

R.14246

TD
417



Aislamiento y caracterización de mutaciones del gen *HOM3* que alteran la regulación de la síntesis de treonina y metionina en *Saccharomyces cerevisiae*

Trabajo realizado en el Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctor en Biología Molecular y Celular por el Licenciado

Miguel Arévalo Rodríguez

Sevilla, Octubre de 1996

Directora

Dra. Isabel López Calderón
Profesora titular de genética

TD

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Depositado en Dep. Genética
de la FCC. Biología
de esta Universidad desde el día 14/10
hasta el día 31/10/96
Sevilla de de 19
EL DIRECTOR DE

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 1 número 9 del libro
correspondiente.

Sevilla, 11-10-96

El Jefe del Negociado de Tesis.

Caraceni.

A mi familia

INDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUCCION | 1 |
| Producción de aminoácidos por microorganismos | 3 |
| Biosíntesis de los aminoácidos derivados del aspartato | 5 |
| Estructura y función de las aspartoquinasas | 8 |
| Regiones de homología entre las aspartoquinasas | 10 |
| Síntesis de treonina en <i>S. cerevisiae</i> | 12 |
| Catabolismo de la treonina en <i>S. cerevisiae</i> | 12 |
| MATERIALES | 15 |
| 1. MICROORGANISMOS | 15 |
| 1.1. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> | 15 |
| 1.2. Estirpe de <i>E. coli</i> | 16 |
| 2. PLASMIDOS | 17 |
| 2.1. Plásmidos no originales utilizados en esta Tesis | 17 |
| 2.2. Plásmidos originales de este trabajo | 19 |
| 3. OLIGONUCLEOTIDOS | 21 |
| 4. MEDIOS DE CULTIVO USUALES | 21 |
| Para levaduras | 21 |
| 4.1. Medio mínimo (SD) | 21 |
| 4.2. Medio mínimo con prolina como fuente de nitrógeno (SDpro) | 22 |
| 4.3. Medio mínimo con serina como fuente de nitrógeno (SDser) | 22 |
| 4.4. Medio mínimo con treonina como fuente de nitrógeno (SDthr) | 22 |
| 4.5. Medio nutritivo (YPD) | 22 |
| Para bacterias | 22 |
| 4.6. Medio nutritivo LB | 22 |
| 5. PRODUCTOS QUIMICOS | 23 |
| METODOS | 24 |
| 1. Estimación de biomasa | 24 |
| 2. Determinación de la concentración de proteínas | 26 |
| 3. Purificación de la aspartoquinasa | 26 |
| 4. Ensayo de la actividad aspartoquinasa | 27 |
| 5. Inducción del promotor de CHA1 | 29 |

| | |
|--|-----|
| 6. Cuantificación de aminoácidos | 30 |
| 7. Determinación de la excreción de treonina | 31 |
| 8. Transporte de L-treonina y L-citrulina | 31 |
| 9. Transformación de <i>E. coli</i> | 32 |
| 10. Transformación de <i>S. cerevisiae</i> | 33 |
| 11. Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> | 34 |
| 12. Extracción de ADN total de <i>S. cerevisiae</i> | 35 |
| 13. Purificación y concentración de ADN | 36 |
| 13.1. Tratamiento con fenol | 36 |
| 13.2. Precipitación con etanol | 36 |
| 14. Cuantificación de ADN | 36 |
| 14.1. Espectrofotometría | 36 |
| 14.2. Tinción con bromuro de etidio | 36 |
| 15. Manipulación enzimática del ADN | 36 |
| 15.1. Digestión con enzimas de restricción | 37 |
| 15.2. Tratamiento con el fragmento Klenow de la polimerasa de ADN I de <i>E. coli</i> | 37 |
| 15.3. Tratamiento con la polimerasa de ADN del fago T4 | 38 |
| 15.4. Tratamiento con ADN ligasa del fago T4 | 38 |
| 15.5 Tratamiento con exonucleasa I de <i>E. coli</i> | 38 |
| 16. Secuenciación de ADN | 39 |
| 16.1 Procedimiento manual | 39 |
| 16.2 Procedimiento automático | 39 |
| 17. Electroforesis convencional de ADN en gel de agarosa | 40 |
| 18. Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa | 41 |
| 19. Obtención de diploides de <i>S. cerevisiae</i> | 42 |
| 19.1. Selección de los diploides por complementación de auxotrofías | 42 |
| 19.2. Micromanipulación de cigotos | 42. |
| 19.3. Selección de los diploides por tamaño de colonia | 42 |
| 20. Esporulación y análisis de tétradas | 42 |
| 21. Determinación del sexo | 43 |
| 22. Mutagénesis con EMS | 43 |
| 23. Selección de mutantes <i>ura3</i> por resistencia a ácido 5-fluoro-orótico (5-FOA) | 44 |
| 24. Construcción de la cepa R7.C1.cha1 | 45 |
| 25. Construcción de la cepa HT1 | 45 |
| 26. Clonación de los alelos HOM3 | 47 |
| 27. Mutagénesis dirigida de HOM3 mediante PCR | 47 |
| 27.1. Delección de la región determinante del motivo KFGG de la aspartoquinasa | 47 |
| 27.2. Mutagénesis al azar de la región determinante del motivo KFGG | 50 |
| RESULTADOS | 53 |

| | |
|---|----|
| CAPITULO 1 | 53 |
| Aislamiento y caracterización de mutantes superproductores de treonina por supresión fenotípica de una mutación <i>ilv1</i> | 53 |
| Aislamiento de los mutantes | 54 |
| Análisis de las cepas mutantes R2 y R3 | 55 |
| Caracterización fisiológica de la cepa R7 | 56 |
| Análisis de la actividad aspartoquinasa de la cepa R7 | 57 |
| Análisis genético de la cepa R7 | 57 |
| Clonación y secuenciación del alelo HOM3-R7 | 58 |
| Papel de CHA1 en el fenotipo <i>Ile</i> ⁺ de la cepa R7 | 59 |
| Inducción de la expresión de CHA1 en R7 | 59 |
| Interrupción de CHA1 en la cepa R7 | 60 |
| Acumulación de treonina en cepas con diversas combinaciones de mutaciones y alelos clonados | 61 |
| CAPITULO 2 | 62 |
| Aislamiento de mutantes hiperregulados por treonina | 62 |
| Aislamiento de mutantes sensibles a treonina a partir de la cepa S288C | 64 |
| Análisis genético de la sensibilidad a treonina en la cepa TS4 | 65 |
| Efecto de la interrupción del gen CHA1 sobre la sensibilidad a treonina de la cepa TS4 | 66 |
| Análisis genético de la sensibilidad a treonina en el mutante TS1 | 66 |
| Análisis genético de la sensibilidad a treonina en los mutantes SG | 67 |
| Efectos de la treonina y la metionina sobre el crecimiento en medio líquido de las cepas SG | 69 |
| Análisis bioquímico de los mutantes SG45, SG46 y SG49 | 69 |
| Clonación de los alelos <i>hom3</i> presentes en las cepas SG45, SG46 Y SG49 | 70 |
| Expresión de los alelos <i>hom3-S</i> clonados en un fondo genético <i>hom3</i> | 70 |
| Efecto del incremento en la dosis génica de los alelos <i>hom3-S</i> sobre la sensibilidad a treonina. | 71 |
| Caracterización de la actividad aspartoquinasa en cepas con alto número de copias de los alelos <i>hom3-S</i> | 72 |
| Determinación de la secuencia de ADN de los alelos <i>hom3-S</i> | 73 |
| Mutagénesis de la región KFGG de la aspartoquinasa | 74 |
| (a) Deleción por PCR de la región KFGG | 74 |
| (b) Mutagénesis al azar de la región KFGG | 76 |
| Análisis de los transformantes de levadura con los alelos mutantes | 76 |
| Análisis de la secuencia de algunos de los alelos obtenidos por mutagénesis | 77 |
| DISCUSION | 78 |
| Aislamiento y caracterización de mutantes superproductores de treonina por supresión fenotípica de una mutación <i>ilv1</i> | 78 |
| Análisis de las cepas mutantes R2 y R3 | 79 |
| Clonación y secuenciación del alelo HOM3-R7 | 80 |

| | |
|---|----|
| Papel de CHA1 en la supresión de <i>ilv1</i> | 81 |
| Acumulación de treonina en cepas con diversas combinaciones de mutaciones y alelos clonados | 81 |
| Aislamiento y caracterización de mutantes sensibles a treonina a partir de la cepa S288C | 83 |
| Análisis del mutante TS1 | 83 |
| Análisis de los mutantes SG36, SG37, SG44, SG45, SG46 Y SG49 | 83 |
| CONCLUSIONES | 87 |
| BIBLIOGRAFIA | 89 |

INTRODUCCION

La biotecnología, definida en sentido amplio como la obtención de productos a partir de materias primas con la ayuda de seres vivos, constituye una de las actividades más antiguas del hombre, que la ha aplicado eficientemente a la transformación y obtención de alimentos. Más formalmente, la biotecnología podría definirse como "la aplicación de principios científicos y de ingeniería al procesamiento de materias utilizando agentes biológicos, con el fin de producir bienes y servicios". En este contexto, la actividad biotecnológica está indisolublemente asociada a la utilización de microorganismos. La utilidad de los mismos radica, principalmente, en su extraordinaria versatilidad metabólica, fruto de su adaptación a los ecosistemas más diversos, que a menudo incluyen condiciones físico-químicas extremas para el resto de los seres vivos. Esta multiplicidad biológica permite el empleo de los microorganismos en la producción de toda clase de compuestos de interés comercial a partir de una inmensa variedad de materias primas, así como la transformación o degradación de compuestos contaminantes.

En general, los microorganismos incorporan del medio los nutrientes necesarios para obtener energía y sintetizar metabolitos primarios, tales como aminoácidos, vitaminas y nucleótidos, entre otros, y con ellos producen todos los componentes biológicos, como las proteínas, los ácidos nucleicos y las estructuras celulares. En los microorganismos, las rutas metabólicas están reguladas según un principio de economía por el que se trata de evitar que los metabolitos primarios se produzcan en una cantidad que exceda a aquella necesaria para el crecimiento celular. Los sistemas de control más importantes con los que cuenta la célula microbiana son los denominados de retroalimentación negativa ; éstos son mecanismos que permiten regular el flujo metabólico, en pasos catalíticos concretos, modulando la expresión de la actividad de la enzima correspondiente, por medio de la acción específica del producto final de la ruta biosintética. La expresión de la actividad enzimática puede regularse, principalmente, a través de la inhibición de la actividad catalítica y por medio del control de la síntesis de la propia enzima.

La producción fermentativa a escala industrial exige, en numerosos casos, modificar el metabolismo microbiano de forma que el rendimiento sea máximo. Para conseguir aumentar la producción de un metabolito de interés es necesaria la identificación de los puntos principales de control cinético de la ruta biosintética correspondiente, y el diseño de estrategias para su modificación o eliminación. En este contexto resulta fundamental

la aplicación de los principios de la teoría de control de flujos metabólicos.

En líneas generales, se buscará eliminar o modificar la regulación de la síntesis del producto de interés, destruyendo los sistemas de retroalimentación negativa. El flujo metabólico en los pasos limitantes de la ruta puede incrementarse amplificando los genes de las enzimas correspondientes, o bien la expresión de aquellos, y en las rutas ramificadas, que compiten por un precursor común, se intentará redirigir el flujo hacia la rama específica del producto buscado, bloqueando las demás. Al mismo tiempo, se intentará cortar las posibles rutas de degradación del compuesto, y se tratará de mejorar la capacidad celular de asimilación de nutrientes del medio de cultivo, todo ello encaminado a optimizar el proceso de producción.

La comprensión de la mecánica regulatoria, y la posterior modificación de la misma mediante el empleo de técnicas de ingeniería genética (entre otras) cobran, por tanto, una importancia fundamental en el desarrollo de la industria biotecnológica.

Producción de aminoácidos por microorganismos

Los aminoácidos se usan como condimento y aditivo alimentario y en la elaboración de piensos para animales. También constituyen el punto de partida en la síntesis de edulcorantes artificiales, medicamentos y otras sustancias de aplicación diversa.

Los aminoácidos pueden obtenerse mediante diferentes procesos, como son la extracción a partir de hidrolizados de proteínas, la síntesis química, la síntesis enzimática o la fermentación directa de sustratos por microorganismos. La utilización de uno u otro método para la obtención de un aminoácido concreto depende principalmente de su rentabilidad. Así, L-cisteína, L-cistina, L-leucina, L-asparaguina y L-tirosina se extraen de hidrolizados de proteínas; D,L-alanina, D,L-metionina, glicina y D,L-triptófano se producen mayoritariamente mediante síntesis química (Crueger y Crueger, 1989). Se han desarrollado procesos fermentativos industriales para obtener todos los aminoácidos excepto glicina, L-cisteína y L-cistina, pero no todos ellos resultan todavía comercialmente rentables. En algunos de estos procesos (como, p. ej., en la fabricación de L-prolina o L-treonina) se utilizan organismos completos para transformar diferentes sustratos; en otros, se utilizan enzimas o células inmovilizadas, como en caso de la L-fenilalanina que se obtiene a partir

de N-acetil-D,L-fenilalanina sintetizada químicamente, utilizando una deshidrogenasa de *Bacillus megaterium* (Araki, 1990; Crueger y Crueger, 1989). Puede decirse que los procesos fermentativos son potencialmente competitivos frente a la síntesis química cuando los llevan a cabo bacterias y, en menor grado, cuando se utilizan eucariotas unicelulares. Las bacterias que se usan más frecuentemente para la producción de aminoácidos son *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* y los géneros *Corynebacterium* y *Brevibacterium* (Niederberger, 1989; Aida, 1986). Entre los microorganismos eucarióticos, se utilizan los del género *Hansenula*, *Candida* y la levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae* (Niederberger, 1989).

