad de la GS medida tanto por sintetasa como por transferencia de la cepa GS^o es cuatro veces mayor cuando esté presente la glicina además de la glutamina como fuente de nitrógeno (fig.8.B). la mayor actividad específica coincide con una mayor síntesis de novo de la GS (fig 8.C).

Se observa el mismo efecto regulatorio producido por la glicina que el que se observó en la cepa silvestre ya que disminuye la velocidad de crecimiento y aumenta la actividad y la síntesis de la GS. En esta mutante aumenta la síntesis de la única isozima de la GS que tiene la cepa.

¿Cuál es el significado metabólico de este doble nivel de regulación en sentido opuesto de la glicina, serina y alanina en la síntesis de la glutamina?

Una hipótesis que trata de responder esta pregunta es la siguiente. La vía de degradación de la glutamina hasta amonio y la reasimilación del mismo propuesta como ciclo de la glutamina le da a la célula la posibilidad de reasimilar el amonio de la glutamina en glutamato y en glutamina. La regulación de la actividad de la GS podría resultar en regular el flujo de amonio hacia la síntesis perencial de uno de los dos aminoácidos según las necesidades de la célula. Se propone que cuando la glutamina es la fuente de nitrógeno, la reasimilación del amonio de la glutamina por la GDH puede ser un camino para sintetizar glutamato a partir de la glutamina; quizá otros caminos son a través de la GOGAT o la transamidación de la glutamina. La inhibición de la síntesis de glutamina por los aminoácidos glicina, serina y alanina podría derivar la reasimilación del amonio hacia glutamato a partir del cuál se puede derivar el flujo de carbono y nitrógeno hacia la síntesis de otros aminoácidos. Esto a diferencia de cuando se deriva el glutamato y la reasimilación de amonio hacia glutamina que implica un gasto de energía. Estos tres aminoácidos pueden llevar una señal regulatoria del nitrógeno α -amino. Se observe un doble nivel de regulación ya que por un lado estos aminoácidos inhiben la síntesis de la glutamina al inhibir la actividad y como respuesta a este efecto y a la disminución de la poza de glutamina se dereprime la síntesis de la GS. Esto último permite que el flujo hacia glutamina se vuelve a restituir lo que resulta en que la poza de glutamina no disminuya demasiado debido a la degradación de glutamina por la vía de la T-glutamina - ω amidasa y por la GOGAT. Quizá el aumentar la síntesis de GS β provee una manera mas eficiente de lograr la actividad de la GS requerida para restituir la resíntesis de glutamina en presencia de glicina, serina y alanina y así poder compensar la inhibición producida por estos aminoácidos. Esto podría explicarse por que la GS β tiene una velocidad máxima mayor que la GS α (J. Guzmán y J. Mora, en preparación) y la forma oligomérica híbrida compuesta por una proporción igual de monómeros α y β (18) presenta una actividad específica intermedia con respecto a la que se observa cuando hay una síntesis perencial de alguno de los dos monómeros.

3.2.b. En el crecimiento y en la reasimilación del amonio en cepas con bloqueos en la reasimilación.

Como ya mencioné, se ha demostrado que existe una degradación de la glutamina hasta amonio y esqueletos de carbono y una reasimilación del amonio en glutamato y glutamina (J. Calderón y J. Mora, en preparación). Sin embargo, cabe preguntarse que tan esencial es para la célula la resíntesis de glutamina en presencia de este aminoácido. Como instrumento que nos permitiera responder a esta pregunta, se estudió el efecto que tienen los aminoácidos inhibidores de la GS, glicina, serina y alanina, en inhibir la resíntesis de la glutamina utilizando cepas que presentan bloqueos parciales en dicha reasimilación. Se determinó la concentración de amonio excretado al medio de cultivo como una medida del amonio que viene de la degradación de la glutamina y que no puede ser reasimilado. Las cepas mutantes utilizadas disminuyen la resíntesis de glutamina porque tienen disminuida la capacidad de sintetizar glutamato, sustrato de la GS, y/o por que tienen una actividad residual de esta enzima.

-De la cepa GDH^o, Disminuye parcialmente la capacidad para sintetizar glutamato.

La cepa GDH^o crece óptimamente en glutamina como fuente de nitrógeno (fig. 9.A) y se excreta amonio al medio de cultivo (fig. 9.B), la concentración de amonio extracelular es máxima a las 8 horas de crecimiento y después disminuye ya que este amonio puede reasimilarse por la GS presente. Esta reasimilación coincide con que para este tiempo de crecimiento, la célula ha incorporado la mayor parte de la glutamina del medio y la concentración de glutamina que queda en el medio es muy baja (J. Calderón y J. Mora, en preparación). En presencia de glutamina mas alanina el crecimiento es idéntico al que se observa en glutamina y en glutamina mas leucina donde también se observa una velocidad de crecimiento similar aunque hay una fase lag inicial (fig. 9.A). Se usó leucina como control ya que compete con la entrada de la glutamina a la célula pero no es inhibidor de la GS. Por otro lado, con glicina y serina se observa una disminución casi total en el crecimiento de esta cepa GDH (fig. 9.A).

Si se propone que la disminución en el crecimiento es debida a un efecto de la glicina y la serina en la reasimilación del amonio de la glutamina, por lo que se esperaría una excreción de amonio al medio cuando estos aminoácidos están presentes. En la figura 9.B se muestra que en glutamina mas glicina y glutamina mas serina se excreta amonio y este no es reasimilado. En cambio, en presencia de alanina la excreción es mínima y con leucina no se detecta

amonio extracelular. En la figura 9.B. se reporta la concentración total de amonio excretado a distintos tiempos de crecimiento, los valores observados en glutamina mas glicina y serina son menores al máximo valor observado cuando glutamina es la única fuente de nitrógeno. Estos datos corresponden con que se observa una biosíntesis de biomasa mínima en presencia de glicina o de serina comparada con la que se sintetiza en presencia de glutamina (fig. 9.A). Si se compara la concentración de amonio excretado por mg de proteína sintetizada por ejemplo a las 8 horas de crecimiento que es cuando se observa la máxima expresión en glutamina, el valor obtenido en las condiciones de glutamina mas glicina y glutamina mas serina es de 5 y 15 veces mayor que lo que se excreta en glutamina.

La actividad de GOGAT en glutamina es muy baja (15%) y en glutamina mas glicina también se observan valores bajos de la actividad específica de la GOGAT. Se obtuvo el mismo resultado en la actividad específica de la GOGAT en las cepas silvestre, GDH^o, GDH^o, GS^o de *N. crassa* en glutamina o en glutamina mas glicina como fuente de nitrógeno (datos no presentados). Esto indica que la inhibición del crecimiento en presencia de glicina no se debe a una represión total de la GOGAT. Sin embargo se ha observado que aunque la actividad de la GOGAT es baja en presencia de glutamina, esta enzima participa en la degradación de la glutamina cuando este aminoácido está presente como fuente de nitrógeno (J. Calderon y J. Mora, en preparación). Mas adelante mostraré datos y comentaré sobre este papel de la GOGAT.

Los resultados presentados indican que la disminución en el crecimiento de la cepa GDH^o, que tiene una actividad de la GS normal, por efecto de los aminoácidos glicina, serina y alanina en presencia del producto de la GS esta dada por una disminución en la reasimilación del amonio en glutamato debida a la mutación de esta cepa y a que al disminuir la concentración de este sustrato de la GS los aminoácidos en cuestión inhiben totalmente la GS e impiden la resíntesis de la glutamina.

-De la cepa GDH^o, GOGAT^o disminuye mas la capacidad para sintetizar glutamato.

Este doble mutante carece de las actividades de dos enzimas que sintetizan glutamato : a partir de amonio la GDH y a partir de glutamina la GOGAT (fig. 6). Como ha sido observado por J. Calderon y J. Mora (datos no publicados) esta cepa GDH^o, GOGAT^o presenta la mitad de la velocidad de crecimiento de la cepa GDH^o en glutamina como fuente de nitrógeno (fig. 10.A.).

Esto indica un papel de la GOGAT, además del de la GDH, en la síntesis de glutamato cuando glutamina es la fuente de nitrógeno. También se había observado que esta cepa excreta dos veces más amonio al medio que la cepa GDH^o, y no lo reasimila lo que puede deberse a una menor poza de glutamato intracelular que impide que se reasimile por la GS (fig. 10.B). Como ya mencioné anteriormente, la célula puede obtener glutamato a partir de glutamina como producto de la transamidación de la glutamina cuando dona su grupo amido para la síntesis de diferentes compuestos. Sin embargo los datos mencionados sobre una menor velocidad de crecimiento y una mayor excreción de amonio de la cepa GDH^o, GOGAT^o en glutamina como fuente de nitrógeno indican que la capacidad de sintetizar glutamato a partir de las transamidación de la glutamina es muy limitada y que son necesarias las actividades enzimáticas de la GDH y GOGAT para sintetizar glutamato y glutamina para la biosíntesis de todos los compuestos nitrogenados que requiere la célula para un crecimiento óptimo.

En la figura 10 se observa que en presencia de alanina o leucina la velocidad de crecimiento es mayor que cuando glutamina es la única fuente de nitrógeno; en cambio, en presencia de glicina o serina se disminuye totalmente el crecimiento de la célula hasta las 24 horas (fig. 10.A). Igualmente en esta cepa se predeciría que si la inhibición del crecimiento en presencia de glicina o serina es debida a un efecto de estos aminoácidos sobre la inhibición total de la reasimilación del amonio en glutamina se esperaría que hubiera excreción de amonio y que este no se reasimilara. La figura 10.B comprueba esta predicción ya que hay excreción del amonio de la glutamina en presencia de glicina o serina mientras que en presencia de alanina o leucina solo hay una ligera excreción de amonio en las primeras 4 horas y este es posteriormente reasimilado (fig. 10.B).

Se concluye que si la célula tiene muy reducida la capacidad para sintetizar glutamato, por carecer de las actividades enzimáticas de la GDH y la GOGAT, la glicina y la serina inhiben totalmente la resíntesis de la glutamina, lo que da como resultado la inhibición total del crecimiento. Esto indica que la resíntesis de la glutamina es esencial para el crecimiento de la célula.

Cabe hacer notar que el efecto de glicina y serina en presencia de la glutamina en la cepa GDH^o, GOGAT^o es muy diferente al efecto de alanina, lo que hizo pensar que aunque alanina también es un inhibidor de la GS la diferencia en el efecto fisiológico puede explicarse por que a partir de la alanina y de leucina la célula puede sintetizar glutamato por

una transaminación reversible con glutamato (fig. 6). De aquí surge la pregunta de que porqué la célula no puede sintetizar suficiente glutamato a partir de los otros aminoácidos como glicina y serina por el mismo mecanismo y esto le permitiría crecer en glutamina en presencia de estos aminoácidos. Mas adelante me referiré y trataré de responder esta pregunta.