Los microorganismos procarióticos son, sin duda, mejores que los eucarióticos para la obtención de aminoácidos (Niederberger, 1989). Sin embargo, en el caso de los aminoácidos utilizados como suplemento nutricional, una alternativa a la adición de aminoácidos purificados es, directamente, la utilización de biomasa de microorganismos que, por definición, es rica en aminoácidos. Desafortunadamente, en alimentación no se suele utilizar biomasa de bacterias, entre otros motivos, porque provoca un rechazo social. En este sentido, las levaduras tienen la ventaja de que son utilizadas habitualmente en la industria alimentaria, y que en consecuencia su consumo es ampliamente aceptado; de hecho, la levadura de panadería constituye alrededor del 5% del volumen de pan. Además, pueden obtenerse grandes cantidades de levadura como subproducto de industrias dedicadas a la fabricación de cerveza u otras bebidas alcohólicas, o directamente, cultivándolas en metanol o melazas de caña o remolacha, productos de desecho de las industrias azucareras (Spencer y Spencer, 1983). Lamentablemente, las levaduras son relativamente pobres en aminoácidos esenciales, así que resulta interesante la modificación genética de cepas de levadura con el fin de aumentar su contenido en aminoácidos de modo que puedan constituir la base para obtener biomasa enriquecida en aminoácidos esenciales en la dieta.

La treonina es un aminoácido esencial, cuya demanda es, actualmente, muy superior a su producción. El grupo dentro del cual se ha realizado este trabajo se ha propuesto la mejora de cepas de levaduras para superproducir treonina y el estudio de la regulación de su síntesis en estos microorganismos.

Biosíntesis de los aminoácidos derivados del aspartato

En las bacterias y las plantas, a partir del aspartato se sintetizan los aminoácidos lisina, treonina y metionina; en *Saccharomyces cerevisiae*, al igual que en otros hongos, sólo los dos últimos aminoácidos derivan del aspartato, ya que la lisina se sintetiza a partir del glutamato por una vía totalmente independiente (Figura 1.1).

El primer paso de la denominada ruta del aspartato, catalizado por la aspartoquinasa (EC 2.7.2.4), consiste en la activación del aspartato con ATP para dar lugar al aspartil-fosfato. La aspartato semialdehido deshidrogenasa (EC 1.2.1.11) cataliza el segundo paso, consistente en la reducción del aspartil-fosfato a aspartato-semialdehido. En las bacterias y las plantas verdes, la ruta se bifurca a partir del aspartato-semialdehido, siendo éste sustrato, por un lado, de la dihidrodipicolinato sintasa que cataliza la síntesis de dihidrodipicolinato, precursor de la lisina, y por otro, de la homoserina deshidrogenasa (EC 1.1.1.3), que cataliza la formación de homoserina, intermediario común en la síntesis de metionina y treonina; este último aminoácido es, a su vez, precursor de la isoleucina. Para cada organismo, la regulación del flujo metabólico a través de esta ruta se ha adaptado a cada fisiología concreta para satisfacer, de una forma equilibrada, la demanda de cada uno de los productos finales. En todos los casos, sin embargo, se ha observado una tendencia a controlar la ruta limitando el flujo a través del primer paso común de la misma, principalmente mediante inhibición de la actividad aspartoquinasa. Algunas bacterias parecen haber solucionado el problema de la regulación diferencial utilizando distintas aspartoquinasas, que se inhiben de forma diferente por los productos finales. Así, en *E. coli* K-12 se han podido identificar tres isoenzimas distintas, denominadas aspartoquinasa-homoserina deshidrogenasa I (AK-HD I), aspartoquinasa-homoserina deshidrogenasa II (AK-HD II) y aspartoquinasa III (AKIII) (ver la revisión de Patte, 1996). Cada una de estas proteínas exhibe una regulación diferente; de este modo, las dos actividades de la enzima bifuncional AK-HD I se inhiben por treonina y su expresión se reprime de manera bivalente por treonina e isoleucina. Las actividades de la AK-HD II, por el contrario, se reprimen por metionina pero no se inhiben por ninguno de estos aminoácidos ni tampoco por lisina, la cual reprime e inhibe a la AKIII. La presencia de estas tres enzimas y su regulación configuran un sistema de control metabólico que asegura un aporte suficiente de treonina, lisina y metionina.

Es habitual seleccionar mutantes superproductores de aminoácidos por su resistencia a análogos tóxicos de los mismos. En muchos casos, el

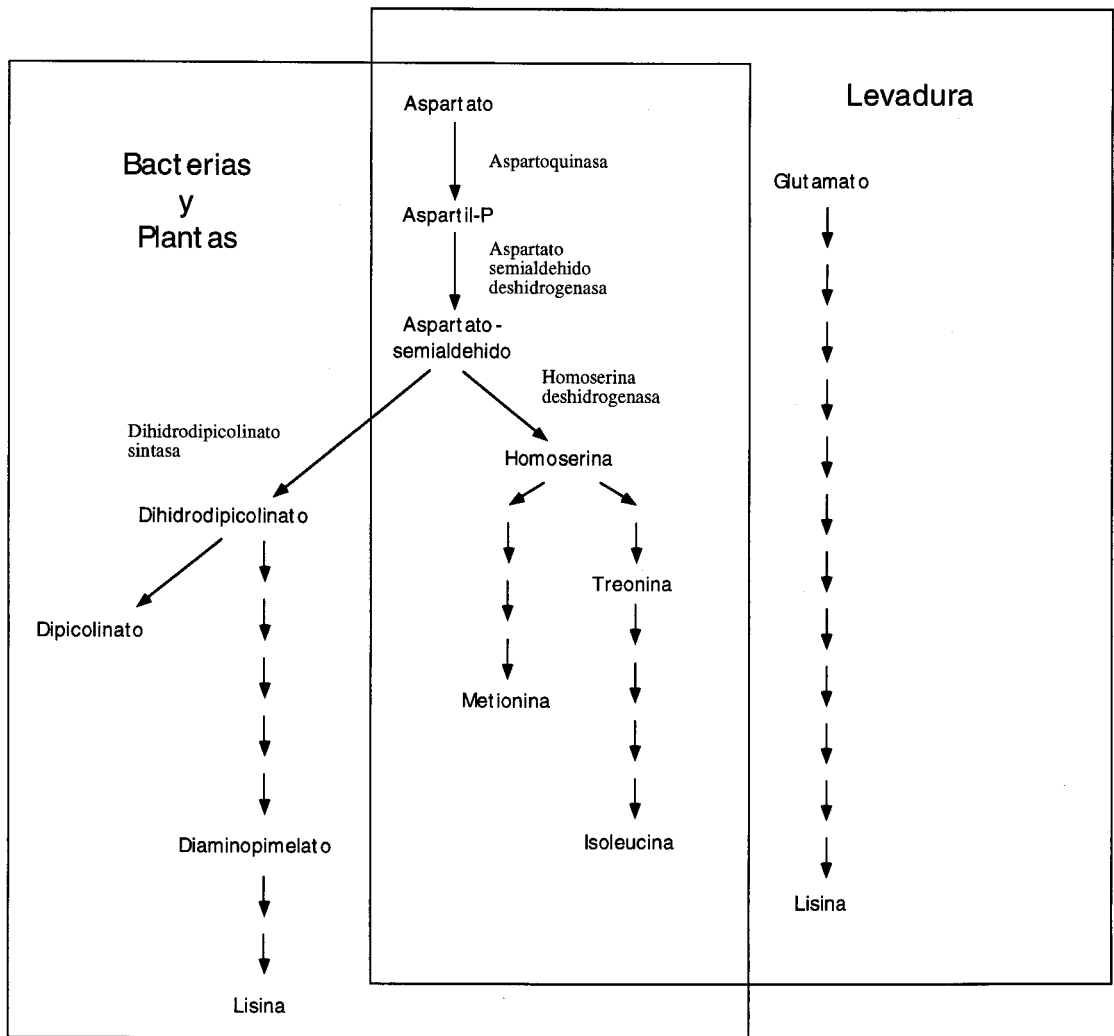


Figura 1.1. Ruta de biosíntesis de los aminoácidos derivados del aspartato.

análogo mimetiza el efecto inhibitorio del aminoácido, provocando una reducción del flujo biosintético que resulta fatal para la célula. La resistencia al análogo puede, pues, ser la consecuencia de una mutación en el gen responsable de la/s enzima/s que controlan el flujo de metabolitos a través de la ruta, que haga perder a esta última la regulación por retroinhibición. Como consecuencia, la ruta quedará descontrolada.

Por resistencia frente a análogos tóxicos de la treonina (β -hidroxinorvalina) o de la lisina (S-aminoetil cisteína) se han podido aislar mutantes en la AK-HDI y en la AKIII, que superproducen, respectiva - y principalmente, treonina o lisina. Este hecho sugiere que el flujo metabólico podría estar, de alguna manera, canalizado dentro de cada ruta específica, lo cual supondría un sistema adicional de control. Un sistema de regulación similar se ha encontrado en *Serratia marcescens* para la que se han descrito tres enzimas similares a las de *E. coli* (Komatsubara, 1994).

La ruta biosintética específica de la lisina también produce metabolitos intermediarios como el diaminopimelato, de importancia fundamental debido a que interviene en la síntesis del peptidoglucano, constituyente de la pared celular bacteriana. En bacterias Gram-positivas, donde el peptidoglucano representa un alto porcentaje de la pared, el aporte de diaminopimelato no puede verse limitado por el efecto inhibitorio de la treonina y la lisina sobre las aspartoquinasas. Esta circunstancia aporta un elemento de complejidad que *Bacillus subtilis* parece haber resuelto introduciendo un nuevo sistema de control. Al igual que *E. coli*, *B. subtilis* posee tres aspartoquinasas con distintas propiedades alostéricas, denominadas AKI, AKII y AKIII. Mientras que las AKII y AKIII se inhiben por lisina, y por lisina y treonina, respectivamente, la AKI se inhibe únicamente por diaminopimelato (Zhanget al, 1990). Gracias este sistema *B. subtilis* puede cubrir su demanda de diaminopimelato, así como de dipicolinato, el cual participa en la formación de la espora.

En las especies del género *Corynebacterium*, la regulación de la ruta del aspartato no se basa, aparentemente, en el funcionamiento paralelo de varias aspartoquinasas, aunque el flujo acaba siendo controlado en este paso; la actividad específica de la homoserina deshidrogenasa, bastante superior a la de la dihidrodipicolinato sintasa, determina que el flujo de aspartato semialdehído se desvíe de forma preferencial hacia la síntesis de treonina y metionina (Miyajima et al., 1968). El incremento en la concentración de metionina reprime la expresión de la homoserina

deshidrogenasa (Follettie *et al.*, 1988), a la vez que la treonina inhibe su actividad, redirigiéndose el flujo de aspartato semialdehído hacia la síntesis de lisina (Miyajima *et al.*, 1968); la ruta acaba siendo controlada por medio de la inhibición concertada de la treonina y la lisina sobre la aspartoquinasa (Kase y Nakayama, 1974; Shiio y Miyajima, 1969).

En plantas también se han caracterizado distintas aspartoquinasas y homoserina deshidrogenasas distinguibles entre sí por su sensibilidad a retroinhibición por los productos finales de la ruta del aspartato (Bryan, 1980). En *Daucus carota* se han identificado *in vitro* dos formas de homoserina deshidrogenasa, una de ellas sensible y la otra resistente a inhibición por treonina (Matthews *et al.*, 1989; Turano *et al.*, 1990), así como tres formas de aspartoquinasa; las AKI y AKII se inhiben fuertemente por lisina y treonina, respectivamente, mientras que la AKIII es parcialmente inhibible por ambos aminoácidos (Wilson *et al.*, 1991). Trabajos recientes han permitido el aislamiento de cDNAs correspondientes a formas de aspartoquinasa-homoserina deshidrogenasa, tanto en *Daucus carota* (Weisemann y Matthews, 1993), como en *Arabidopsis thaliana* (Ghislain *et al.*, 1994), y en *Zea mays* (Muelbahuer *et al.*, 1994). Las secuencias de aminoácidos deducidas para estas proteínas guardan una gran homología entre sí y con respecto a los productos bifuncionales correspondientes de *E.coli* y *S. marcescens*.

En *S. cerevisiae* se ha descrito una sola aspartoquinasa determinada por el gen *HOM3*. Este gen ha sido clonado por complementación de una mutación *hom3*, y secuenciado (Rafalski y Falco, 1988). La secuencia de aminoácidos de esta enzima, deducida de la de nucleótidos del gen *HOM3*, resulta ser homóloga a la de todas las aspartoquinasas identificadas hasta el momento. El hecho de que los mutantes *hom3* presenten auxotrofia para treonina y metionina y ausencia de actividad aspartoquinasa (de Robichon-Szulmajster *et al.*, 1966), sugiere que *HOM3* codifica para la única aspartoquinasa de *S. cerevisiae*; apoya esta hipótesis el hecho de que no haya aparecido ningún gen homólogo a *HOM3* en todo el genomio de la levadura, cuya secuenciación ha sido completada recientemente.

Resultados de de Robichon-Szulmajster y Corrivaux (1963, 1964) indican que la aspartato quinasa de levaduras se inhibe alostéricamente por treonina ($K_i=3\text{mM}$) y también por homoserina ($K_i=15\text{mM}$) y lisina ($K_i=15\text{mM}$) pero no por metionina. Otros autores (Stadman *et al.*, 1961; Ramos *et al.*, 1991) no han observado la inhibición por lisina.

La actividad aspartoquinasa de *S. cerevisiae* parece estar sometida a represión por treonina y, sorprendentemente, por lisina (de Robichon-Szulmajster y Corrivaux, 1963, 1964; de Robichon-Szulmajster *et al.*, 1966). La borrelidina, un inhibidor de la treonil ARNt sintetasa, desreprime la actividad aspartoquinasa (Nass y Hasenbank, 1970), lo cual sugiere la existencia de una regulación específica mediada por treonina, presumiblemente a través del treonil-ARNt. La región promotora de *HOM3* contiene la secuencia TGACTC, asociada al sistema de control general, si bien no se ha podido observar un incremento en la transcripción de *HOM3* como respuesta a una situación de "hambre" de los aminoácidos isoleucina y valina (Rafalski y Falco, 1988).

El papel de la aspartoquinasa en la regulación de la ruta del aspartato se manifiesta en el hecho de que su desensibilización a retroinhibición por los productos finales de la ruta se traduce, normalmente, en la superproducción de los mismos. En efecto, en *S. cerevisiae* se han aislado mutantes resistentes a β -hidroxinorvalina, un análogo tóxico de la treonina, que superproducen treonina (Ramos y Calderón, 1992); estos mutantes también superproducen homoserina pero no metionina, lo cual indica que la ruta específica de éste último aminoácido tiene, en la levadura, un sistema de regulación adicional. La presencia del gen *HOM3* silvestre en alto número de copias produce un incremento considerable en la producción de treonina, que se dispara cuando el amplificado es un alelo mutante que determina una aspartoquinasa resistente a retroinhibición (Farfán *et al.*, 1996).

Estructura y función de las aspartoquinasas

La AKI-HDI de *E. coli* ha sido estudiada en gran detalle, y constituye un modelo de proteína bifuncional. Para su estructura terciaria se ha propuesto un modelo triglobular consistente en dos dominios con actividades catalíticas diferentes, separados por otro dominio intermedio (Fazel *et al.*, 1983). El dominio con actividad aspartoquinasa se sitúa en el extremo N-terminal de la proteína, mientras que la actividad homoserina deshidrogenasa se ubica en el dominio del extremo C-terminal. El dominio intermedio está implicado en la asociación de cuatro polipéptidos para formar un homotetrámero que constituye la forma activa de la proteína (Veron *et al.*, 1985). Se postula que este producto bifuncional podría haberse originado durante la evolución a partir de la fusión de dos genes que determinaban enzimas monofuncionales (Sibilli *et al.*, 1981). El

mismo tipo de estructura terciaria triglobular se ha propuesto para la AKII-HDII de *E.coli* (Dautry-Varsat y Cohen, 1977), si bien la estructura cuaternaria de ésta es un homodímero (Dautry-Varsat *et al.*, 1977)

El mismo tipo de enzima bifuncional se ha encontrado en *S. marcescens*, con idénticas características y estructuras que la AKI-HDI de *E.coli* (Omori *et al.*, 1993), y también en *Haemophilus influenzae*, si bien en éste último la existencia de la enzima se ha inferido a partir de una secuencia cuyo hipotético producto presentaría una alta homología con las enzimas anteriormente citadas (Fleischmann *et al.*, 1995).

En plantas, las aspartoquinasa-homoserina deshidrogenasas cuyas secuencias han podido ser caracterizadas presentan una fuerte homología con sus equivalentes de bacterias, si bien presentan una región N-terminal adicional que parece implicada en el tránsito hacia el cloroplasto, orgánulo en el cual se localiza su actividad (Weisemann y Matthews, 1993; Ghislain *et al.*, 1994; Muelbahuer *et al.*, 1994). Se desconoce la estructura cuaternaria de estas enzimas.

La AKIII de *E.coli* guarda una estrecha homología con el dominio catalítico correspondiente de las AK-HS I y II de esta misma bacteria. La enzima purificada es un homodímero, aunque puede presentar diferentes estados de agregación; en presencia de lisina (el ligando que inhibe su actividad) y alta fuerza iónica, la enzima se encuentra en forma tetramérica; en las condiciones opuestas a las anteriores, forma monómeros (LaFuma *et al.*, 1970; Niles *et al.*, 1973; Richaud *et al.*, 1973; von Dippe *et al.*, 1972).

En bacterias Gram-positivas se ha encontrado una variedad distinta de aspartokinasa. La AKII de *B. subtilis* está constituida por dos tipos de subunidades polipeptídicas, denominadas α y β que se originan a partir de una única unidad transcripcional con dos sitios alternativos de inicio de la traducción (Chen *et al.*, 1987; Chen y Paulus, 1988), y que se agrupan para formar un heterotetrámero $\alpha_2\beta_2$ (Moir y Paulus, 1977). El gen que determina la AKI de *B. subtilis* ha sido también identificado; el análisis de su secuencia indica la presencia de dos unidades traduccionales que originarían también unidades α y β , si bien esta hipótesis no ha sido confirmada por el momento (Chen *et al.*, 1993). Aspartoquinasas estructuralmente similares a las anteriores han sido identificadas en una especie termotolerante de *Bacillus*, MGA3 (Schendel y Flickinger, 1992), y en *Bacillus stearothermophilus* (Cantoni *et al.*, 1996), así como en *Corynebacterium glutamicum* (Kalinowskiet *al.*, 1990; Kalinowskiet *al.*, 1991), en *Corynebacterium flavum* (Follettie *et al.*, 1993), en

Mycobacterium smegmatis (Cirillo *et al.*, 1994) y en la bacteria Gram-negativa *Thermus flavus* (Nishiyama *et al.*, 1995).

La aspartoquinasa de *S. cerevisiae* es del tipo monofuncional, y se desconoce su estructura cuaternaria, aunque por homología con las enzimas anteriores, cabe pensar que su forma activa podría muy bien ser de naturaleza oligomérica.

La Tabla I.I resume algunas de las características de las aspartoquinasas cuya secuencia codificante se ha podido determinar.

Regiones de homología entre las aspartoquinasas.

El estudio comparado de la estructura primaria de las distintas aspartoquinasas revela la existencia de zonas de homología donde la conservación de residuos en determinadas posiciones sugiere su implicación directa en la actividad enzimática, y también en la regulación de la misma.

En el extremo amino de todas las aspartoquinasas existe un segmento altamente conservado cuyo núcleo está constituido por la secuencia K-F-G-G. El hecho de que este segmento aparezca en todas estas enzimas, independientemente de la regulación a la que está sujeta cada una, sugiere su implicación en la función catalítica de la proteína (Chen *et al.*, 1993), aunque los estudios llevados a cabo hasta ahora no han permitido verificar esta hipótesis.

Una segunda región de gran homología se sitúa en la parte central de las aspartoquinasas. Esta zona, centrada en torno a la secuencia D-P-R, estaría supuestamente implicada, de manera directa, en la actividad kinasa de la enzima, ya que es posible encontrar una región similar en otras kinasas como las γ -glutamil-quinasas de *E. coli* (Deutch *et al.*, 1984), *Thermus thermophilus* (Kosuge *et al.*, 1994), *H. influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995), *S. marcescens* (Omriet *et al.*, 1991) y *Vigna aconitifolia* (Hu *et al.*, 1992), y las uridinato kinasas de *E. coli* (Yamanaka *et al.*, 1992), y *H. influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995).

La tercera región de homología corresponde al extremo C-terminal de las aspartoquinasas, y diversos estudios apoyan la hipótesis de que esta región está implicada tanto en la regulación alostérica de la actividad aspartoquinasa como en la oligomerización de la proteína para producir su forma nativa. En esta zona se han localizado mutaciones puntuales que reducen o eliminan de forma simultánea la inhibición de la aspartoquinasa y la homoserina deshidrogenasa en el producto bifuncional de

Tabla I.I Características de las distintas aspartoquinasas. El signo (?) a continuación de una característica denota que ésta no ha sido totalmente comprobada.

| Organismo | Gen | Actividad | longitud (a.a.) | Estructura cuaternaria | Inhibición | Represión |
|-----------------------------|----------------|----------------|---|---------------------------|----------------------|--------------------------|
| <i>A. thaliana</i> | <i>ak-hsds</i> | AK-HD (?) | 911 | ? | treonina (?) | ? |
| <i>D. carota</i> | ? | AK-HD (?) | 921 | ? | ? | ? |
| <i>Z. mays</i> | ? | AKI-HDI (?) | 920 | α_2 (?) | treonina (?) | ? |
| <i>Z. mays</i> | ? | AK-HD (?) | 917 | α_2 (?) | treonina (?) | ? |
| <i>H. influenzae</i> | ? | AK-HD (?) | 815 | ? | ? | ? |
| <i>S. marcescens</i> | <i>thrA</i> | AKI-HDI | 819 | α_4 | treonina | treonina e isoleucina |
| <i>E. coli</i> | <i>thrA</i> | AKI-HDI | 820 | α_4 | treonina | treonina e isoleucina |
| <i>E. coli</i> | <i>metL</i> | AKII-HDII | 809 | α_2 | No | metionina |
| <i>E. coli</i> | <i>lysC</i> | AKIII | 449 | α_2 | lisina | lisina |
| <i>B. stearotherophilus</i> | | | 407 | | | |
| <i>B. sp. MGA3</i> | <i>lysC</i> | AKII | 411 (α) 166 (β) | $\alpha_2\beta_2$ | lisina | lisina |
| <i>B. subtilis</i> | <i>dapG</i> | AKI | 405 (α) (?) 160 (β) (?) | ? | diamino- pimelato | No |
| <i>B. subtilis</i> | <i>lysC</i> | AKII | 409 (α) 163 (β) | $\alpha_2\beta_2$ | lisina | lisina |
| <i>C. glutamicum</i> | <i>lysC</i> | AK | 421 (α) 172 (β) | ? | lisina y treonina | ? |
| <i>C. flavum</i> | <i>ask</i> | AK | 421 (α) 172 (β) | ? | lisina y treonina | ? |
| <i>M. smegmatis</i> | <i>ask</i> | AK | 421 (α) (?) 172 (β) (?) | ? | ? | ? |
| <i>T. flavus</i> | <i>askA</i> | AK | 405 (α) 161 (β) | ? | treonina | ? |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>HOM3</i> | AK | 527 | ? | treonina | treonina y lisina |

S. marcescens (Omori *et al.*, 1993), y de la aspartoquinasa en los productos monofuncionales de *C. glutamicum* (Kalinowski *et al.*, 1991) y *S. cerevisiae* (Martín-Rendón *et al.*, 1993). Cuando se eliminan 351 aminoácidos del extremo C-terminal de la AKI-HDI de *S. marcescens*, la enzima pierde la actividad homoserina deshidrogenasa y el producto de 468 aminoácidos resultante mantiene una actividad aspartoquinasa inhibible por treonina, si bien su estructura cuaternaria pasa de tetramérica a dimerica; la eliminación de seis residuos más del extremo carboxilo provoca la pérdida total de inhibición por treonina, manteniéndose la actividad y la estructura (Omori *et al.*, 1993). Cuando se eliminan 513 aminoácidos, la proteína se encuentra en forma monomérica y aún retiene actividad catalítica, lo cual indica que la parte eliminada participa en la regulación alostérica y en la oligomerización, y que la actividad catalítica se localiza dentro de los 306 primeros residuos. Eliminando 30 aminoácidos más la proteína resultante no complementa la la mutación *thrA1* de *E. coli* (Omori *et al.*, 1993).

En las aspartoquinasas heteroméricas, la subunidad pequeña se corresponde, curiosamente, con el extremo C-terminal que contiene la tercera zona de homología, y su función no ha sido determinada con exactitud. Chen y Paulus (1988) han sugerido que la subunidad β de *B. subtilis* no interviene en la catálisis enzimática ni en la regulación de la misma, de acuerdo con los resultados de experimentos basados en un sistema de expresión artificial en *E. coli* que permitía la producción de la subunidad α únicamente. Sin embargo, otras líneas experimentales indican que la subunidad β juega un papel importante en la regulación alostérica; Kalinowski *et al.* (1990) han observado que, en *C. glutamicum*, la introducción de una subunidad β mutante, procedente de una aspartoquinasa resistente a aminoetilcisteína, en un fondo silvestre, resulta en la producción de una proteína parcialmente resistente al análogo tóxico, muy probablemente a través de la formación de heterotetrámeros híbridos con resistencia intermedia al análogo. Estudios recientes llevados a cabo con la aspartoquinasa de *T. flavus* apoyan la hipótesis de que la subunidad β interviene en la regulación de la actividad, incrementando el nivel de sensibilidad al inhibidor (Nishiyama *et al.*, 1995).

Síntesis de treonina en *S. cerevisiae*

En la levadura, la ruta de la treonina comparte con la de la metionina las tres primeras reacciones (Figura 1.2). La aspartato semialdehído

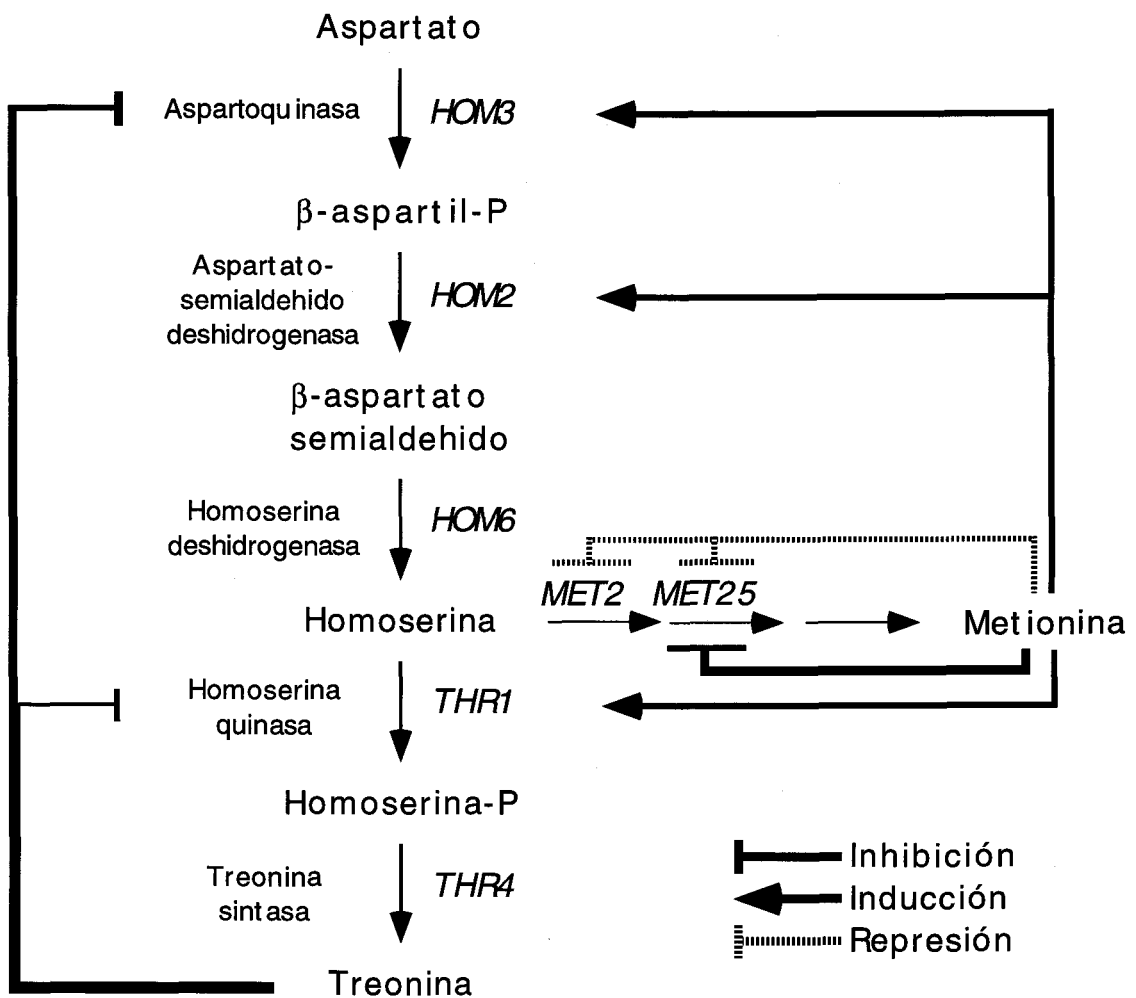


Figura 1.2. La ruta del aspartato y su regulación en *S. cerevisiae*.

deshidrogenasa de *S. cerevisiae* es el producto del gen *HOM2* (Thomas y Surdin-Kerjan, 1989), y al igual que la enzima de *E.coli*, con la que no guarda homología, no se inhibe por los productos finales de la ruta y cataliza la conversión del aspartil-P en aspartato-semialdehído, que constituye el sustrato de la siguiente reacción, catalizada por la homoserina deshidrogenasa. Esta enzima, producto del gen *HOM6* (Kim y Lea, 1986), presenta homología con el dominio catalítico correspondiente de las AK-HD de *E.coli*, *Serratia marcescens*, *Daucus carota*, *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays*, así como con la homoserina deshidrogenasa de *Bacillus subtilis*. Su actividad no se inhibe por los productos finales de la ruta. La homoserina formada a partir del aspartato-semialdehído es sustrato común para la síntesis de treonina y metionina.