-De la cepa GDH⁰,GS⁰: disminuye la capacidad para sintetizar glutamato y glutamina.

Esta cepa carece de la actividad de la GDH y tiene una actividad parcial de la GS por lo que tiene muy disminuida la capacidad de asimilar el amonio tanto en glutamato como en glutamina. La figura 11 muestra los resultados del crecimiento y la excreción del amonio en esta cepa en presencia de glutamina y agregándole los aminoácidos mencionados como fuente de nitrógeno. La tabla 4 muestra la incorporación de la glutamina a esta cepa, la concentración de proteína sintetizada y el amonio excretado en las mismas condiciones de crecimiento. La evidencia experimental que se presenta en ellas se interpreta de la siguiente manera.

En glutamina como fuente de nitrógeno se observa una gran excreción de amonio el cual es reasimilado hasta después de las 12 horas de crecimiento debido a un aumento en la actividad de la GS₂ de esta cepa (J. Calderón y J. Mora, en preparación).

La leucina es un aminoácido neutro que compete por la entrada de la glutamina, no es inhibidor de la GS y puede dar glutamato por transaminación. Por lo tanto se esperaría que la cepa GDH⁰,GS⁰ creciera bien en glutamina mas leucina y no se excretara el amonio pues se puede reasimilar con la actividad residual de la GS habiendo una concentración elevada de glutamato. El ácido α-aminoisobutírico también compete por la entrada de la glutamina y no es inhibidor de la GS, sin embargo es un compuesto no metabolizable. Este aminoácido no es capaz de dar glutamato por lo que hay menor posibilidad de reasimilar el amonio en presencia de α-aminoisobutírico. Se observa una menor velocidad de crecimiento y una gran excreción de amonio en glutamina mas este aminoácido. La falta de reasimilación del amonio en presencia de α-aminoisobutírico, un aminoácido neutro, podría estar dada por una inhibición en el transporte del amonio por este aminoácido. La alanina es un inhibidor de la GS que también disminuye la entrada de glutamina a la célula y puede dar eficientemente glutamato por transaminación. Se esperaba una velocidad de crecimiento menor y cierta excreción de amonio debido a la inhibición de la GS por la alanina; aunque debe ser mínima ya que debe haber una elevada concentración intracelular de glutamato que disminuye

el efecto inhibitor de este aminoácido. La glicina y la serina inhiben el crecimiento de las otras cepas estudiadas ya que compiten por la entrada de la glutamina, son inhibidores de la GS y no dan glutamato. Se observa que la célula no crece en presencia de glicina o de serina y que hay excreción de amonio que indica una falta de reasimilación del mismo debida a que falta uno de los sustratos de la GS y su actividad enzimática está fuertemente inhibida.

Para apoyar que la excreción de amonio al medio era una medida de la degradación de la glutamina y la falta de reasimilación de este compuesto, se midió la concentración de amonio intracelular presente en estas condiciones de crecimiento mencionadas en la cepa GDH^o, GS^o. Si el amonio extracelular que medimos es el resultado de que la célula excreta el gran excedente de amonio que no puede reasimilar, el amonio intracelular estaría elevado en las condiciones en las que se excreta amonio. La tabla 5 muestra que hay una correlación entre la excreción del amonio y un aumento en la poza intracelular de este en glutamina mas glicina o alanina, mientras que en glutamina mas leucina y en glutamina sola la poza intracelular de amonio es menor y en esta última condición no se detecta amonio extracelular.

Para descartar que la glicina pudiera tener algun efecto tóxico en las células y disminuyera la viabilidad, se realizó el experimento que se muestra en la figura 12. La cepa GDH^o, GS^o se creció durante 12 horas en presencia de glutamina mas glicina como fuente de nitrógeno y posteriormente se lavó este medio y se cambió el micelio a un cultivo que tenía la misma concentración de glutamina y amonio que había en el medio de cultivo en este tiempo de crecimiento en glutamina como fuente de nitrógeno (tabla 4). Se observa que aunque hasta las 12 horas la célula no crece, si se quita la glicina del medio de cultivo esta célula es capaz de crecer en presencia de la glutamina y amonio.

Se propone que la inhibición del crecimiento de la cepa GDH^o, GS^o en presencia de glicina y serina además de glutamina como fuente de nitrógeno es debida a que la célula tiene disminuida la síntesis de glutamato a partir del amonio de la glutamina por el bloqueo en la GDH y a que le falta la GS β . Esta proposición implica que la célula no puede sintetizar glutamato a partir de glicina y serina por transaminación, a diferencia de lo que ocurre con alanina y leucina. Para comprobar esta hipótesis se determinaron las pozas intracelulares de glutamato presentes en esta cepa después de 12 horas de crecimiento en las fuentes de nitrógeno mencionadas; estos resultados se muestran en la figura 13. En todas las condiciones en las que esta cepa puede crecer, la poza intracelular de glutamato es mucho mayor a la que se

determinó en glutamina mas glicina o serina en las que la célula no crece y la poza de glutamato es muy baja.

En la figura 13 también se muestran las pozas intracelulares de glutamina de la cepa GDH[⊖],GS[⊖] a las 12 horas de crecimiento en las mismas fuentes de nitrógeno. Se observa que en glutamina como única fuente de nitrógeno, la poza intracelular de glutamina es muy baja (niveles no detectables). Estos datos se podrían explicar por que gran parte de la glutamina que entra a la célula se degrada y la resíntesis de glutamina esta muy reducida en esta mutante; la glutamina que no es degradada, se estaría derivando hacia la síntesis de proteínas para proveer el crecimiento óptimo de la célula. En la figura 11 se mostro que en glutamina como fuente de nitrógeno el crecimiento de esta cepa es óptimo y que a las 12 horas de crecimiento hay una elevada excreción de amonio. La mayor poza de glutamina que se observa en glutamina mas alanina, leucina o aminoisobutírico comparada con la que se observa en glutamina podría deberse a que en presencia de estos aminoácidos existe una menor velocidad de crecimiento (fig. 11) lo que podría implicar que se requiere derivar menor cantidad de glutamina para la síntesis de proteínas en estas condiciones de crecimiento. Por otra parte, en presencia de estos aminoácidos la poza de glutamato es mayor y esto podría proveer una mayor capacidad para resintetizar glutamina. Así, una mayor resíntesis de glutamina y/o una menor derivación de la glutamina para síntesis de macromoléculas, darían una mayor poza intracelular de glutamina. En presencia de glicina y de serina también se observa una elevada poza intracelular de glutamina lo cual podría indicar que la glutamina que esta entrando a la célula y que no es degradada se acumula durante las 12 horas de incubación en estos medios de cultivo en los que la célula no esta creciendo.

La capacidad que conserva la cepa GDH[⊖],GS[⊖] para sintetizar glutamato a partir de la glutamina como fuente de nitrógeno puede ser el resultado de la transamidación de la glutamina por diferentes transamidases o por la GOGAT y de la transaminación reversible de otros aminoácidos hacia glutamato. Es obvio que la capacidad para sintetizar glutamato como producto de la transamidación de la glutamina no es suficiente para proveer las concentraciones óptimas de este aminoácido. Esto se comentó anteriormente al mostrar que la cepa GDH[⊖],GOGAT[⊖] (fig. 10) que no puede sintetizar glutamato por la GDH ni por la GOGAT, presenta una menor velocidad de crecimiento en glutamina como fuente de nitrógeno que la que presenta la cepa silvestre. Como se indica en el esquema de la figura 6, las transaminasas de glutamato pueden funcionar de una manera reversible dando glutamato a partir de acetoglutarato y otro aminoácido, lo cual depende de que existe una concentración suficiente de estos sustratos para

desplazar el equilibrio hacia la síntesis de glutamato. Así mismo, para sintetizar glutamato por la GOGAT se requiere que exista una poza lo suficientemente elevada de acetoglutarato pues también es uno de los sustratos de esta enzima.

Para responder la pregunta de por que no se sintetiza glutamato en presencia de glicina y serina en la cepa GDH⁺,GS⁻ a diferencia de lo que sucede en presencia de alanina o leucina, se midieron las pozas intracelulares de acetoglutarato de la cepa GDH⁺,GS⁻ a las 12 horas de crecimiento en las fuentes de nitrógeno mencionadas. Estos resultados se presentan en la tabla 6 e indican que la poza de acetoglutarato es mucho menor en presencia de glicina y serina que en las otras fuente de nitrógeno. La presencia de una poza de glutamato baja en presencia de glutamina mas glicina o serina (fig. 13) esta relacionada con la presencia de una poza baja de acetoglutarato en las mismas condiciones de crecimiento (tabla 6) de la cepa GDH⁺,GS⁻ y si la poza de acetoglutarato es muy baja se disminuye drásticamente la capacidad de la célula para sintetizar glutamato a través de la GOGAT o de una T-glu.

También se determinaron las pozas intracelulares de glucosa en estas condiciones para tratar de correlacionar la disminución de acetoglutarato intracelular con la acumulación de glucosa que indicaría una disminución en la utilización de la fuente de carbono. La tabla 6 muestra que en glicina, serina y alanina hay una acumulación de la poza intracelular de glucosa a diferencia de cuando glutamina o glutamina mas leucina o aminoisobutírico están presentes. El efecto de acumular la glucosa en presencia de glicina y serina se puede interpretar como que hay un bloqueo en el catabolismo de la fuente de carbono que traería como consecuencia una acumulación en la poza de glucosa y una disminución en la poza de acetoglutarato y quizá de otros metabolitos intermediarios del metabolismo del carbono. El efecto de la alanina en el aumento de la poza intracelular de la glucosa podría interpretarse como que la alanina al transaminar da piruvato y este puede estar siendo utilizado eficientemente como fuente de carbono lo que resultaría en la acumulación de la glucosa.

Se puede distinguir el efecto fisiológico de la glicina y la serina en las diferentes cepas estudiadas con el de la alanina, aunque los tres son inhibidores de la GS. Esto se podría explicar por una diferente capacidad de dar glutamato a partir de cada uno de estos tres aminoácidos. La poza elevada de acetoglutarato en presencia de alanina pueden desplazar el equilibrio de la T-glu hacia la síntesis de glutamato. La célula puede sintetizar suficiente glutamato a partir de una concentración elevada de alanina sin la necesidad de la

actividad de la GDH y una concentración elevada de glutamato disminuiría el efecto inhibitor de este aminoácido sobre la GS.