La ruta específica de la treonina incluye dos reacciones consecutivas; la primera de ellas, la formación de homoserina-P a partir de homoserina, está catalizada por la homoserina quinasa (EC 2.7.1.39), determinada por el gen *THR1*. Esta enzima se inhibe por treonina ($K_i=14\text{mM}$; Ramos *et al.*, 1991) y por el sustrato homoserina ($K_i=2\text{mM}$; Ramos *et al.*, 1991). El gen *THR1* de *S. cerevisiae* ha sido clonado y secuenciado, encontrándose que existen varios segmentos de la proteína similares a sus isoenzimas bacterianos (Mannhaupt *et al.*, 1990a). Así, por ejemplo, el extremo carboxilo es similar al de otras proteínas que se unen a serina y treonina, como son treonina sintetasas y deshidratasas. La homoserina-P es, finalmente, convertida en treonina por medio de la treonina sintasa (EC 4.2.99.2) producto del gen *THR4* (de Robichon-Szulmajster *et al.*, 1966; Ramos, 1990 (poner en biblio)). El gen *THR4* de levaduras han sido clonado y secuenciado (Mannhaupt *et al.*, 1990b); la secuencia deducida para esta proteína parece tener bastante homología con sus correspondientes en bacterias.

Catabolismo de la treonina en *S. cerevisiae*

En células de levadura creciendo con treonina como única fuente de nitrógeno se han podido detectar tres tipos de actividades enzimáticas asociadas al catabolismo de este aminoácido:

- la treonina desaminasa (o deshidratasa), que convierte la treonina en α -cetobutirato y amonio
- la treonina deshidrogenasa, que la convierte en 2-amino-acetoacetato

-la treonina aldolasa, que transforma la treonina en glicina y acetaldehído. De estas tres actividades, la treonina desaminasa parece ser, cuantitativamente, la más importante (Murata *et al.*, 1986).

La reacción de deshidratación o desaminación de la treonina puede ser llevada a cabo por dos enzimas:

-la L-treonina desaminasa anabólica, primera enzima de la ruta de biosíntesis de la isoleucina es el producto del gen *ILV1* (Petersen *et al.*, 1983). Esta enzima se inhibe por isoleucina (Ahmed *et al.*, 1976; Katsunuma *et al.*, 1971; De Robichon-Szulmajster y Magee, 1968) y su expresión se reprime por isoleucina y valina (Petersen *et al.*, 1983)

-la L-serina(L-treonina) desaminasa catabólica, producto del gen *CHA1*, capacita a la levadura para crecer con serina o treonina como única fuente de nitrógeno (Ramos y Wiame, 1982; Petersen *et al.*, 1988). Esta enzima no se inhibe por treonina y para su expresión requiere la presencia de treonina o de serina (Petersen *et al.*, 1988). El promotor de *CHA1* contiene dos elementos de respuesta a serina y treonina, denominados $UAS1_{CHA}$ y $UAS2_{CHA}$, que son secuencias simétricas de 16 pares de bases, con un triplete CGG en cada extremo (Bornæs *et al.*, 1993).

Recientemente se ha identificado el gen *CHA4*, cuyo producto actúa como activador de la expresión de *CHA1*. Una mutación en este gen impide que la levadura utilice serina o treonina como fuentes de nitrógeno y reduce de 8 a 10 veces el nivel basal de expresión de *CHA1*, activador transcripcional de *CHA1* que induce su expresión hasta 100 veces en presencia de serina o treonina (Holmberg y Schjerling, 1996).

Cha4p posee un dominio de unión a ADN, localizado en el extremo N-terminal de la proteína, mediante el que se une permanentemente a las UAS_{CHA} de *CHA1*, probablemente en forma de dímero, aun en ausencia de inductor. La activación transcripcional de *CHA1* se da, por tanto, mediante la modulación del complejo Cha4p-ADN previamente formado (Holmberg y Schjerling, 1996; Schjerling *et al.*, 1996).

A partir de una cepa *ilv1* se han aislado mutantes afectados en *CHA4* en los cuales la expresión de *CHA1* es constitutiva (Pedersen *et al.*, 1996). Estos mutantes se seleccionaron por su capacidad de crecer en ausencia de isoleucina. Este fenotipo también podría ser el resultado de una mutación que provocase la acumulación de treonina o serina, lo que a su vez induciría la expresión de *CHA1* y, por tanto, la supresión fenotípica de la mutación *ilv1*. El capítulo primero de Resultados de esta Tesis describe el

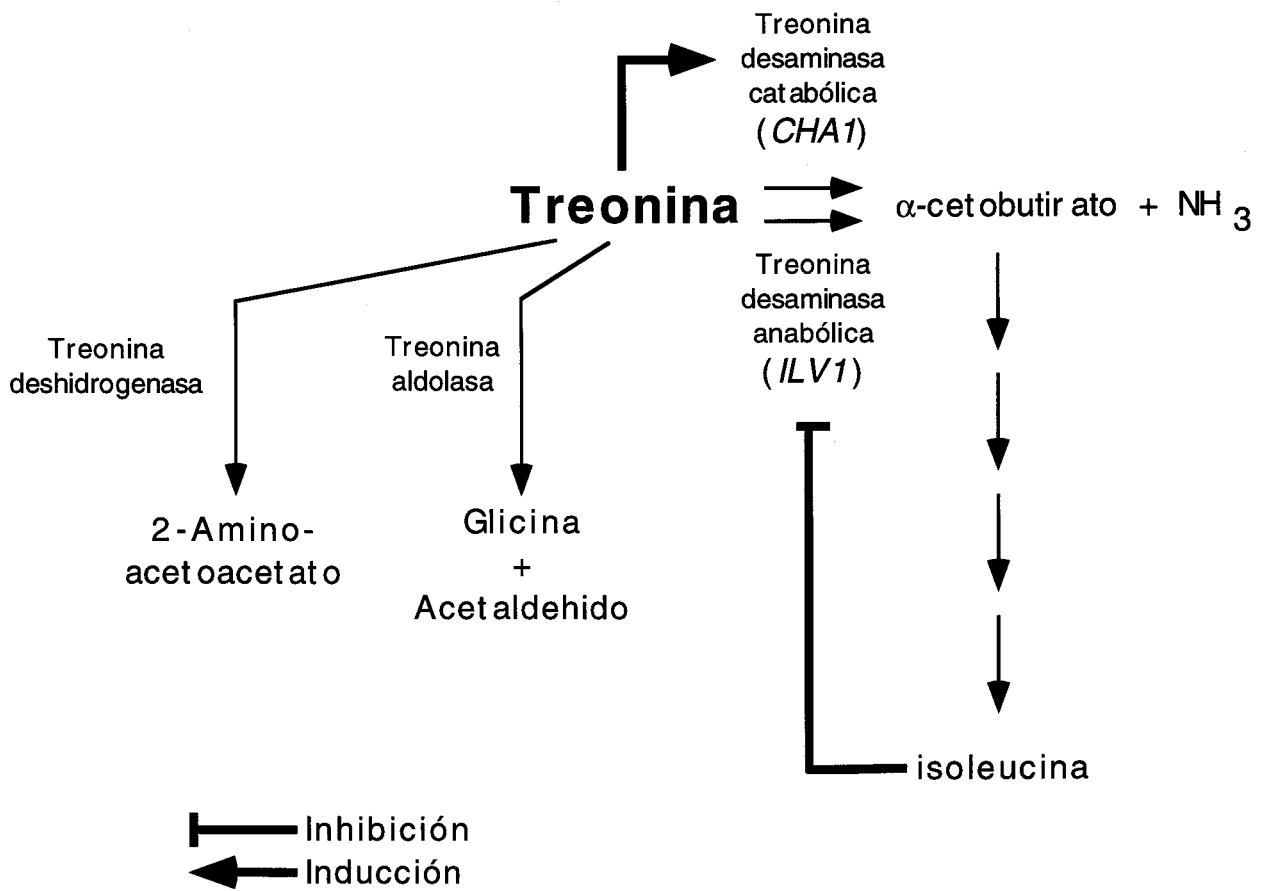


Figura 1.3. Catabolismo de la treonina en *S. cerevisiae*.

aislamiento de mutantes superproductores de treonina utilizando esta estrategia.

MATERIALES

1. MICROORGANISMOS

1.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

En la Tabla 2.I se relacionan las cepas utilizadas en esta Tesis y su origen.

Para la nomenclatura genética se han seguido las recomendaciones recogidas en Trends in Genetics (Cherry, 1995) Las designaciones genéticas relevantes para esta Tesis son:

- *ADE*, *HIS*, *LEU*, *THR*, *TRP* y *URA* designan genes de levadura, implicados en las rutas biosintéticas de los aminoácidos y bases a los que corresponde cada abreviatura. Las mutaciones en estos genes dan lugar a auxotrofia para ese aminoácido o base.

- *HOM* designa genes de la parte común de la ruta de biosíntesis de treonina y metionina. Una cepa portadora de una mutación *hom* requiere simultáneamente ambos aminoácidos o bien el intermediario homoserina.

- *ILV* son genes que intervienen en la biosíntesis de isoleucina y valina. Las mutaciones en estos genes dan lugar a auxotrofia para estos dos aminoácidos, excepto las *ilv1* que confieren auxotrofia sólo para isoleucina.

- *MAL*, *MEL*, *GAL* y *SUC* son genes implicados en la fermentación de maltosa, melibiosa, galactosa y sacarosa, respectivamente.

- *CUP1* determina una metalotioneína que acompleja cobre. La amplificación de este gen confiere resistencia a cobre.

- *Cyh^R* se refiere a mutaciones que confieren resistencia a cicloheximida.

- *CHAI* designa a un gen que interviene en el catabolismo de serina y treonina.

Tabla 2.I. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en esta Tesis.

| CEPA | GENOTIPO | ORIGEN |
|--------------------|---|---------------------------|
| MMY1 | <i>MATα ura3-52 Cyh^R</i> | RB |
| MMY2 | <i>MATα ura3-52 Cyh^R</i> | RB |
| Σ 1278b | <i>MATα</i> | MG |
| 8723c | <i>MATα ilv1</i> | IRCERIAC |
| R7 | <i>MATα ilv1 HOM3-7R</i> | Este trabajo |
| 8723c.A1 | <i>MATα ura3 ilv1</i> | Este trabajo |
| R2 | <i>MATα ilv1</i> | Este trabajo |
| R2.C1 | <i>MATα ura3 ilv1</i> | Este trabajo |
| R3 | <i>MATα ilv1</i> | Este trabajo |
| R7.C1 | <i>MATα ura3 ilv1 HOM3-7R</i> | Este trabajo |
| R7.C1. <i>chal</i> | <i>MATα ura3 ilv1 HOM3-7R chal::GALp-PCR1</i> | Este trabajo |
| F4 | <i>MATα thr4</i> | CC |
| S288C | <i>MATα SUC2 mal mel gal2 CUP1</i> | YGSC |
| TS1 | <i>MATα SUC2 mal mel gal2 CUP1</i> | Este trabajo |
| TS2 | <i>MATα SUC2 mal mel gal2 CUP1</i> | Este trabajo |
| TS3 | <i>MATα SUC2 mal mel gal2 CUP1</i> | Este trabajo |
| TS4 | <i>MATα SUC2 mal mel gal2 CUP1</i> | Este trabajo |
| XMP10-1B | <i>MATα ura3 hom3</i> | MJF |
| XMA52-1C | <i>MATα ura3 hom3</i> | Este trabajo ^a |
| XMA54-16C | <i>MATα ura3 ilv1 hom3</i> | Este trabajo ^b |
| XMA54-26D | <i>MATα ura3 ilv1 hom3</i> | Este trabajo ^b |
| TG107 | <i>MATα trp1 ilv1::CHA1</i> | SH |
| SG45 | <i>MATα trp1 ilv1::CHA1 HOM3-45S</i> | SH |
| SG46 | <i>MATα trp1 ilv1::CHA1 HOM3-46S</i> | SH |
| SG49 | <i>MATα trp1 ilv1::CHA1 HOM3-49S</i> | SH |
| XMA57-1A | <i>MAT[?] ura3 HOM3-49S</i> | Este trabajo |
| SG45-C5 | <i>MATα ura3 trp1 ilv1::CHA1 HOM3-45S</i> | Este trabajo |
| SG46-C10 | <i>MATα ura3 trp1 ilv1::CHA1 HOM3-46S</i> | Este trabajo |
| SG76 | <i>MATα ura3-52 trp1 ilv1-Δ1</i> | SH |
| HT1 | <i>MATα ura3-52 trp1 ilv1-Δ1 hom3::TRP1</i> | Este trabajo |
| AWY-1B | <i>MATα ura3 trp1 leu2 ade2 his3</i> | AA |

RB: Richard Bailey, Solar Energy Research Institute, Golden Co., EE.UU.