La síntesis de glutamato y glutamina constituyen el gran flujo de la fuente de carbono y de nitrógeno a la célula y es lógico pensar que la regulación de esta síntesis puede estar sujeta a muy distintos niveles de regulación por circuitos complejos que le permitan a la célula ajustar muy finamente el flujo de carbono y de nitrógeno según las necesidades de sintetizar glutamato o glutamina para a partir de ellos sintetizar todos los compuestos nitrogenados que requiere. El efecto de la inhibición de la actividad de la GS y el aumento de la síntesis de esta enzima por aminoácidos como glicina, serina y alanina podrían regular el flujo del amonio y esqueletos de carbono hacia la síntesis perencial de glutamato por la GDH y así proveer a la célula de una relación entre las porces de glutamato y glutamina óptimas para el crecimiento. Si la célula tiene bloqueada alguna de las enzimas de asimilación del amonio, el efecto de la inhibición de la GS por estos aminoácidos trae como consecuencia una disminución en la asimilación del amonio hacia glutamato, que se explica por una disminución en la poza de α -cetoglutarato, y/o hacia la síntesis de glutamina por disminuir la concentración de uno de los sustratos de la GS.

Surgió la pregunta de que si la inhibición de la síntesis de glutamina por la glicina y serina así como un bloqueo en la utilización de la fuente de carbono que reduce la poza intracelular de α -cetoglutarato puede explicarse por el mismo efecto regulatorio de estos aminoácidos sobre la GS. A continuación describiré el enfoque experimental utilizado para tratar de responder esta pregunta.

II. Regulación del flujo de la fuente de carbono por el flujo de nitrógeno hacia la síntesis de glutamina.

La síntesis de glutamato y glutamina son puntos claves en el metabolismo celular ya que a través de su síntesis y de la distribución del nitrógeno de estos aminoácidos ocurre el flujo de todo el carbono y el nitrógeno de la célula. Se han reportado ejemplos que indican que una disminución en la velocidad de crecimiento de N. crassa, debido a un bloqueo en la síntesis de glutamato o de glutamina da como resultado una acumulación del α -cetoglutarato intracelular. La cepa GDH⁰ que presenta una velocidad de crecimiento reducida en amonio como fuente de nitrógeno, por que no puede asimilar el amonio en glutamato por la GDH, presenta una poza intracelular de

Acetoglutarato mayor a la que presenta la cepa silvestre creciendo optimamente en amonio (23). Por otro lado, como ya mencioné en la introducción, se han reportado estudios sobre una relación entre la privación de la fuente de carbono y la degradación de la GS de N. crassa (40) y de C. utilis (41,42). Sin embargo no hay reportes sobre una regulación que coordine la síntesis de la glutamina con la utilización de la fuente de carbono. Con base en los resultados experimentales mostrados en la tabla 6 sobre la inhibición de la síntesis de la glutamina y la disminución de las pozas de acetoglutarato, se decidió estudiar si estos dos efectos regulatorios están relacionados.

El enfoque experimental que se siguió para responder esta pregunta fue el de comparar como se metaboliza la fuente de carbono cuando la célula tiene un flujo óptimo de nitrógeno y de carbono, cuando este flujo está disminuido y cuando está totalmente inhibido. La fuente de carbono que siempre se utilizó es sacarosa, que es degradada en el espacio periplásmico a glucosa y fructosa por la invertasa y después estas hexosas son metabolizadas para obtener energía y esqueletos de carbono. Se midieron las pozas intracelulares de acetoglutarato que además de ser un intermediario del ciclo de Krebs es el sustrato de la GDH, o sea, el esqueleto de carbono que se utiliza para fijar el nitrógeno inorgánico en compuestos orgánicos.

La figura 14 muestra el crecimiento y la poza intracelular de acetoglutarato presente en la cepa GDH^o crecida en diferentes fuentes de nitrógeno. El crecimiento de amonio en exceso tiene una fase lag debido a que esta cepa no puede asimilarlo por la GDH y solamente tiene la vía GS-GOGAT para su asimilación. Si además de amonio se agrega glicina o serina estos aminoácidos inhiben totalmente el crecimiento de la cepa GDH^o (48) (fig. 14.A). Así mismo, esta cepa es incapaz de usar a la glicina o a la serina como fuente de nitrógeno (fig. 14.A). Como ya comenté anteriormente, el efecto de anular el crecimiento de la cepa GDH^o con glicina y serina se ha interpretado como el resultado de la inhibición de la GS por estos aminoácidos lo que disminuye totalmente la capacidad de asimilación de amonio de esta cepa. La metionina sulfoximina (MS) es un inhibidor irreversible de la GS (58), como se puede demostrar si se agrega a un medio de cultivo con amonio como fuente de nitrógeno se inhibe totalmente el crecimiento como se observa en la figura 14. A para la cepa GDH^o. La figura 14.B muestra el valor de las pozas intracelulares de acetoglutarato presentes a las 12 horas de crecimiento de la cepa GDH^o en cada una de las fuentes de nitrógeno mencionadas. En amonio como fuente de nitrógeno se observa una acumulación del acetoglutarato que se ha interpretado como el resultado de la falta de actividad de la GDH. En cambio, en presencia de

amonio mas glicina, serina o MS y en glicina y serina como fuente de nitrógeno la poza intracelular de α cetoglutarato es muy baja, siendo hasta 20 veces menor que en amonio. Este resultado es paradójico según la interpretación que se había dado sobre la acumulación del α cetoglutarato tanto en la cepa GDH⁺ en amonio como en la cepa silvestre en amonio limitado (29). Inicialmente se pensó que si se bloquea totalmente el flujo por inhibir la actividad de la GS se deberían acumular también pozas de α cetoglutarato siempre que estuviera metabolizándose la fuente de carbono. Los resultados de la figura 14.B son opuestos a esta interpretación ya que al inhibir el crecimiento por inhibir la síntesis de la glutamina las pozas de un esqueleto de carbono, α cetoglutarato, son muy bajas.

Surgió la pregunta de si se puede ver el mismo efecto de disminuir la utilización de la fuente de carbono al inhibir la síntesis de la glutamina pero en la cepa silvestre, sin que haya bloqueos en las vías de asimilación de amonio. Para esto se compararon las pozas intracelulares de α cetoglutarato de la cepa silvestre después de 12 horas en amonio y en amonio mas MS. Se observa que mientras que en amonio se obtiene un crecimiento óptimo, en presencia de MS se inhibe totalmente este crecimiento (fig. 15.A). La poza intracelular de α cetoglutarato que se observa cuando se usó amonio como fuente de nitrógeno (fig. 15.B) es menor a la que se observaba en la cepa GDH⁺ (fig. 14.B) lo cual se esperaba pues la cepa silvestre presenta un crecimiento óptimo en amonio a diferencia de la GDH⁺ por el bloqueo que presenta. Si se mide la poza intracelular de α cetoglutarato en el cultivo con amonio mas MS apenas se detecta una poza basal, 10 veces menor a la que se observa en amonio como fuente de nitrógeno.

Se propone que al parar el flujo de carbono y de nitrógeno por inhibir la síntesis de la glutamina se disminuye la utilización de la fuente de carbono extracelular.

Los experimentos anteriores fueron realizados partiendo de conidias de *N. crassa* que al incubarse en un medio de cultivo en el que no crecen, ya sea con glicina, serina o MS. Es posible que en estas condiciones se estén inhibiendo procesos de diferenciación celular muy importantes como la germinación. Nos preguntamos si el efecto que observamos sobre la inhibición de la utilización de la fuente de carbono pudiera ser el resultado de un efecto colateral por la inhibición de procesos de diferenciación celular como la germinación de las conidias y no el resultado de una coordinación entre esta y la inhibición de la síntesis de glutamina. Para explorar esto se realizó el experimento que se presenta en la figura 16.

La cepa GDH^o de N. crassa se precreció durante 6 horas, a este tiempo el micelio se lavo y se cambió a otros medios de cultivo en los que se siguió el crecimiento por otras 2 horas. Como se observa en la figura 14 la cepa es capaz de crecer si se cambia a un medio con amonio o con amonio mas alanina como fuente de nitrógeno, pero no crece si el medio tiene amonio mas glicina, serina o MS. Si se determina la poza intracelular de acetoglutarato después de dos horas de incubación en cada uno de estos medios, no se obtienen diferencias significativas en ninguno de ellos (datos no presentados), a diferencia de lo que se observa en la figura 14. E cuando se determinan las pozas partiendo de conidias incubadas por 12 horas. El resultado de la figura 14 indicaría el valor de acetoglutarato que se acumuló durante 12 horas pero partiendo de una poza basal que presentan las conidias de N. crassa a tiempo cero que es despreciable (0.15 nmolas/mg proteína). En cambio, en el experimento de la figura 16 las conidias se precrecieron durante 6 horas en alanina como fuente de nitrógeno y en este momento, antes del cambio de medios, la poza intracelular de acetoglutarato es de 5 nmolas/mg de proteína. El tiempo en el que se incubaron las células después del cambio puede ser demasiado corto como para notar un cambio en la poza de acetoglutarato de la que se partió y en realidad la poza intracelular medida en estas condiciones no dejaría que tanto se esté metabolizando la fuente de carbono. Por esta razón se procedió a medir el acetoglutarato sintetizado de novo después del cambio de medio de cultivo. Esto se logró dando a los cultivos un pulso corto, 15 minutos antes de las 2 horas, con sacarosa-14C y determinando la radiactividad incorporada exclusivamente en acetoglutarato que fue previamente transformado a glutamato con la GDH comercial y el glutamato-14C se separó en un analizador de aminoácidos. La radiactividad incorporada en este es proporcional a la concentración de acetoglutarato sintetizado de novo a partir de la sacarosa-14C durante el tiempo que se le dió el pulso radiactivo, por tanto no se está tomando en cuenta la poza de acetoglutarato que haya sido sintetizado y/o acumulado anteriormente. En la figura 16 se muestran los resultados de esta determinación e indican que en presencia de amonio mas alanina, serina o MS, que inhiben el crecimiento de la cepa GDH^o por inhibir la asimilación de amonio por la GS, la incorporación de radiactividad en acetoglutarato es despreciable o nula lo que se interpreta como un bloqueo en la degradación de la sacarosa. Esto es diferente a lo que se observa en presencia de amonio o amonio mas alanina ya que en estos medios en los que la célula crece, y se observa una síntesis de novo de acetoglutarato después de dos horas de crecimiento. En este experimento también se determinaron las pozas intracelulares de glucosa. En la figura 16 se observa que después de dos horas de crecimiento en amonio y en amonio mas alanina, las pozas intracelulares de glucosa son menores

que en las otras tres condiciones en las que la célula no crece. Estos resultados se pueden interpretar como que hay un bloqueo en el catabolismo de la glucosa, que viene de la degradación de la sacarosa, por lo que no hay síntesis de novo de α -cetoglutarato en presencia de glicina, serina o MS que inhiben el crecimiento y son inhibidores de la GS. Esto es, en el micelio ya germinado de *N. crassa* hay una regulación coordinada entre la inhibición de la síntesis de glutamina y la utilización de la fuente de carbono.

Según la última proposición, los resultados presentados en la tabla 6 y figura 7 sobre la acumulación de la glucosa y la disminución en pozas de α -cetoglutarato en la cepa GDH^o, GS^o en presencia de glicina y serina que inhiben el crecimiento con glutamina se podrían explicar de la siguiente manera. Debido a los bloqueos en la GDH y la GS de la cepa y a la presencia de glicina o serina esta inhibida totalmente la capacidad de reasimilación del amonio en glutamato y en glutamina, y por lo tanto el flujo de carbono y de nitrógeno está parado. Como consecuencia del bloqueo de estos flujos, se regularía la utilización de la fuente de carbono bloqueandola a un nivel tal que hace que se acumule glucosa y se disminuya el α -cetoglutarato.

La figura 17 esquematiza las encrucijadas metabólicas del metabolismo del carbono y del nitrógeno: la síntesis de glutamato y glutamina y la distribución del nitrógeno de estos compuestos a diferentes esqueletos de carbono. La distribución de esqueletos obtenidos de la fuente de carbono depende de la capacidad de asimilación de amonio hacia la síntesis de glutamato y glutamina por la GDH y la GS. ¿Qué sucedería si se inhibe este flujo de carbono y nitrógeno? Se podrían acumular distintos intermediarios del ciclo de Krebs como α -cetoglutarato que no estaría fluyendo hacia la síntesis de glutamato, además se acumularían todos los esqueletos de carbono que forman los aminoácidos, bases nitrogenadas, aminoazúcares, vitaminas que se obtienen a partir de glutamato y principalmente de glutamina. La célula debe poder sentir el flujo hacia glutamina, donador universal de nitrógeno, para regular coordinadamente la utilización de la fuente de carbono. Esto evita la acumulación de muchos compuestos de carbono que no pueden ser derivados hacia síntesis de macromoléculas y reduce el gasto energético que esta utilización implica.

Esta conclusión general abre un panorama sobre regulación metabólica muy amplio ya que implica una regulación concertada entre el metabolismo de carbono y de nitrógeno que no ha sido contemplada para ningún otro sistema experimental.

Podemos pensar que esta regulación está compuesta por circuitos metabólicos muy complejos que quedan por dilucidarse y que hacen del estudio de la regulación del metabolismo celular un proyecto de investigación cada vez mas interesante.

Por último, comentaré solo algunas de las preguntas y estrategias experimentales que se pueden seguir para responderlas, que se deriven de la proposición arriba mencionada.

¿Cuál es la señal regulatoria de la célula que inhibe la utilización de la fuente de carbono como resultado de la inhibición de la síntesis de glutamina? Como ya mencioné, son muchos los compuestos que se podrían acumular si se inhibe el flujo de carbono y de nitrógeno al inhibir la síntesis de la glutamina y quizá alguno o varios de estos metabolitos son las señales metabólicas que hacen posible esta regulación.

¿A qué nivel del metabolismo de carbono ocurre este bloqueo? Los resultados que nos llevaron a proponer que existe un bloqueo en la utilización del carbono se basaron en medir las pozas intercelulares de α -cetoglutarato y de glucosa. Obviamente, entre la síntesis de α -cetoglutarato a partir de glucosa existen muchos posibles niveles de regulación de esta vía y quedan por conocer los puntos del metabolismo en donde se dé esta regulación así como los niveles regulatorios existentes. Datos preliminares indican que pudiera haber también una acumulación de ATP en las condiciones en las que se inhibió la GS y la síntesis de α -cetoglutarato.

En el grupo de J. Mora se ha pensado que una posible estrategia que nos permita dilucidar los mecanismos regulatorios existentes sería el análisis genético-fisiológico tanto de cepas resistentes como sensibles a la glicina, inhibidor de la síntesis de glutamina. Esta línea de investigación se está siguiendo actualmente por Y. Mora y J. Mora y según resultados muy preliminares indica que sí puede ser una estrategia experimental que ayude a resolver estas preguntas. Por ejemplo, se obtuvo una cepa sensible a glicina a partir de la cepa silvestre y presenta una alteración estructural en la GS, diferente a las otras alteraciones estructurales reportadas (50). El estudio de cepas mutantes resistentes a glicina y obtenidas a partir de una mutante con una delección en el gene estructural de la GDH están apenas siendo estudiadas. Parecería que la resistencia a glicina podría estar dada tanto por una GS menos sensible a este inhibidor como por una regulación diferente de la utilización de la fuente de carbono.

Seguramente será necesario utilizar distintas estrategias experimentales que nos permitan conocer los mecanismos

regulatorios que pueden ocurrir en una célula para regular algo esencial para su sobrevivencia como es el metabolismo del carbono y del nitrógeno.

CONCLUSIONES.

1. La glicina, la serina y la alanina inhiben la actividad in-vitro de las GS α y β de Neurospora crassa. En este hongo, la glicina y la alanina pueden ser sintetizados in-vitro a partir de glutamato o de glutamina por transaminación, siendo mayor la actividad con glutamato.

2. La glicina y la serina inhiben in-vivo la asimilación primaria del amonio lo que resulta en la disminución del crecimiento de la cepa silvestre y la inhibición total del crecimiento de un auxótrofo parcial de glutamina, en presencia de alguno de los sustratos de la GS como fuente de nitrógeno.

3. La glicina y la serina inhiben in-vivo la reasimilación del amonio de la glutamina lo que resulta en la inhibición del crecimiento de cepas mutantes con una capacidad reducida para asimilar amonio, en presencia de glutamina como fuente de nitrógeno.

4. La glicina, serina y alanina ejercen un doble nivel regulatorio en sentido opuesto en la síntesis de la glutamina. Por un lado inhiben la actividad de la GS in-vivo tanto en la asimilación primaria del amonio, en presencia de alguno de los sustratos de la GS, como en la reasimilación del amonio de la glutamina. Por otro lado, en glutamina como fuente de nitrógeno, aumenta la actividad de esta enzima y la síntesis del polipéptido β .

5. La regulación de la síntesis de la glutamina por los aminoácidos glicina, serina y alanina le permite a la célula derivar el flujo de amonio principalmente hacia la síntesis de glutamato y hacia la síntesis de otros aminoácidos que se sintetizan a partir de este. Por lo tanto provee un mecanismo de regulación fina para mantener una relación óptima entre las pozas intracelulares de glutamato y glutamina de la cuál dependen el flujo de carbono y de nitrógeno hacia la síntesis de todos los compuestos nitrogenados esenciales para la síntesis de macromoléculas.

6. La inhibición de la síntesis de la glutamina in-vivo, que resulta en la inhibición del crecimiento de Neurospora crassa, bloquea consecuentemente el flujo de la fuente de carbono.

7. Existe una coordinación entre la regulación de los flujos de carbono y de nitrógeno en Neurospora crassa.

REFERENCIAS.

1. Tempest, D.W., J.L. Meers, and C.M. Brown. 1970. *Biochem. J.* 117: 405-407.
2. Meers, J.L., D.W. Tempest, and C.M. Brown. 1970. *J. Gen. Microbiol.* 64: 187-194.
3. Branchley, J.E., M.J. Frival, and E. Magasanik. 1976. *J. Bacteriol.* 127: 141-148.
4. Fehel, G., A.D. Zelenetz, and B.M. Tyler. 1978. *J. Bacteriol.* 133: 139-148.
5. Ledinger, S.M., L.G. Patil, and J.E. Branchley. 1980. *J. Bacteriol.* 141: 190-198.
6. Senior, P.J. 1975. *J. Bacteriol.* 123: 407-418.
7. Hernández, G., R. Sánchez-Pescador, R. Palacios, and J. Mora. 1983. *J. Bacteriol.* 154: 524-528.
8. Blumenthal, K.M., and E.L. Smith. 1973. *J. Biol. Chem.* 248: 6002-6008.
9. Holder, A.A., J.C. Wotton, A.J. Baron, G.K. Chambers, and J.R.S. Fincham. 1975. *Biochem. J.* 149: 757-773.
10. Brett, M., G.K. Chambers, A.A. Holder, J.R.S. Fincham, and J.C. Wotton. 1976. *J. Mol. Biol.* 106: 1-22.
11. Fincham, J.R.S., and A.J. Baron. 1977. *J. Mol. Biol.* 110: 627-642.
12. Seale, T.W., M. Brett, A.J. Baron, and J.R.S. Fincham. 1977. *Genetics.* 86: 261-274.
13. Siddig, M.A.M., J.A. Kinsey, J.R.S. Fincham, and M. Keighren. 1980. *J. Mol. Biol.* 137: 125-135.
14. Hummelt, G., and J. Mora. 1980. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92: 127-133.
15. Hummelt, G., and J. Mora. 1980. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96: 1688-1694.
16. Palacios, R. 1976. *J. Biol. Chem.* 251: 4787-4791.
17. Sánchez, F., E. Calva, M. Campomanes, L. Blanco, J.L.

- Saborío, and R. Palacios. 1980. *J. Biol. Chem.* 255: 2231-2234.
18. Dávila, G., M. Lara, J. Guzmán, and J. Mora. 1980. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92: 134-140.
19. Lara, M., L. Blanco, M. Campomanes, E. Celva, and J. Mora. 1982. *J. Bacteriol.* 150: 105-112.
20. Vichido, I., Y. Mora, C. Quinto, R. Palacios, and J. Mora. 1978. *J. Gen. Microbiol.* 106: 251-259.
21. Quinto, C., J. Mora, and R. Palacios. 1977. *J. Biol. Chem.* 252: 8724-8727.
22. Sánchez, F., M. Campomanes, C. Quinto, W. Hansberg, J. Mora, and R. Palacios. 1978. *J. Bacteriol.* 136: 880-885.
23. Limón-Lason, J., M. Lara, E. Reséndiz, and J. Mora. 1977. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78: 1234-1240.
24. Wallsgrove, R.M., F.J. Lea, and B.J. Mifflin. 1979. *Plant. Physiol.* 68: 232-236.
25. Lomnitz, A. 1983. Tesis de Licenciatura en Investigación Biomedica Basica. UACyP. CCH. UNAM.
26. Mora, Y., G. Espín, K. Willms, and J. Mora. 1978. *J. Gen. Microbiol.* 104: 241-250.
27. Espín, G., R. Palacios, and J. Mora. 1979. *J. Gen. Microbiol.* 115: 59-68.
28. Cooper, A.J.L., and A. Meister. 1977. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 4: 281-303.
29. Cooper, A.J.L., and A. Meister. 1981. *Comp. Biochem. Physiol.* 69B: 137-145.
30. Morder, C., and A. Meister. 1958. *Neurospora Biochem. Biophys. Acta.* 28: 202-203.
31. Schapiro, E.M., and E.R. Stadtman. 1970. *Annu. Rev. Microbiol.* 24: 501-524.
32. Stadtman, E.R., and A. Ginsburg. 1974, in *The Enzymes*, ed. Boyer, P.D. (Academic Press, New York), Vol. X, pp. 755-807.
33. Deuel, T.F., and E.R. Stadtman. 1970. *J. Biol. Chem.* 245: 5206-5213.
34. Rowell, P., S. Enticott, and W.D.P. Stewart. 1977. *New*

Plant. 79: 41-54.