MG: Marcelle Grenson; Unité de Physiologie Cellulaire, Laboratoire de Microbiologie, Faculté des Sciences, Université Libre de Bruxelles, Bélgica.

IRCERIAC: Institut de Recherches du Centre D'Enseignement et de Recherches des Industries Alimentaires et Chimique, Bruxelles, Bélgica.

CC: Cruzcampo, S.A., Sevilla.

YGSC: Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, California, EE.UU.

MJF: María José Farfán; Departamento de Genética, Universidad de Sevilla.

SH: Steen Holmberg, Institute of Molecular Biology, Department of Genetics Universidad de Copenhagen, Dinamarca.

AA: Andrés Aguilera, Departamento de Genética, Universidad de Sevilla.

^aProducto meiótico del cruce S288C x XMP10-1B.

^bProducto meiótico del cruce R7 x XMA52-1C.

1.2. Estirpe de *E. coli*

La estirpe de *E. coli* utilizada en esta Tesis fué DH5 α (F^- *endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17* ($rK^- mK^+$) *supE44 elA1 deoR* $\Delta(lacZYA-argF)$ *U169 recA1* [$\Phi80d lacZ\Delta M15$] λ^-) (Hanahan, 1985).

2. PLASMIDOS

2.1. Plásmidos no originales utilizados en esta Tesis.

Se reseñan sólo las características más relevantes

Vectores

- YEp24** Vector de clonación (Figura 4); contiene el origen de replicación del círculo de 2μ de *S. cerevisiae* (Botstein *et al.* 1979). Cedido por Steen Holmberg (Department of Genetics, Institute of Molecular Biology, Universidad de Copenhague, Dinamarca.).
- YRp7** Vector de clonación (Figura 5); contiene un origen de replicación cromosómico (ARS) de *S. cerevisiae* (Struhl *et al.*, 1979). Cedido por Andrés Aguilera (Departamento de Genética, Universidad de Sevilla).
- pYSEL** Vector de clonación; contiene el origen de replicación del círculo de 2μ de levaduras (Olesen y Kielland-Brandt, 1993). (Ver Figura 2). Cedido por K. Olesen (Carlsberg Laboratories, Copenhague, Dinamarca).
- pUC19** Vector de clonación en *E. coli* (Yanisch-Perron *et al.*, 1985). (Ver Figura 9 de Métodos). Cedido por J. Moreira (Department of Genetics, Institute of Molecular Biology, Universidad de Copenhague, Dinamarca.).

Plásmidos con genes de la ruta biosintética de la treonina

- pHOM2-7** Contiene el gen *HOM2* de *S. cerevisiae* clonado en el vector episómico pEMBL YE24. (Thomas y Surdin-Kerjan, 1989). Cedido por Y. Surdin-Kerjan (Laboratoire d'Enzymologie du C.N.R.S., 91198 Gif-sur-Yvette, Francia).
- pMF6-1** Contiene el gen *HOM6* de *S. cerevisiae* clonado en el vector replicativo YRp17 (Farfán *et al.*, 1996). Cedido por E. Martín Rendón (Departamento de Genética, Universidad de Sevilla).
- P1-AK4** Contiene el gen *HOM3* de *S. cerevisiae* clonado en el vector YEp24 (Rafalski y Falco, 1988). Cedido por C. Falco (DuPont, Wilmington, Delaware, EE.UU.)
- pMR31** Contiene el gen *HOM3* de *S. cerevisiae* clonado en el vector centromérico YCp50 (Martín-Rendón, datos sin publicar). (Ver Figura 3). Cedido por E. Martín Rendón (Departamento de Genética, Universidad de Sevilla).
- pMR3- Δ 1** Contiene el alelo *hom3- Δ 1* (Martín-Rendón *et al.*, 1993). (Ver Figura 5). Cedido por E. Martín Rendón (Departamento de Genética, Universidad de Sevilla).
- pMR1-400** Contiene el gen *THR1* de *S. cerevisiae* (Farfán *et al.*, 1996). (Ver Figura 1). Cedido por E. Martín Rendón (Departamento de Genética, Universidad de Sevilla).
- pMR4-1** Contiene el gen *THR4* de *S. cerevisiae* (Farfán *et al.*, 1996). (Ver Figura 2). Cedido por E. Martín Rendón (Departamento de Genética, Universidad de Sevilla).

Plásmidos con construcciones especiales

- pTK120** Plásmido centromérico que contiene la fusión traduccional *pCHA1-lacZ*. Permite cuantificar la

inducción del promotor del gen *CHAI* en levadura, midiendo los niveles de actividad β -galactosidasa en la cepa que lo porta (Bornæs, Tesis Doctoral, 1991). Cedido por S. Holmberg (Department of Genetics, Institute of Molecular Biology, Universidad de Copenhagen, Dinamarca).

pICG9 Plásmido integrativo que porta la construcción *chal::pGAL-PRC1*. Se usó para la interrupción del gen *CHAI*, según se describe en el apartado 7 de Métodos (Nielsen, T. L. *et al.* 1990). Cedido por S. Holmberg (Department of Genetics, Institute of Molecular Biology, Universidad de Copenhagen, Dinamarca.).

2.2. Plásmidos originales de este trabajo

Plásmidos pMAC- (Centroméricos; contienen alelos silvestres o mutantes de *HOM3*).

pMAC32wt Construído a partir del plásmido pMR31, por eliminación del fragmento *EcoRI-BamHI* (Figura 2.1). Porta el alelo *HOM3* silvestre de la cepa S288C de *S. cerevisiae*.

pMAC33 Δ h Construído a partir del plásmido pMAC32wt por tratamiento con *HindIII* y religación (Figura 2.1). Lleva el segmento Δ -*hom3* formado por secuencias que flanquean a la ORF del gen *HOM3*.

pMAC34 Δ 2 Construído a partir del plásmido pMAC32wt por el procedimiento de mutagénesis dirigida descrito en el apartado 9 de Métodos (ver figura 2.11). Lleva el alelo *hom3- Δ 2*

pMAC87wt Obtenido por el método método de la reparación de huecos descrito en el apartado 5 de Métodos. Contiene el alelo silvestre *HOM3-87* presente en la cepa 8723c.

- pMAC7R** Obtenido por el método método de la reparación de huecos descrito en el apartado 5 de Métodos. Contiene el alelo *HOM3-7R*.
- pMAC45S** Obtenido por el método método de la reparación de huecos descrito en el apartado 5 de Métodos. Contiene el alelo *hom3-45S*.
- pMAC46S** Obtenido por el método método de la reparación de huecos descrito en el apartado 5 de Métodos. Contiene el alelo *hom3-46S*.
- pMAC49S** Obtenido por el método método de la reparación de huecos descrito en el apartado 5 de Métodos. Contiene el alelo *hom3-49S*.
- Plásmidos pMAE-** (Contienen alelos *hom3* mutantes clonados en el vector episómico YEp24; ver Figura 2.2).
- pMAE45S** Se construyó clonando el fragmento *XbaI-HpaI* de pMA45, que contenía el alelo *hom3-45S*, en el vector YEp24.
- pMAE46S** Se construyó clonando el fragmento *XbaI-HpaI* de pMA46, que contenía el alelo *hom3-46S*, en el vector YEp24.
- pMAE49S** Se construyó clonando el fragmento *XbaI-HpaI* de pMA49, que contenía el alelo *hom3-49S*, en el vector YEp24.
- pMAR50** Plásmido replicativo utilizado en la interrupción de *HOM3* (ver Métodos). Contiene la construcción *hom3::TRP1*. Se obtuvo sustituyendo en pMR3- $\Delta 1$ el fragmento *BfrI-KpnI*, interno a *hom3- $\Delta 1$* , por el fragmento *EcoRI-BglII* de YRp7 que contiene a *TRP1* (Figura 2.3).

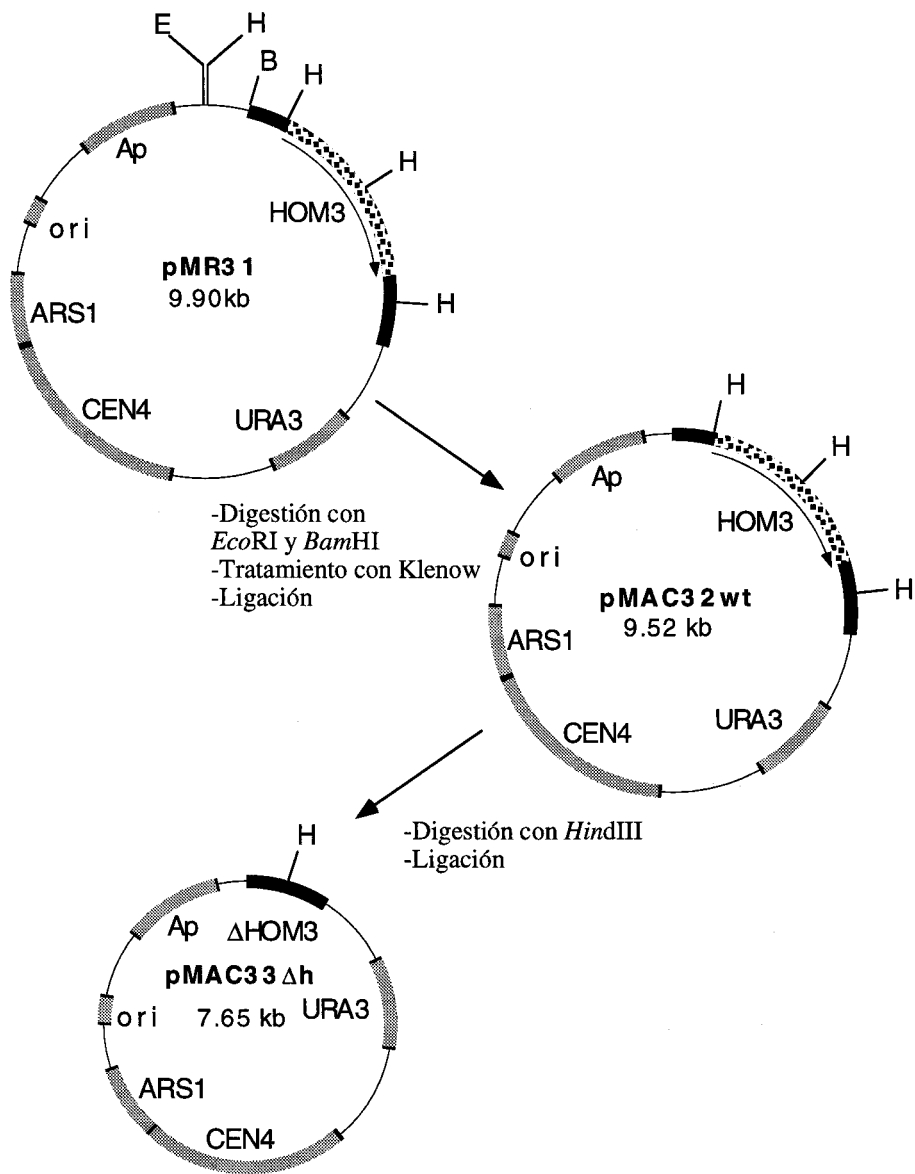


Figura 2.1. Construcción de los plásmidos pMAC32w y pMAC33Δh. Sólo se muestran los sitios de restricción implicados. H, *HindIII*; B, *BamHI*.