35. Tull, E., and J. Thoenes. 1980. Biochim. Biophys. Acta. 613: 524-533.

36. Karson, H., and D. Bray. 1968. Biochemistry. 7: 3589-3599.

37. D'Neel, T.D., and J.H. Kenneth. 1975. Plant Physiol. 55: 968-974.

38. Southalshabel, S., and M. Appaji Rao. 1973. Arch. Biochem. Biophys. 194: 589-597.

39. Tale, S.S., L. Fang-Yun, and A. Reister. 1972. J. Biol. Chem. 247: 5312-5321.

40. Hora, Y., O. Chávez, and J. Hora. 1980. J. Gen. Microbiol. 119: 435-443.

41. Ferguson, A.R., and A.P. Sims. 1974. J. Gen. Microbiol. 84: 159-171.

42. Ferguson, A.R., and A.P. Sims. 1974. J. Gen. Microbiol. 90: 173-183.

43. Hennings, B.A. 1978. J. Bacteriol. 135: 867-877.

44. Brown, C.H., V.J. Dorn, and B. Johnson. 1973. Nature (London) New Biol. 245: 115-116.

45. Roon, R.J., H.L. Even, and F. Lavinore. 1974. J. Bacteriol. 118: 69-73.

46. Lee, P.J., and E.J. Riflin. 1974. Nature, 251: 615-616.

47. Riflin, E.J., and P.J. Lee. 1975. Biochem. J. 147: 403-409.

48. Fincher, J.R.S. 1956. J. Biol. Chem. 161: 61-73.

49. Cavile, G., F. Sánchez, R. Palacios, and J. Hora. 1978. J. Bacteriol. 134: 693-698.

50. Cavile, G., S. Bron, Y. Hora, R. Palacios, and J. Hora. 1983. J. Bacteriol. En prensa.

51. Vogel, H.J. 1956. Microbiol. Genet. Bull. 13: 42-43.

52. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

52. T. Hiki, T. K. S. Y. Takano, I. Hayano, and Y. Tsubokawa, 1991, Agric. Biol. Chem. 65: 1715-1717.

54. Werron, H., H. G. Rogu H. Hielinger, 1970, Z. Analyt. Chem. 252: 224-228.

55. Cooper, G. J. L., 1970, Anal. Biochem. 99: 444-446.

56. Cooper, G. J. L., G. R. Eber, H. Kott, and T. E. Duffy, 1969, Anal. Biochem. 103: 119-126.

57. Eonner, H. K., and R. A. Larky, 1974, Eur. J. Biochem. 46: 23-26.

58. Faurio, R., and A. Heister, 1968, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 59: 164-170.

TABLA 1.

Cepas de *Neurospora crassa*

| Nombre ^a | Alelo ^b | Fenotipo | Referencia |
|---------------------------------------|--------------------|---|------------|
| Silvestre | <u>74-A</u> | | |
| GDH [⊖] | <u>am-1</u> | mutante estructural que carece de la actividad de la GDH | 10, 48 |
| GS [⊖] | <u>gln-1a</u> | mutante auxótrofo parcial de glutamina que carece de la GS β activa | 17, 49 |
| GOGAT [⊖] | <u>en-am</u> | mutante que carece de la actividad de la GOGAT | 15 |
| GS β [⊖] | <u>1b-R8</u> | mutante regulatoria que presenta solamente de la GS α | 50 |
| GDH [⊖] , GOGAT [⊖] | <u>en-am, am-1</u> | doble mutante obtenida de la cruce de las mutantes sencillas anteriores | |
| GDH [⊖] , GS [⊖] | <u>am-1, gln1a</u> | doble mutante obtenida de la cruce de las mutantes sencillas anteriores | |

a. Nombre que se utiliza en este trabajo para cada cepa.

b. De acuerdo con el Fungal Genetics Stock Center.

TABLA 2.

Actividad específica de la transaminasa de glutamina y la transaminasa de glutamato.

| Sustratos | | Actividad específica nmoles producto/mg prot. |
|------------|------------|--|
| aminoácido | acetoácido | |
| glutamina | glioxalato | 0.04 |
| glutamina | piruvato | 0.18 |
| glutamato | glioxalato | 1.15 |
| glutamato | piruvato | 7.70 |

Las actividades enzimáticas se determinaron en la cepa silvestre 74-A después de 10 horas de crecimiento a 37°C en glutamina como fuente de nitrógeno. Se cuantificaron el acetoglutarato y el acetoglutaramato, productos de las transaminaciones de glutamato y glutamina respectivamente (Ver Material y Metodos).

TABLA 3.

Pozas intracelulares de glutamato de la cepa GS⁻.

| F. de N. | Glutamato μmoles/mg prot. |
|------------------------|------------------------------|
| glutamato | 0.89 |
| glutamato + glicina | 0.72 |
| glutamato + serina | 0.58 |
| glutamato + alanina | 0.82 |

La pozas intracelulares de glutamato se determinaron después de 12 hrs de cultivo a 37°C en las fuentes de nitrógeno (F. de N.) que se indican.

TABLA 4.

Proteína sintetizada, incorporación de la glutamina del medio de cultivo y excreción de amonio de la cepa GDH⁻GS⁻.

| F. de N. | Tiempo de crecimiento Hrs. | Proteína sintetizada mg/ml cultivo | gln incorporada mM | NH ₄ ⁺ extracelular mM |
|--|-------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|---|
| Glutamina | 12 | 0.331 | 2.83 | 2 |
| | 24 | 0.578 | 4.65 | 0.11 |
| glutamina + glicina | 12 | 0.002 | 0.91 | 0.37 |
| | 24 | 0.012 | 1.16 | 0.90 |
| glutamina + serina | 12 | 0 | 0.10 | 0.21 |
| | 24 | 0 | 0.20 | 0.40 |
| glutamina + alanina | 12 | 0.061 | 0.42 | 0.21 |
| | 24 | 0.311 | 0.70 | 0.80 |
| glutamina + leucina | 12 | 0.082 | 0.46 | 0.08 |
| | 24 | 0.637 | 0.89 | 0.03 |
| glutamina + ac. α-aminoisobu- tirico | 12 | 0.049 | 0.86 | 1 |
| | 24 | 0.344 | 4.43 | 1.7 |

La concentración de los aminoácidos usada es la misma que en la figura 11.

TABLA 5.

Pozas intracelulares de amonio de la cepa GDH[⊖]GS[⊖].

| F. de N. | Amonio. mM |
|------------------------|---------------|
| glutamina | 3.9 |
| glutamina + glicina | 15.1 |
| glutamina + alanina | 14.2 |
| glutamina + leucina | 5.4 |

La poza intracelular de amonio se determinó a las 24 horas de crecimiento a 37°C. La concentración de los aminoácidos usada es la misma que en la figura 11,

F. de N. = Fuente de Nitrógeno.

TABLA 6.

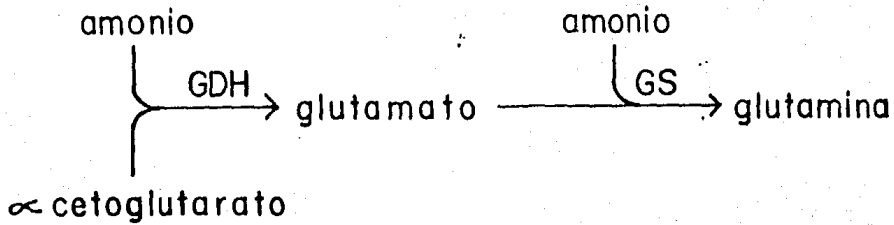
Pozas intracelulares de α acetoglutarato
y glucosa de la cepa GDH⁻,GS⁻.

| F. de N. | α acetoglutarato* | Glucosa* |
|--|--------------------------|----------|
| Glutamina | 27.6 | 26.5 |
| Glutamina + glicina | 2.9 | 78 |
| Glutamina + serina | 5.2 | 85.5 |
| Glutamina + alanina | 19.5 | 163.8 |
| Glutamina + leucina | 15.3 | 10.1 |
| Glutamina + ac. α aminoisobutirico | 22.8 | 40 |

* La cepa GDH⁻,GS⁻ de *N. crassa* se creció a 37°C durante 12 hrs, en cultivos con las fuentes de nitrógeno (F. de N.) que se indican.

* Expresados en μ moles/mg proteína.

A. Via GDH-GS.



B. Via GS-GOGAT

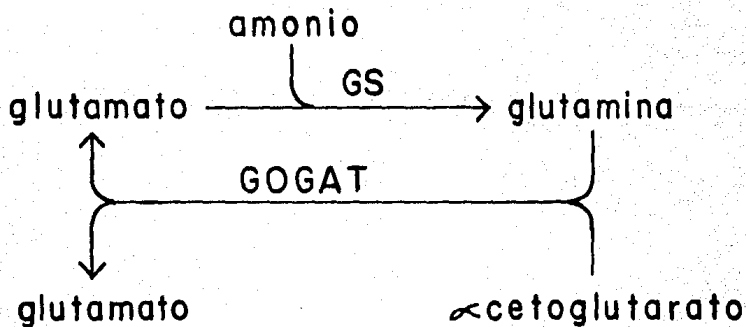


Fig.1 Vías de asimilación de amonio. GDH: deshidrogenasa glutámica bio-sintética, GS: glutamino sintetasa, GOGAT: glutamato sintasa.