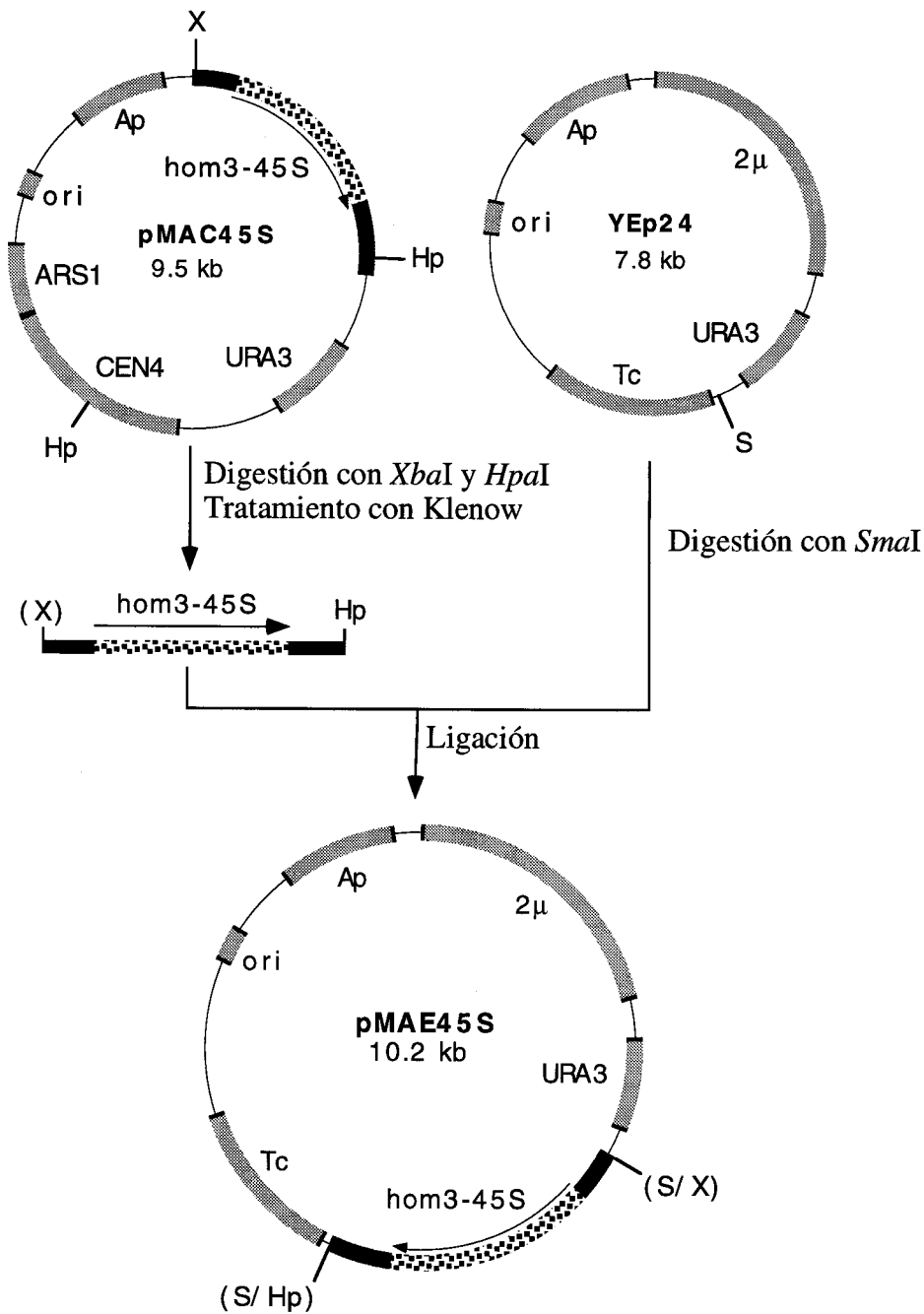


Figura 2.2. Clonación del alelo *hom3-45S* en el vector multicopia YEp24. El fragmento *Xba*I-*Hpa*I de 2.5 kb que contenía a *hom3-45S* fué extraído del plásmido pMAC45S y tratado con Klenow para rellenar su extremo *Xba*I, antes de insertarlo en el sitio *Sma*I del vector. La construcción de pMAE46S and pMAE49S se hizo de forma idéntica, y la orientación del inserto es la misma para los tres plásmidos. Sólo se muestran los sitios de restricción implicados. X, *Xba*I; Hp, *Hpa*I; S, *Sma*I.

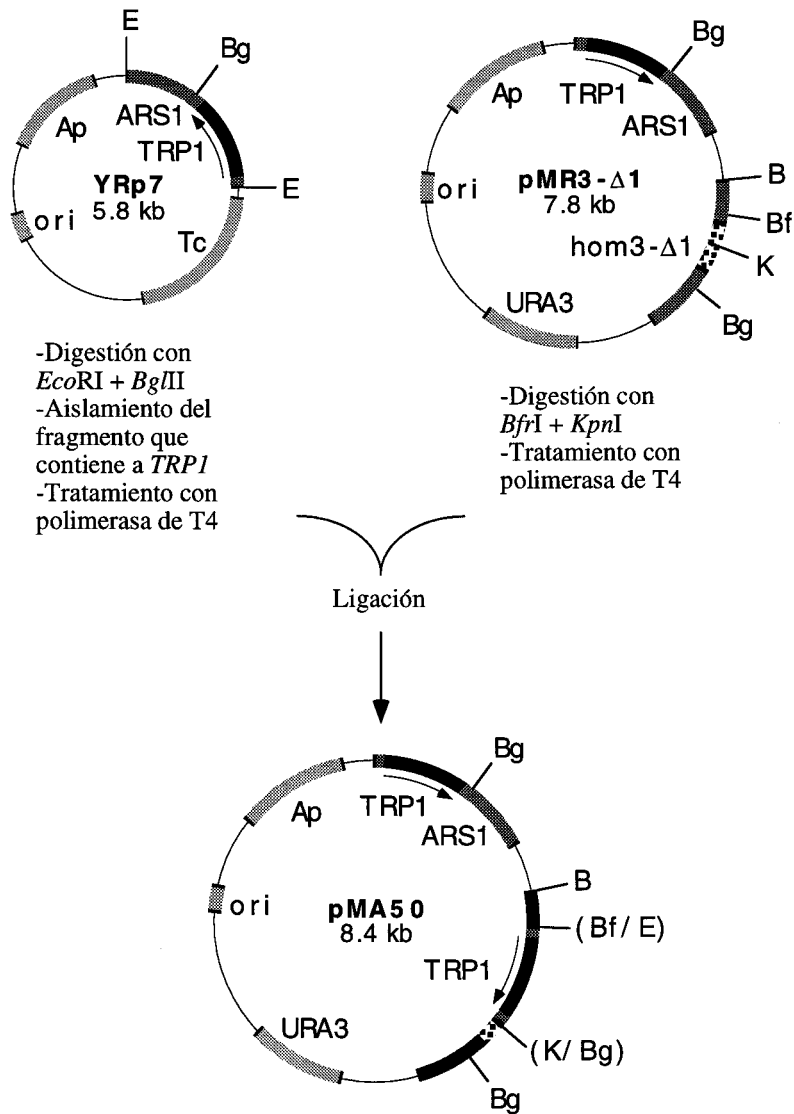


Figura 2.3. Construcción del plásmido pMA50. El fragmento *EcoRI*-*BglIII* de YRp7 que contenía a *TRP1* se ligó al fragmento *BfrI*-*KpnI* mayor de pMR3-Δ1, previo tratamiento de ambos con polimerasa de T4 para transformar extremos cohesivos en romos. Sólo se muestran los sitios de restricción implicados. B, *BamHI*; Bg, *BglIII*; Bf, *BfrI*; E, *EcoRI*; K, *KpnI*.

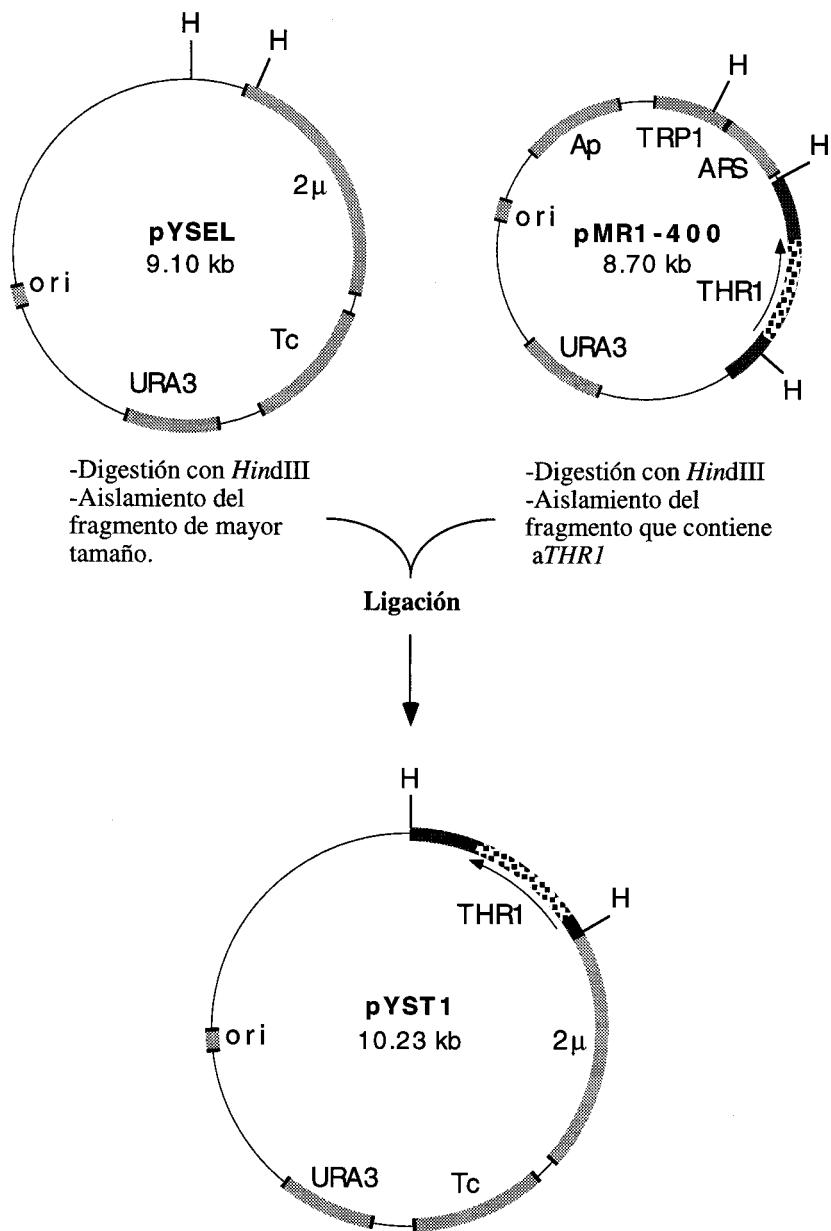


Figura 2.4. Construcción del plásmido pYST1. Sólo se muestran los sitios de restricción implicados. H, *HindIII*.

Plásmidos PYST- (Construídos a partir de PYSEL)

PYST1 Construído por clonación del gen *THR1* en PYSEL, obtenido a partir del plásmido pMR1-400 (Figura 2.4).

PYST4 Construído por clonación del gen *THR4* en PYSEL, obtenido a partir del plásmido pMR4-1 (Figura 2.5).

3. OLIGONUCLEOTIDOS

En este trabajo se utilizaron los oligonucleótidos cuyas secuencias y posiciones relativas dentro del gen *HOM3*, se muestran en la Figura 6. Los oligonucleótidos denominados OLIGO I a OLIGO VII, DEL1, HOMpriA y HOMpriB fueron sintetizados en los laboratorios Carlsberg (Copenhague, Dinamarca) en un sintetizador automático de ADN Applied Biosystems 380 A. El oligonucleótido DOL1 fué sintetizado por DNA Technology (Aarhus, Dinamarca). El oligonucleótido MG1 fué sintetizado por Medigene (Martinsried, Alemania).

La secuencia de DEL1 contiene una delección de que abarca desde la base situada en la posición 417 hasta la 428, ambas incluídas.

El cebador DOL 1 es en realidad una mezcla de oligonucleótidos, obtenida mediante un proceso de síntesis automática en la cual, para cada posición, se incorporaba la base silvestre correspondiente con una probabilidad calculada de 99.625%, o una cualquiera de las otras tres bases con una probabilidad de 0.375%, salvo para el caso de la última base del extremo 3', que era siempre la silvestre. Este proceso de síntesis mutagénica generaba una mezcla de oligonucleótidos silvestres y mutantes, en la que el número de mutaciones por cada oligonucleótido seguiría una distribución de tipo binomial. Teniendo en cuenta la longitud de los oligonucleótidos (66 bases) y la frecuencia mutagénica calculada, se estima que en la mezcla resultante, alrededor del 19% de los oligonucleótidos contendrían una única mutación, un 3% de ellos contendrían dos o más mutaciones, y el resto, un 78%, serían de tipo silvestre. La secuencia mostrada en la Figura 6 es la correspondiente a una molécula de tipo silvestre.

| Cebador | Posición | n° bases | Secuencia 5'—>3' |
|-----------|-------------------------------|----------|---|
| OLIGO I | 671—>652 | 18 | TGAGAATGAAGCGGTCGG |
| OLIGO II | 514—>531 | 18 | TGTCGTTTGTTCGGCCCG |
| OLIGO III | 713—>730 | 18 | GAACTTGAACTGGTCAAG |
| OLIGO IV | 950—>967 | 18 | AAAGAAAAATTGGCCCCC |
| OLIGO V | 1144—>1161 | 18 | TGCTGATCCTCGTAAGGT |
| OLIGO VI | 1350—>1367 | 18 | AGGGTGAATCTACTCCAC |
| OLIGO VII | 1584—>1601 | 18 | TGCCCATTCAGATGCAG |
| MG1 | 267—>284 | 18 | ATTGAAGGATATTTGTGT |
| HOMpriA | 151—>173 | 23 | TCCGTACGCAGTCTTCTCCAGAG |
| HOMpriB | 2086—>2064 | 23 | CATTTAGGGAATAATCGCCCCAA |
| DEL 1 | 395—> (417—> 428) —>448 | 42 | CATTCGAACTGGGTTCGTGCAAACA TCTGTCCGTAAATTTCCC |
| DOL 1 | 395—>460 | 66 | CATTCGAACTGGGTTCGTGCAAAG TTCGGTGGTACATCTGTCCGTAAA TTTCCCGTCCAATAGTG |

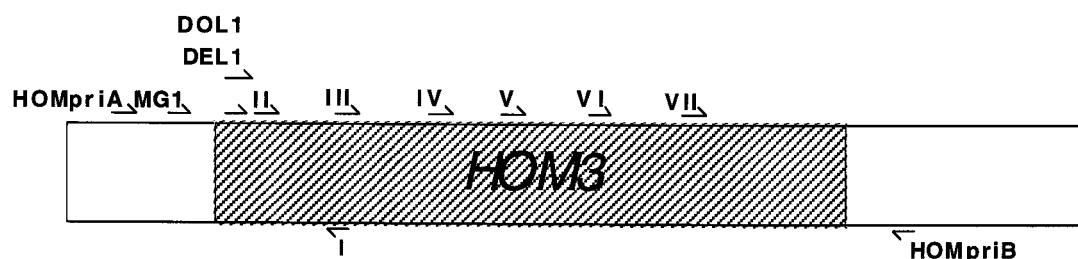


Figura 2.6. Cebadores utilizados en esta Tesis. Se muestran las secuencias de los mismos, así como sus posiciones relativas, indicadas por flechas que apuntan en sentido 5'—>3', dentro de *HOM3*. La zona rayada representa la secuencia codificante del gen.

4. MEDIOS DE CULTIVO USUALES

Para levaduras

4.1. Medio mínimo (SD)

Contiene "Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulphate" 0.17%, sulfato amónico 0.5% y glucosa 2%.

Los suplementos requeridos por cada cepa se añaden después de esterilizar el medio, a las concentraciones finales indicadas en Sherman *et al.* (1986). Para ello se preparan soluciones concentradas de cada suplemento que se esterilizan mediante filtración o autoclave según las indicaciones de los mismos autores.