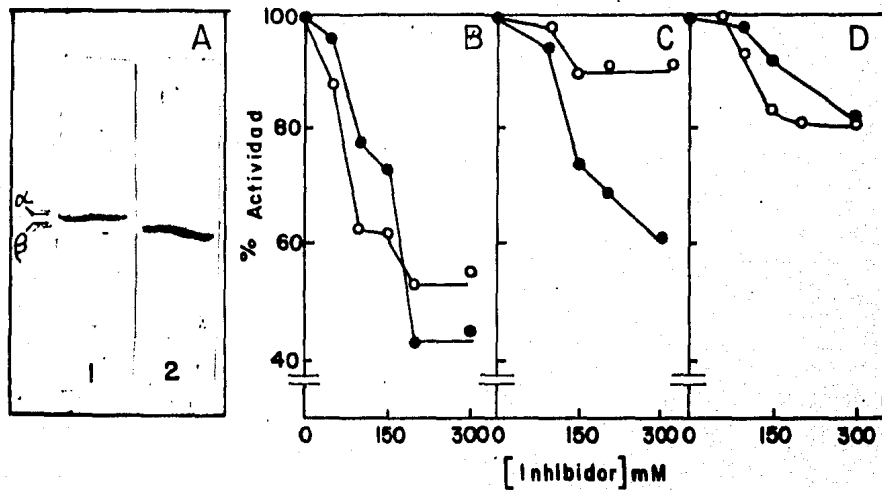


Fig.2 Electroforesis en gels de acrilamida-SDS urea de las GS puras (A) y inhibición de la actividad de la GS por glicina (B), serina (C), y alanina (D). A. Carril 1: GS α purificadas de la cepa 1b-R8; carril 2: GS β purificadas de la cepa silvestre. B, C y D. (○) inhibición de la GS α , (●) inhibición de la GS β .

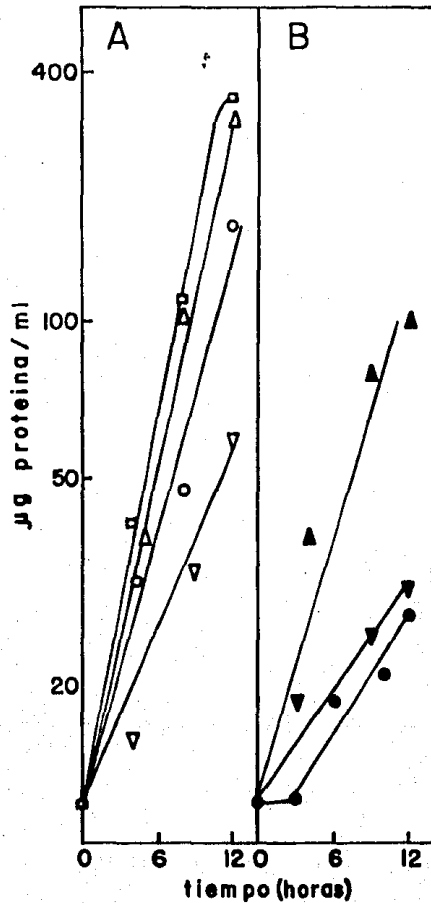


Fig.3 Crecimiento de la cepa silvestre de *Neurospora crassa* en diferentes aminoácidos como fuentes de nitrógeno. A. (□) glutamato (glu) 5mM, (○) glu + glicina 50mM, (▽) glu + serina 50mM, (△) glu + alanina 50mM. B. (●) glicina 50mM, (▼) serina 50mM y (▲) alanina 50mM.

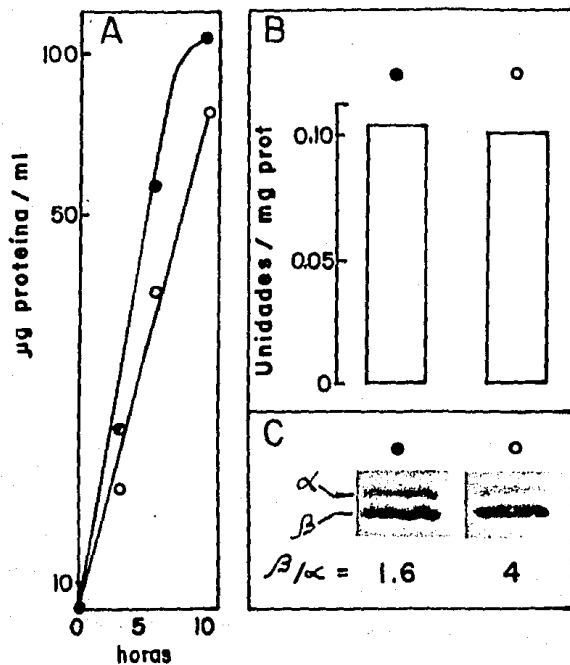


Fig.4 Crecimiento (A), actividad específica (B) y síntesis *de novo* de la GS (C) de la cepa silvestre de *Neurospora crassa*. B. Se determinó la actividad de sintetasa de la GS en extractos libres de células dializadas contra buffer de extracción. La actividad específica se expresa en unidades por mg de proteína del extracto. C. Fluorografía de la electroforesis en geles de acrilamida-SDS-urea a la que se sometieron los inmunoprecipitados de la GS de los extractos celulares radiactivos. Estos se obtuvieron marcando *in-vivo* a los cultivos dándoles un pulso de 1 hr con leu-³H. (ver material y métodos). Se indica la relación β/α obtenida al cuantificar el área de barrido a 600 nm de absorbancia. (o) NH₄⁺ 25 mM y (●) NH₄⁺ + glicina 50 mM como fuentes de nitrógeno.

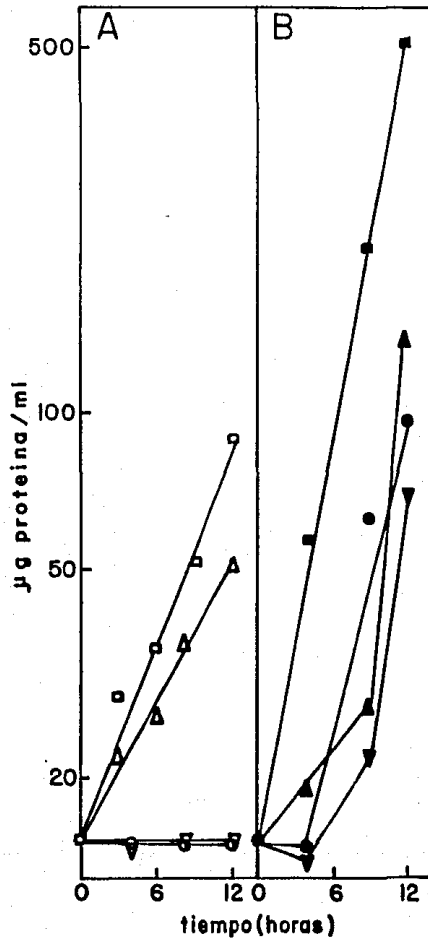


Fig.5 Crecimiento de la cepa GS[⊖] de *Neurospora crassa* en diferentes aminoácidos como fuentes de nitrógeno. A. (□) glutamato (glu) 5mM, (○) glu + glicina 50mM, (▽) glu + serina 50mM, (△) glu + alanina 50mM, B. (■) glutamina (gln) 5mM, (●) gln + glicina 50mM, (▼) gln + serina 50mM, (▲) gln + alanina 50mM.

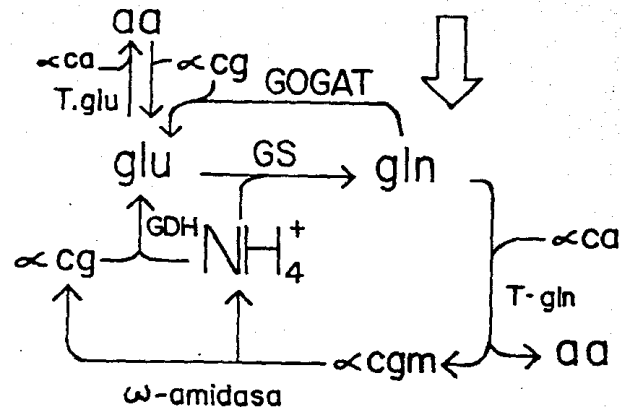
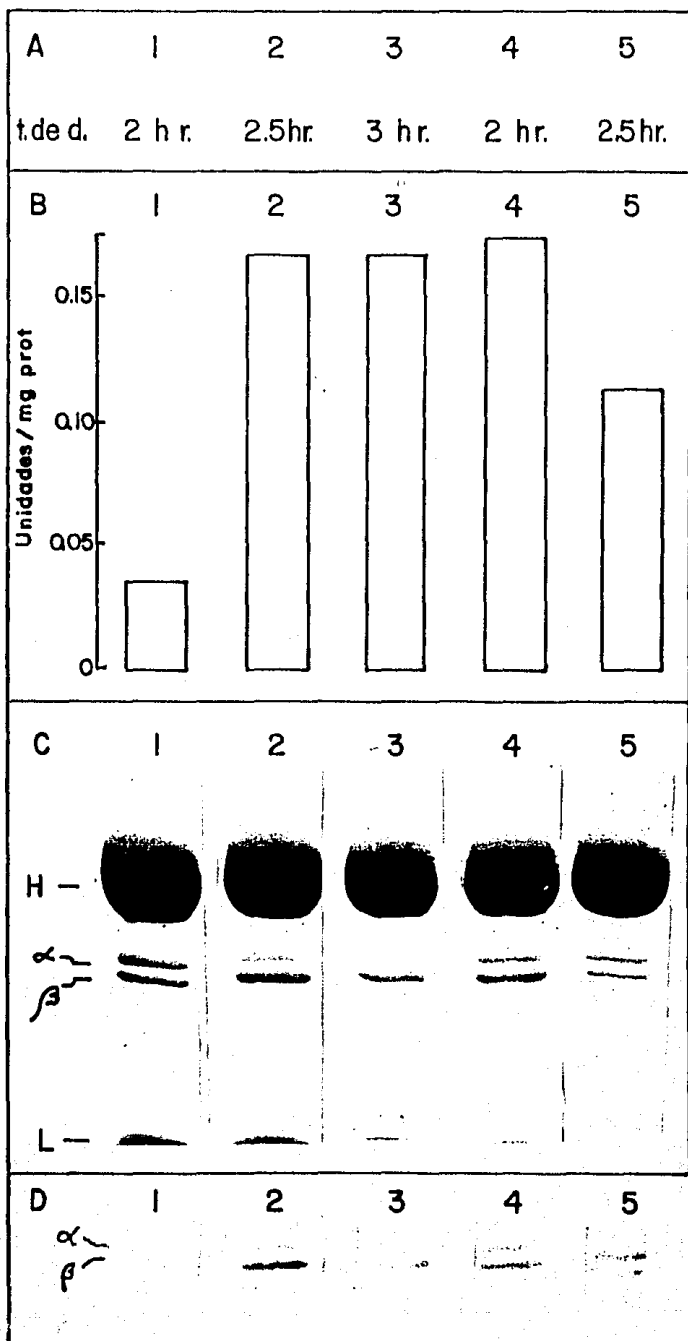


Fig.6 Ciclo de la glutamina. glu:glutamato, gln:glutamina, aa:aminoácidos αcg: acetoglutarato, αca: acetoácido, αcgm: acetoglutaramato, T-gln:transaminasa de glutamina, T-glu:transaminasa de glutamato.

Fig.7 Crecimiento (A), actividad específica (B), concentración (C) y síntesis *de novo* (D) de la cepa silvestre de *Neurospora crassa* crecida en diferentes aminoácidos como fuente de nitrógeno. A. t. de d. = tiempo de duplicación. B. Se determinó la actividad de sintetasa de la GS en extractos libres de células dializados contra buffer de extracción. La actividad específica se expresa en unidades por mg de proteína del extracto. C. Electroforesis en geles de acrilamida-SDS-urea de los inmunoprecipitados de la GS obtenida de extractos libres de células marcadas radiactivamente *in-vivo* al darles a los cultivos un pulso de 1 hr con una mezcla de aminoácidos tritiada (ver Material y Métodos). Se muestra la tinción del gel con azul de Coomassie, indicando la posición donde migra la cadena pesada de las IgG(H), los monómeros de la GS (α y β) y la cadena ligera de las IgG(L). D. Fluorografía de los geles que se muestran en B. y relación β/α obtenida del análisis densitométrico a 600 nm. fuentes de nitrógeno: 1. glutamina (gln) 5mM, 2.gln + glicina 50mM, 3.gln + serina - 50mM, 4.gln + alanina 50mM, 5.gln + leucina 50 mM, como fuente de nitrógeno.



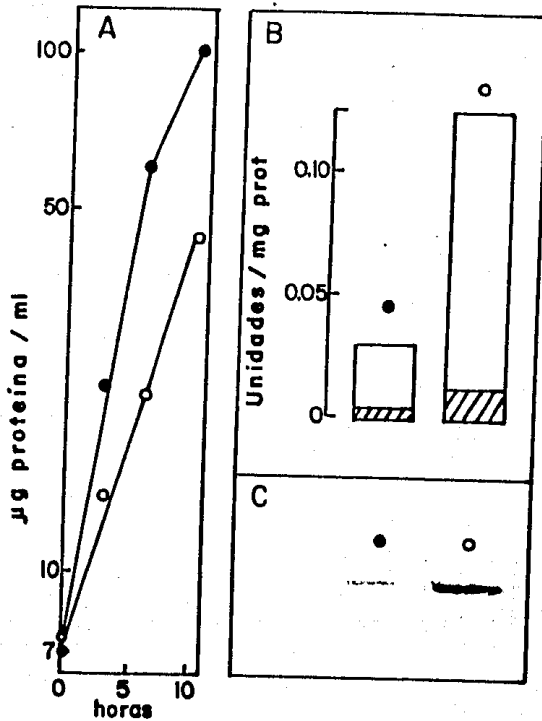


Fig.8 Crecimiento (A) actividad específica (B) y síntesis *de novo* de la GS (C) de la cepa GS⁻ de *Neurospora crassa*-B. Se determinó la actividad de sintetasa (□) y de transferasa (▨) de la GS a las 10 hrs de crecimiento de los cultivos. La actividad específica se expresa en unidades por mg de proteína del cultivo. C. Fluorografía de la electroforesis en geles de acrilamida-SDS-urea a la que se sometieron los inmunoprecipitados de la GS de los extractos celulares marcados radiactivamente *in vivo* con un pulso de 1 hr con una mezcla de aminoácidos tritiados (ver Material y Métodos). Fuentes de Nitrógeno: (●) glutamina (gln) 5 mM, (○) gln + glicina 50 mM.

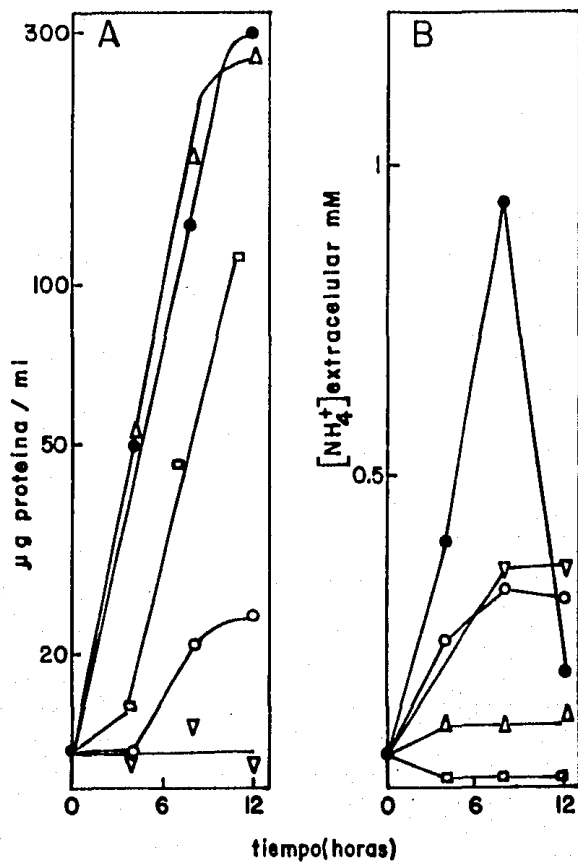


Fig.9 Crecimiento (A) y concentración de amonio extracelular (B) de la cepa GDH^o de *Neurospora crassa* en diferentes aminoácidos como fuentes de nitrógeno. (●) glutamina (gln) 5mM (○) gln + glicina 50 mM, (▽) gln + serina 50mM, (△) - gln + alanina 50mM, (□) gln + leucina 50mM.

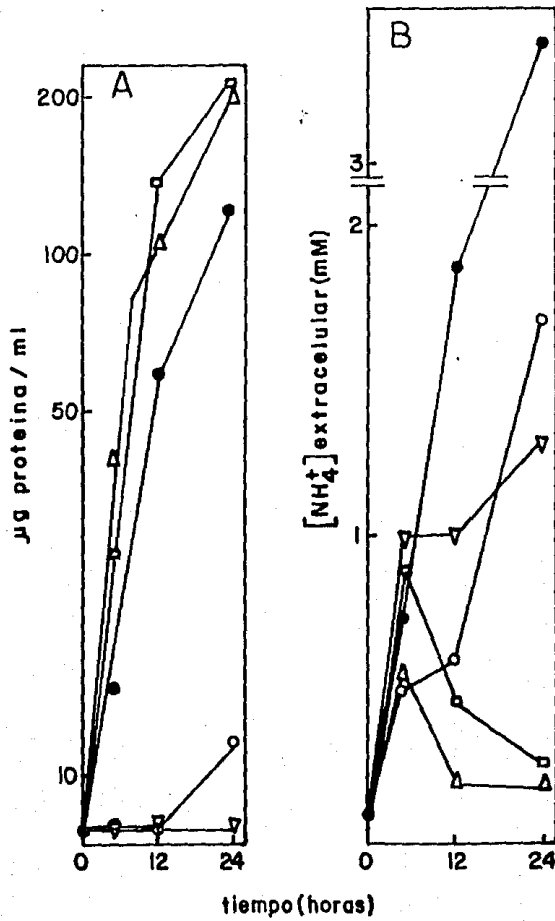


Fig.10 Crecimiento (A) y concentración de amonio extracelular (B) de la cepa GDH⁻, GOGAT⁻ de *Neurospora crassa* en diferentes aminoácidos -- como fuentes de nitrógeno. Los símbolos usados son los mismos que los de la figura 9.

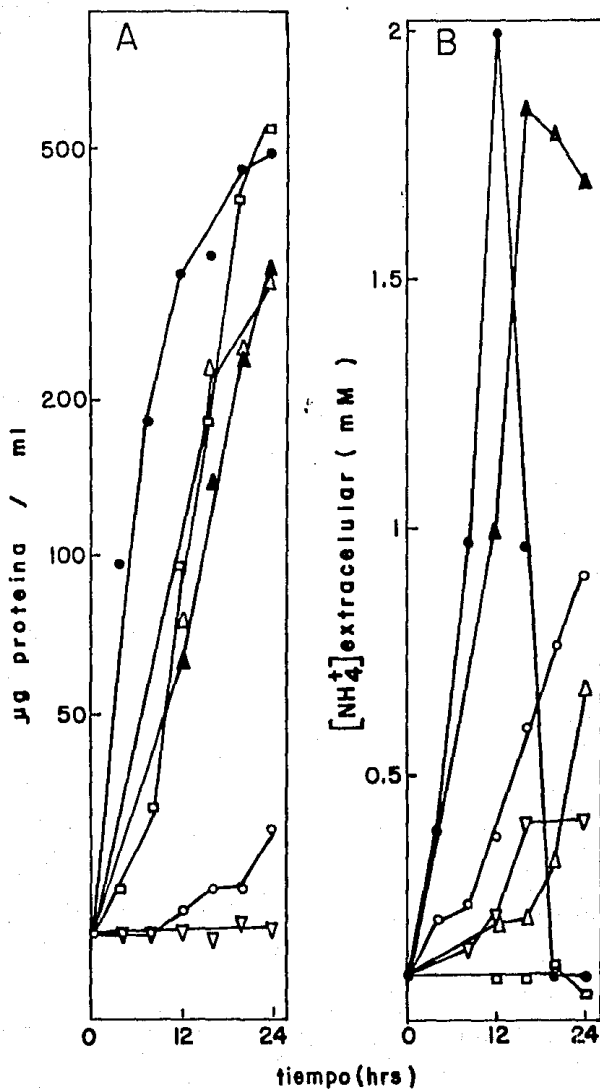


Fig.11 Crecimiento (A) y concentración de amonio extracelular (B) de la cepa $\text{GDH}^{\ominus}, \text{GS}^{\ominus}$ de *Neurospora crassa* en diferentes aminoácidos como fuentes de nitrógeno. Los símbolos usados son los mismos que en la figura 9, (▲) glutamina (gln) 5mM, + ac. aminoisobutírico 20mM.

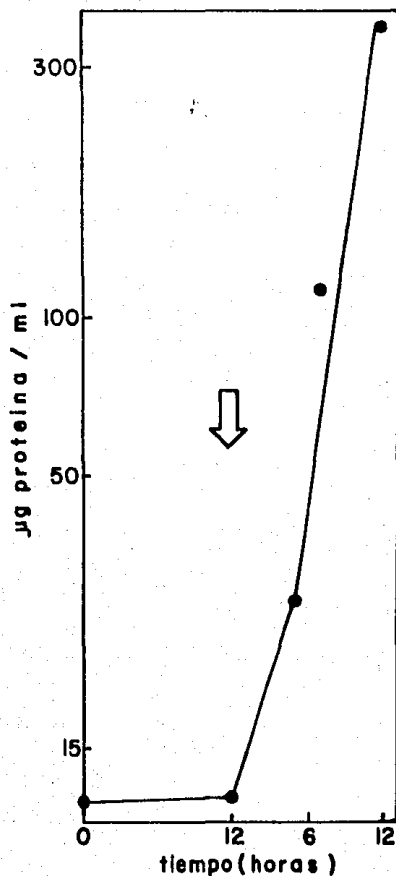


Fig.12 La cepa GDH⁻, GS⁻ de *Neurospora crassa* se incubó por 12 hrs en glutamina 5mM + glicina 50mM como fuentes de nitrógeno. Al tiempo indicado (↓) el cultivo se cambió a un medio con glutamina 4.09 mM + NH₄ Cl 0.37 mM como fuente de nitrógeno.