4.2. Medio mínimo con prolina como fuente de nitrógeno (SDpro)

La composición es idéntica al medio SD salvo que, en vez de sulfato amónico, contiene 0.1% de L-prolina como única fuente de nitrógeno (Grenson *et al.*, 1970).

4.3. Medio mínimo con serina como fuente de nitrógeno (SDser)

La composición es idéntica al medio SD salvo que, en vez de sulfato amónico, contiene 0.1% de L-serina como única fuente de nitrógeno.

4.4. Medio mínimo con treonina como fuente de nitrógeno (SDthr)

La composición es idéntica al medio SD salvo que, en vez de sulfato amónico, contiene 0.1% de L-treonina como única fuente de nitrógeno.

4.5. Medio nutritivo (YPD)

Constituido por extracto de levadura 1%, bacto-peptona 2% y glucosa 2% (Sherman *et al.*, 1986).

Para bacterias

4.6. Medio nutritivo LB

Constituido por extracto de levadura 0.5%, bacto-triptona 1% y NaCl 0.5%. Este medio es una modificación del descrito en Sambrook *et al.* (1989). Cuando era necesario, después de autoclavar, se añadía ampicilina (50-100 µg/ml) o tetraciclina (12 µg/ml) a partir de soluciones concentradas, según se describe en Sambrook *et al.*, 1989.

Los medios sólidos se preparaban añadiendo 2% de agar.

5. PRODUCTOS QUIMICOS

En la Tabla 2.II se relacionan algunos de los productos químicos más relevantes utilizados en esta Tesis y su procedencia.

Tabla 2.II. Productos químicos utilizados en esta Tesis

| <u>Producto</u> | <u>Casa comercial</u> |
|--|-----------------------|
| Agar | Panreac o Adsa-Micro |
| Aminoácidos | Sigma |
| Bacto-peptona | Pronadisa |
| Bacto-triptona | Adsa-Micro |
| Enzimas de restricción y enzimas modificadoras del ADN | Boehringer o Promega |
| Extracto de levadura | Pronadisa |
| Glucosa y galactosa | Panreac |
| Hidroxinorvalina (ácido α -amino- β - hidroxivalérico) | Degussa |
| Metanol | Scharlau |
| Piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa de músculo de conejo (PK/LDH) | Sigma |
| Tetrahidrofurano | Scharlau |
| "Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulphate" (YNB) | Difco |
| Zimoliasa 20-T | Seikagako |

-
- Adsa-Micro, Barcelona, España.
 - Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania.
 - Degussa A.B.M., Frankfurt, Alemania.
 - Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.
 - Panreac S.A., Barcelona, España.
 - Promega Co., Madison, Wisconsin, USA.
 - Pronadisa, Madrid, España.
 - Scharlau S.A., Barcelona, España.
 - Seikagako Kogyo Co. Ltd., Tokyo, Japón.
 - Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA.

METODOS

1. Estimación de biomasa

Con el fin de poder estimar el peso seco por ml de la biomasa de un cultivo ($P.S.\cdot ml^{-1}$) a partir de la densidad óptica del mismo a 660 nm (DO_{660}), se calculó la relación $P.S.\cdot ml^{-1}/DO_{660}$, a dos DO_{660} distintas, para las cepas parentales S288C y 8723c.

Para ello, una muestra de 100 ml de cultivo en medio mínimo se centrifugó y se lavó 2 veces con agua destilada, tras lo cual las células se resuspendieron en 5 ml de agua destilada. Tras medir la DO_{660} de esta suspensión se tomaron alícuotas de 1 ml que se filtraron a través de filtros Millipore de 0.45 μm de diámetro de poro. Cada filtro con la biomasa se secó en una estufa a 105°C durante 15 min y se midió la diferencia entre el peso de cada filtro con la biomasa, tras el secado, y el peso original del filtro. La relación $P.S.\cdot ml^{-1}/DO_{660}$ de la suspensión se calculó a partir de la media de al menos dos filtros.

De esta forma, para la cepa S288C, cultivada en medio SD, se obtuvieron los siguientes resultados utilizando un espectrofotómetro Spectronic® 2000 de Bausch & Lomb:

| DO_{660} del cultivo | $P.S.\cdot ml^{-1}/DO_{660}$ ($mg\cdot ml^{-1}\cdot unidad\ de\ DO^{-1}$) |
|------------------------|---|
| 0.27 | 0.28 |
| 1.79 | 0.26 |

a partir de los cuales se calculó un valor promedio de 0.27, que fue utilizado en adelante para calcular el $P.S.\cdot ml^{-1}$ de cualquier cultivo de S288C y las cepas derivadas de ella.

Para la cepa 8723c, cultivada en medio SD+ile, se obtuvieron los siguientes resultados utilizando un espectrofotómetro Beckman DU® 640:

| DO_{660} del cultivo | $P.S.\cdot ml^{-1}/DO_{660}$ ($mg\cdot ml^{-1}\cdot unidad\ de\ DO^{-1}$) |
|------------------------|---|
| 0.33 | 0.64 |
| 0.79 | 0.66 |

a partir de los cuales se calculó un valor promedio de 0.65, que fué utilizado en adelante para calcular el P.S. \cdot ml⁻¹ de cualquier cultivo de 8723c y las cepas derivadas de ella.

Las diferencias encontradas entre las relaciones P.S. \cdot ml⁻¹/DO₆₆₀ de ambas cepas pueden ser, en parte, atribuibles al hecho de haber empleado distintos modelos de espectrofotómetro en la determinación de la relación anterior.

2. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración total de proteínas de los extractos celulares se determinó mediante el método descrito por Bradford (1976). Para ello se usó un preparado comercial de reactivos de BioRad y se siguieron las indicaciones del fabricante.

3. Purificación de la aspartoquinasa

La purificación parcial de la aspartato quinasa se llevó a cabo según el método descrito por Ramos *et al.* (1991) con algunas variaciones. Una de las modificaciones más sustanciales consistió en no añadir treonina a las soluciones usadas en la preparación y la diálisis de los extractos celulares. La presencia de treonina en las mencionadas soluciones tendría la función de proteger a la aspartoquinasa de la desnaturalización durante el proceso de purificación, a través la supuesta estabilización de la estructura nativa de la enzima. En este trabajo se comprobó que la ausencia de treonina en los tampones de extracción no hacía disminuir de manera sensible la actividad específica de los extractos parcialmente purificados, así que se optó por modificar el protocolo de extracción, a fin de evitar la posible interferencia del aminoácido durante los ensayos enzimáticos a realizar con los extractos obtenidos.

Esencialmente, el método consiste en una rotura mecánica de las células y dos precipitaciones sucesivas con sulfato de protamina y sulfato amónico, respectivamente.

La cepa se cultivó en medio SD con los suplementos nutritivos adecuados, hasta una DO₆₆₀ = 0.6 a 0.8 (fase exponencial tardía). Habitualmente, células procedentes de unos 400 ml de cultivo se recogieron mediante centrifugación, se lavaron dos veces con tampón A y

se resuspendieron en 2 ml del mismo tampón. La rotura de las mismas se llevó a cabo mediante adición de perlas de vidrio (0.5 mm de diámetro) y agitación en un vortex durante unos 10 minutos con intervalos cada minuto, de 30 segundos de reposo en hielo. Los residuos celulares se eliminaron mediante dos centrifugaciones consecutivas a 4°C, la primera durante 20 minutos a 8000 g y la segunda, durante 2 horas a 105000 g.

A este extracto crudo se le añadió 0.3 ml de una solución de sulfato de protamina (5 mg/ml pH 7) y, tras mantener el extracto en agitación suave a 4°C durante 1 hora, el precipitado (ácidos nucleicos y sus proteínas asociadas) se eliminó mediante centrifugación a 4°C durante 15 minutos a 8000 g. Al sobrenadante así obtenido se le añadió un volumen de sulfato amónico al 60% de saturación en tampón A y se mantuvo en agitación suave a 4°C durante 30 minutos. El precipitado (fracción P30) se recogió mediante centrifugación a 4°C durante 15 minutos a 8000 g y se resuspendió en 0.2 ml de tampón B. Esta solución se dializó dos veces, durante 12 horas cada vez, frente a 500 ml del mismo tampón, a 4°C. El extracto se repartió en alícuotas y se congeló a -80°C, no observándose pérdida de actividad al cabo de varios meses.

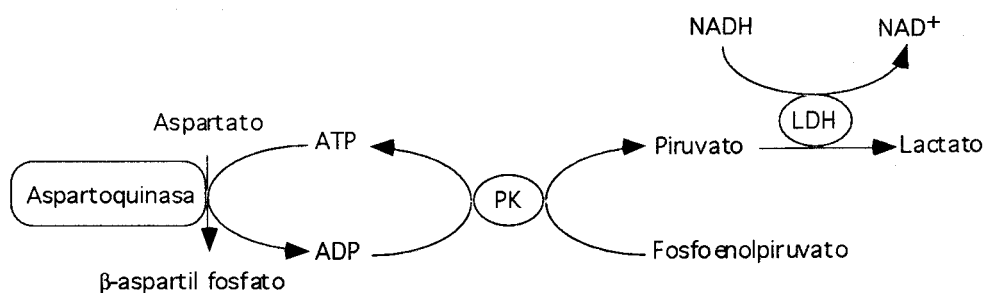
Tampón fosfato 40 mM: Se compone de KH_2PO_4 40 mM y K_2HPO_4 40 mM en proporciones adecuadas (aproximadamente 2:1) para obtener una solución a pH 7.2 (Gomori, 1955).

Tampón A: Contiene KCl 0.1 M, MgCl_2 5 mM, EDTA 2 mM y DTE 1 mM, en tampón fosfato 40 mM pH 7.2.

Tampón B: De igual composición que el tampón A excepto que el tampón fosfato está a concentración 20 mM.

4. Ensayo de la actividad aspartoquinasa.

La actividad aspartato quinasa se ensayó cuantificando la desaparición de NADH asociada a la liberación de ADP en el sistema acoplado piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa (PK/LDH) (Spencer y Wedler, 1984), esquematizado en la figura siguiente:



La transformación de NADH en NAD⁺ da lugar a una disminución en la absorbancia medida a 340 nm. Para la medida de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Beckman DU[®] 640 equipado con un controlador de temperatura tipo Peltier.

Las mezclas de reacción se prepararon directamente en una cubeta de espectrofotómetro mantenida a 30 °C. Cada ensayo contenía 237 μl de la solución M, preparada en el momento, 12.5 μl de extracto y aspartato (ajustado a pH 7.5 con NaOH 1M), con cuya adición se desencadenaba la reacción, a una concentración final de 10 mM; el volumen total de reacción fue siempre de 500 μl. Cada medida se repitió en presencia y ausencia de aspartato; la diferencia entre estas dos medidas se atribuye a la actividad aspartoquinasa.

La actividad aspartoquinasa de un extracto se define como los μmoles de ATP transformados en ADP por minuto y ml. Se determina según la ecuación

$$(A-B) \cdot V_t \cdot (E \cdot l \cdot V_e)^{-1}$$

- donde
- A = $-\Delta DO_{340}$ por minuto en presencia de L-aspartato
 - B = $-\Delta DO_{340}$ por minuto en ausencia de L-aspartato
 - V_t = volumen total de la mezcla de reacción
 - V_e = volumen de extracto utilizado
 - E = coeficiente de extinción milimolar del NADH (= 6.2)
 - l = paso de luz (1 cm)

A y B se calcularon utilizando solamente el intervalo de tiempo durante el cual el descenso de absorbancia se mantenía lineal, que era siempre menor de 5 minutos tras la adición del sustrato.

Solución HEPES: Consiste en una solución de HEPES 0.5 M ajustada a pH 7.6 con HCl 1M, y KCl 70 mM.

Solución PEP: Se compone de fosfoenolpiruvato 45 mM, MgSO₄ 0.3 M y KCl 1.8 M.

Solución NADH: Contiene NADH 6 mM en HEPES 0.5 M pH 7.6.

Solución ATP: Contiene ATP 50 mM en HEPES 0.5 M pH 7.6.

Solución M: Se prepara mezclando:

2 ml de la solución HEPES

1 ml de la solución PEP

0.5 ml de la solución NADH

1 ml de la solución ATP

0.24 ml de la PK/LDH (700 y 1000 U/ml, respectivamente)

5. Inducción del promotor de *CHAI*

La inducción de *CHAI* en una cepa se probó introduciendo en ella una fusión traduccional del promotor de *CHAI* con el gen *lacZ* de *E. coli* y midiendo el nivel de actividad β -galactosidasa.

Las cepas de levadura se transformaron con el plásmido pTK120, que porta la fusión traduccional *pCHAI-lacZ* (Bornæs, 1991). Los niveles de actividad β -galactosidasa se determinaron como se describe en Remacle y Holmberg (1992). A partir de una colonia crecida en medio selectivo para los transformantes, se inoculó un tubo conteniendo 10 ml del medio que se especifica en cada caso, y se incubó a 30 °C con agitación hasta alcanzar una $DO_{660} = 0.2$ a 0.4 (fase exponencial). Las células se recogieron mediante centrifugación, se lavaron con agua bidestilada y se resuspendieron en 1 ml de la solución de permeabilización. Tras agitarla durante unos 10 segundos, la suspensión se mantuvo a -80 °C durante 12 horas o, alternativamente, se congeló en nitrógeno líquido y se descongeló 2 veces consecutivas. A continuación, las células se lavaron con tampón Z y se resuspendieron en el mismo tampón, quedando entonces listas para los ensayos.

La actividad β -galactosidasa se ensayó en tubos tipo Eppendorf, conteniendo 0.7 ml de tampón Z a los que se añadió 0.1 ml de la suspensión de células. La mezcla se mantuvo durante unos minutos en un baño a 28 °C, tras lo cual se añadió 0.2 ml de una solución de ONPG en agua bidestilada, a una concentración de 4 mg/ml. La mezcla se incubó a

28 °C durante un tiempo comprendido entre 10 minutos y 2 horas, hasta que adquirió un tono amarillo, transcurrido el cual se paró la reacción añadiendo 0.5 ml de una solución 1 M de Na₂CO₃. Una vez sedimentadas las células por centrifugación, se midió la DO₄₂₀ del sobrenadante en un espectrofotómetro Beckman DU[®] 640. La actividad β-galactosidasa se estimó según la fórmula

$$U = 8823.5 \cdot DO_{420} \cdot DO_{660}^{-1} \cdot t^{-1}$$

donde

| | |
|-------------------|---|
| U | = número de unidades Miller |
| DO ₄₂₀ | = densidad óptica a 420 nm |
| DO ₆₆₀ | = densidad óptica a 660 nm de la suspensión celular |
| t | = tiempo de reacción (minutos) |

Como valor de actividad se tomó la media aritmética de los valores obtenidos para al menos 2 transformantes independientes, ensayados por duplicado.