Fig.13 Pozas intracelulares de glutamato (■) y glutamina (□) de la cepa GDH^o, GS^o de *Neurospora crassa* a las 12 hrs de crecimiento en las fuentes de nitrógeno indicadas.

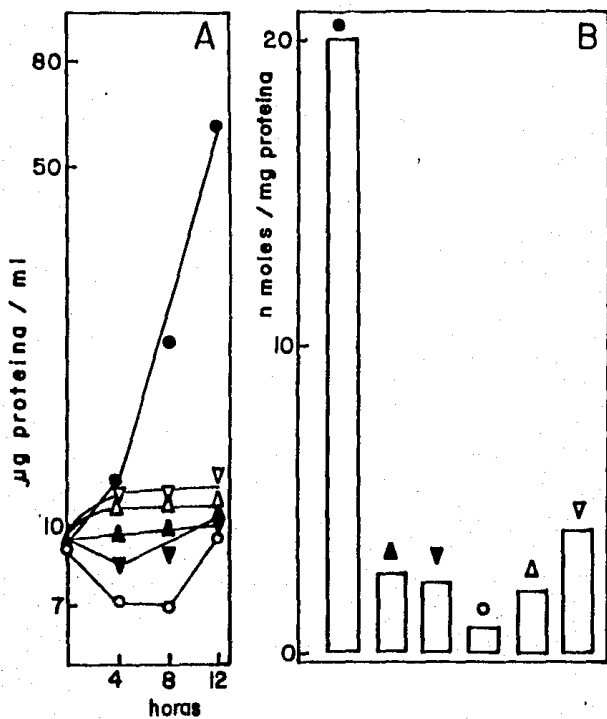


Fig.14 Crecimiento (A) y pozas intracelulares de α cetoglutarato (B) de la cepa GDH⁺ de *Neurospora crassa* en diferentes fuentes de nitrógeno. (●) NH₄⁺ 25mM, (▲) NH₄⁺ + glicina - 50mM, (▼) NH₄⁺ + serina 50mM, (○) NH₄⁺ + metionina sulfóximina 3mM, (△) glicina 50mM, (▽) serina 50mM.

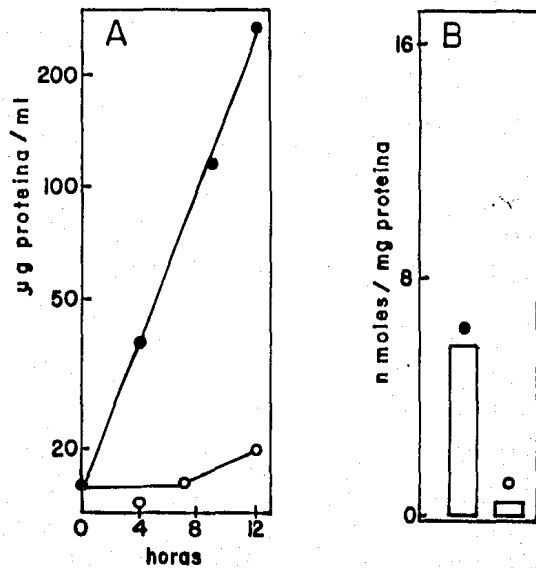


Fig.15 Crecimiento (A) y pozas intracelulares de acetoglutarato (B) de la cepa silvestre de *Neurospora crassa* en (●) NH_4^+ 25 mM y (○) NH_4^+ + metionina sulfóximina 3 mM como fuentes de nitrógeno.

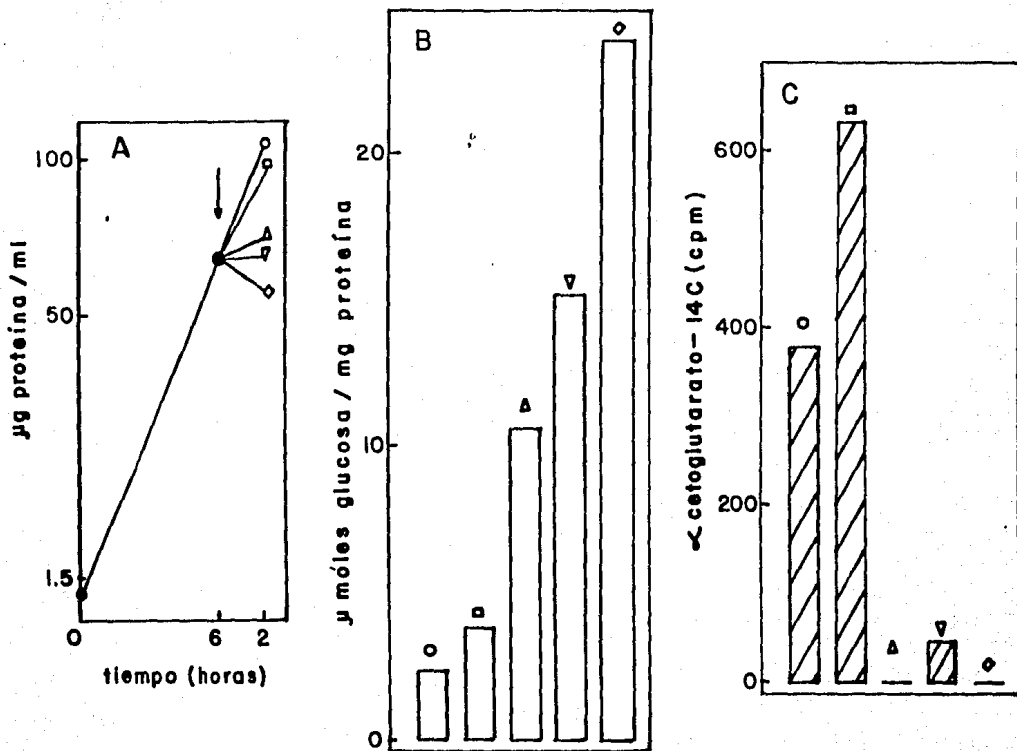


Fig.16 Crecimiento (A), pozas intracelulares de glucosa (B) y acetoglutarato sintetizado *de novo* de la cepa GDH (c). A. La cepa GDH se creció durante 6 hrs en (●) alanina 50mM como fuente de nitrógeno al tiempo indicado (↓) el cultivo se cambió a diferentes medios con: (O) NH₄⁺ + 25mM, (□) NH₄⁺ + alanina 50mM, (Δ) NH₄⁺ + glicina 50mM, (∇) NH₄⁺ + serina 50mM, (◇) NH₄⁺ + MS 3mM, como fuente de nitrógeno. B. Las pozas intracelulares de glucosa se determinaron 2 hrs después del cambio de medio (ver Material y Métodos) C. Los cultivos recibieron un pulso de 15 minutos con sacarosa - ¹⁴C, para determinar la radiactividad incorporada en acetoglutarato a las 2 hrs después del cambio de medios. El acetoglutarato - ¹⁴C se separó en un analizador de aminoácidos después de convertido a glutamato con la GDH Bovina (ver Material y Métodos).

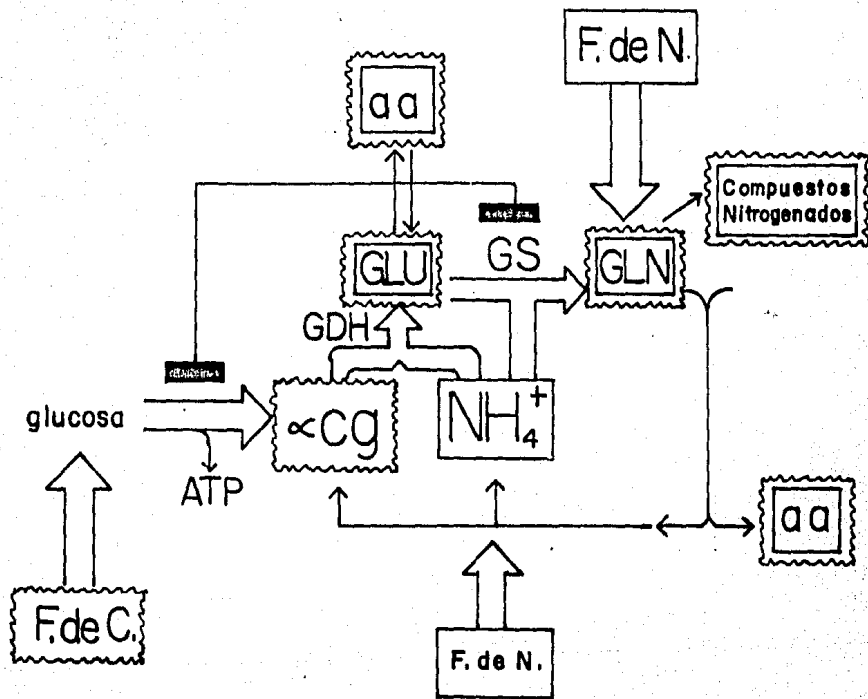


Fig.17 Esquema sobre los flujos de carbono y de nitrógeno en *Neurospora crassa*. F. de C.: Fuente de carbono, F. de N.: fuente de nitrógeno, αcg: acetoglutarato, glu: glutamato, gln: glutamina, aa: aminoácidos.

AGRADECIMIENTOS

A Rafael Palacios, por el gran estímulo y enseñanzas que siempre me ha brindado y que han sido fundamentales para mi formación personal y académica; por su amistad.

A Jaime Martuscelli por su asesoría a lo largo de mi maestría.

A Carlos Huitrón, Miguel Lara y Ricardo Tapia por la revisión, discusión y valiosos comentarios sobre este trabajo.

A mis compañeras Amazonas, con mucho cariño, por todo lo que hemos vivido juntas.

Al grupo: Jaime, Alicia, Miguel, Mero, Alberto, Susi, Jorge, Yolanda, Josefina, et al por las discusiones, los experimentos, los seminarios, los congresos en fin por el excelente ambiente académico y gran compañerismo que hemos compartido.

A Josefina Guzmán, Miguel Campomanes y Marta Albores por su colaboración en la purificación de las enzimas que aquí se reportan.

A Lorenzo Segovia, Alberto Lomnitz y Mario Lagunez por su ayuda con la computadora que me permitió escribir e imprimir esta tesis.