Solución de permeabilización: Contiene Triton[®] X-100 al 0.01% en tampón Z.

Tampón Z: Contiene KCl 10mM, MgSO₄ 1 mM y β-mercaptoetanol 50 mM, en tampón fosfato sódico 0.1 M pH 7.0.

6. Cuantificación de aminoácidos

La concentración de aminoácidos presentes en lisados celulares o en el medio de cultivo se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa.

Para la preparación de los lisados las células de un cultivo en medio mínimo SD con los suplementos nutritivos adecuados se recogían por centrifugación. El sobrenadante se usó para determinar la cantidad de aminoácidos en el medio de cultivo. Las células se lavaron dos veces con agua estéril y se hirvieron durante 15 minutos. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación (1 min. a 13.000 rpm en una centrífuga Eppendorf) y el sobrenadante se utilizaba para determinar la concentración interna de aminoácidos.

Para separación y cuantificación se utilizó un cromatógrafo Waters equipado con dos bombas (modelos 501 y 510), una columna Waters Resolve™ C18 (3.9 mm x 150 mm), un inyector automático (Waters 715 ULTRA WISP) y un detector de fluorescencia (Waters 420-AC). Para el control del sistema y el análisis de los datos se utilizó el programa Baseline 810 de Waters.

La derivatización de los aminoácidos tuvo lugar durante 90 segundos tras mezclar 75 µl de mezcla derivatizante y 25 µl de la muestra a analizar. La resolución de los aminoácidos derivatizados se llevó a cabo usando un gradiente lineal de 100% de solvente A a 100% de solvente B durante 33 minutos, aplicando un flujo de 1.2 ml/min. Como patrón se usó una solución de aminoácidos en HCl 0.1N diluída 20 veces.

Mezcla derivatizante: Contiene una solución 40 mM de borato sódico pH 10, y ftaldialdehído disuelto en metanol (54 mg/ml), en una proporción 9:1. A cada 5 ml de esta mezcla se le añade 0.2 ml de β-mercaptoetanol (Martínez-Force y Benítez, 1991).

Solvente A: Se compone de metanol, tetrahidrofurano y un tampón (Na₂HPO₄ 50 mM y acetato sódico 50 mM ajustado a pH 7.5 con ácido acético glacial) en una proporción 2:2:96.

Solvente B: Se compone de metanol y agua en una proporción 65:35.

En todos los casos se utilizó agua destilada desionizada

7. Determinación de la excreción de treonina

Se considera que una cepa de *S. cerevisiae* es excretora de treonina cuando es capaz de alimentar un césped de otra cepa auxótrofa para treonina a la que se denomina cepa indicadora (Delgado *et al.*, 1982; Ramos, 1990).

La cepa indicadora F4 se cultivó en 5 ml de medio YPD hasta fase estacionaria. Las células de este cultivo se recogieron mediante centrifugación, se lavaron 2 veces con agua destilada y se sembraron a razón de unas 10⁶ células por caja, en medio mínimo SD con los suplementos nutritivos necesarios para la cepa a probar. Sobre el césped se sembraron con palillos de dientes estériles las colonias que se querían probar. Las cajas se incubaban durante 7 días a 30°C, transcurridos los cuales las cepas excretoras presentaban un halo de crecimiento del césped.

8. Transporte de L-treonina y L-citrulina

Los ensayos de transporte de treonina y citrulina se llevaron a cabo utilizando aminoácidos marcados con ^{14}C (L-[ureido- ^{14}C] treonina y L-[carbamoil- ^{14}C] citrulina).

Las células, se cultivaron en medio SD hasta una concentración aproximada de 10^7 células/ml (fase exponencial), se recogieron por centrifugación, se lavaron y resuspendieron en el mismo medio de cultivo. Para cada ensayo, a la suspensión de células se añadía treonina marcada (0.8 Ci/mol de treonina) a una concentración final de 0.2 mM, o bien citrulina marcada (1.6 Ci/mol de citrulina) a una concentración final de 0.1 mM; la mezcla se incubaba a 30 °C. A distintos tiempos se tomaron muestras de 130 μl que se filtraron utilizando filtros Millipore de 0.45 μm de tamaño de poro. Cada filtro conteniendo las células se introdujo en un vial con líquido de centelleo; , la radiactividad de cada vial se midió en un contador de centelleo automático. La radiactividad total de cada muestra se estimó añadiendo a un vial con líquido de centelleo 130 μl de mezcla sin filtrar. Como control se estimó la radiactividad de una muestra de 130 μl de una mezcla preparada con células que habían sido inactivadas previamente por calor (10 min a 100 °C).

La cantidad de aminoácido incorporado, expresada en nmoles/mg de peso seco, se calculó utilizando la fórmula siguiente:

$$(\text{cpm}_t - \text{cpm}_{ch}) \cdot [\text{a.a}] \cdot \text{cpmT}^{-1} \cdot (0.26 \cdot \text{DO}_{660})^{-1}$$

donde:

cpm_t = cuentas/minuto de la muestra filtrada a tiempo t

cpm_{ch} = cuentas/minuto de la muestra preparada con células hervidas

cpmT = cuentas/minuto de la muestra no filtrada

[a.a] = concentración del aminoácido en la mezcla del ensayo (μM)

DO_{660} = Absorbancia de la mezcla del ensayo a 660 nm

9. Transformación de *E. coli*

Se siguió el método del cloruro de calcio, basado en el descrito por Inoue *et al.* (1990) con ligeras variaciones.

Preparación de células competentes

Se mantenían en hielo,

Las células se prepararon a partir de 250 ml de un cultivo de la estirpe DH5 α de *E. coli* en medio SOB a DO₆₆₀ de 0.6, incubado a 22°C. Antes de recoger las células por centrifugación (2500 g a 4 °C), el cultivo se mantuvo en hielo durante 10 minutos. El precipitado se resuspendía en 80 ml de solución TB fría y tras 10 minutos en hielo, se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. La biomasa se resuspendió en 20 ml de TB y se añadió DMSO a una concentración final del 7%. Tras mantener 10 minutos en hielo, se repartió la suspensión en alícuotas de 600 μ l y se congeló en nitrógeno líquido. Las células competentes así preparadas se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Transformación

A 100-200 μ l de células competentes se les añadió 5-10 μ l de la solución de ADN transformante. La mezcla se mantuvo en hielo durante 40 minutos, transcurridos los cuales se sometió a un choque térmico de 90 segundos a 42°C. A esta suspensión de células se le añadió 1 ml de medio LB y se incubó a 37°C durante 1 hora antes de sembrarlas en cajas de medio selectivo.

Solución TB: Contiene PIPES 10 mM, CaCl₂ 15 mM y KCl 250 mM. Se ajusta a pH 6.7 con KOH y se añade MnCl₂ a una concentración final de 55 mM (Inoue *et al.*, 1990).

Medio SOB: Constituido por extracto de levadura al 0.5%, bacto-triptona al 2%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM y MgSO₄ 10 mM. Este medio es una modificación del descrito en Sambrook *et al.*, 1989.

10. Transformación de *S. cerevisiae*

Se siguió el método del acetato de litio descrito por Gietz *et al.* (1992).

Células de un cultivo a 30 °C en 10 ml de medio YPD que había alcanzado una DO₆₆₀ de 0.6-0.8 se recogieron mediante centrifugación, se lavaron con 1 ml de agua y después con 1 ml de solución TE/AcLi preparada recientemente, y se resuspendieron en 0.2-0.5 ml de la misma solución. Para cada transformación se usaron 50 µl de la suspensión de células a la que se añadió 5-10 µl de la solución de ADN transformante y 5 µl de ADN de esperma de salmón (10 mg/ml), previamente tratado según Sambrook *et al.* (1989). A esta mezcla se añadió 300 µl de solución PEG y se incubó a 30 °C durante 30 min con agitación. La suspensión se sometió a un choque térmico a 42 °C durante 15 min tras el cual se recogieron las células, se lavaron dos veces con agua destilada y se resuspendieron en unos 200 µl de agua antes de sembrarlas en medio selectivo.

Solución TE/AcLi: Contiene acetato de litio 0.1M en tampón TE pH 7.5 (Gietz *et al.*, 1992)

Solución PEG: Contiene polietilenglicol 4000 al 40% en solución TE/AcLi.

Tampón TE: Consiste en una solución de EDTA, 1 mM, en tampón Tris-HCl 10 mM (solución de Tris ajustada al pH requerido con HCl; Sambrook *et al.*, 1989).

11. Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

Se siguió el método de lisis alcalina descrito por Jones y Schofield (1990).

Las células cultivadas en 1.5 a 5 ml de medio selectivo para el marcador del plásmido se recogieron mediante centrifugación, se resuspendieron en 150 µl de Solución 1, se les añadieron 250 µl de Solución 2 y se mantuvieron en hielo durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se añadieron 225 µl de Solución 3 y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min en centrífuga Eppendorf. Se recogió el sobrenadante y se sometió a una precipitación con etanol (apartado 5.2 de Metodos). Cuando se requería una mayor pureza de la preparación, antes de la precipitación la solución se trataba con fenol (apartado 5.1 de Métodos). En cualquier caso, al final el precipitado se resuspendía en 50-200 µl de TE pH 8. Cuando era necesaria la eliminación del ARN de la preparación,

ésta se trataba con ARNasa según se describe en Sambrook *et al.* (1989) y se volvía a precipitar con etanol.

Solución 1: Contiene glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8 (solución de Tris ajustada a pH 8 con HCl; Gomori, 1955) y EDTA 10 mM pH 8 (Sambrook *et al.*, 1989).

Solución 2: Contiene NaOH 0.2 M y SDS al 1% (Sambrook *et al.*, 1989).

Solución 3: Contiene acetato potásico 3 M pH 4.8

Tampón TE: Solución de EDTA, 1 mM, en tampón Tris-HCl 10 mM (solución de Tris ajustada al pH requerido con HCl).

12. Extracción de ADN total de *S. cerevisiae*

El método utilizado fué, esencialmente, el descrito por Sherman *et al.* (1986), y se usó normalmente para transferir plásmidos de levaduras a bacterias.

La extracción se llevaba a cabo partiendo de 5ml de un cultivo en fase estacionaria, en medio YPD o en medio SD con los suplementos nutritivos adecuados. Las células, recogidas por centrifugación y lavadas con agua estéril, se resuspendieron en 0.32 ml de la Solución I, se pasaban a un tubo Eppendorf y se les añadía 3.2 μ l de una dilución 1:10 de β -mercaptoetanol en agua y 10 μ l de una solución de 15 mg/ml de Zimoliasa 20 T y se incubaban durante una hora a 37°C. Transcurrido este tiempo, las células se recogieron mediante centrifugación (30 segundos a 13.000 rpm), se resuspendieron en 0.37 ml de la Solución II y se les añadió 16 μ l de una solución al 10% de SDS. Tras 30 minutos de incubación a 65°C, se añadió 85 μ l de la solución III y se mantuvo la mezcla en hielo durante 1 hora. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación (15 min. a 13.000 rpm); los ácidos nucleicos, precipitados mediante adición de etanol al sobrenadante, se resuspendieron en 0.3 ml de tampón TE pH 7.5, se trataron con ARNasa a una concentración de 50 μ g/ml y, posteriormente, con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (apartado 5.1 de Métodos). El ADN se obtenía de la fase acuosa por medio de una nueva precipitación con etanol y finalmente se disolvió en 20 μ l de tampón TE pH 7.5. Generalmente, 10 μ l de esta solución eran suficientes para transformar *E. coli*.

Solución I: Contiene sorbitol 0.9 M, EDTA 0.1 M pH 8

Solución II: Contiene EDTA 20 mM en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8 (solución de Tris ajustada a pH 8 con HCl).

Solución III: Contiene acetato potásico 3 M pH 4.8

Tampón TE: Solución de EDTA, 1 mM, en tampón Tris-HCl 10 mM (solución de Tris ajustada al pH requerido con HCl).

13. Purificación y concentración de ADN

13.1. Tratamiento con fenol

Se usó para eliminar las proteínas de una solución.

Se añadía un volumen de una solución que contenía fenol: cloroformo: alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 y se mezclaba bien. Se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. y se recogió la fase acuosa.

13.2. Precipitación con etanol

Se usó para concentrar muestras de ácidos nucleicos.

A un volumen de la solución se añadían 2-3 volúmenes de etanol 96° y 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M pH 5.2. La mezcla se centrifugaba en un tubo Eppendorf a 13000 rpm durante 15 min, se recogió el precipitado y se lavó con 0.7 ml de etanol 70° y, tras recuperarlo por centrifugación a 13000 rpm durante 1 min, se resuspendió en tampón TE pH 7.5.

Tampón TE: Solución de EDTA, 1 mM, en tampón Tris-HCl 10 mM (solución de Tris ajustada al pH requerido con HCl).

14. Cuantificación de ADN

La cantidad de ADN presente en una solución se estimó mediante dos métodos

14.1. Espectrofotometría

Se siguió el método descrito por Sambrook *et al.* (1989). Según estos autores, una DO₂₆₀ de 1 corresponde aproximadamente a 50 µg/ml de

ADN bicatenario, 40 $\mu\text{g/ml}$ de ADN unicatenario y 20 $\mu\text{g/ml}$ de oligonucleótido de cadena simple. En base a esta relación, se estimó la concentración de una solución de ADN mediante medición de su DO_{260} .

14.2. Tinción con bromuro de etidio

Según describen Sambrook *et al.* (1989) la fluorescencia emitida por el bromuro de etidio intercalado en el ADN es proporcional a la masa de ADN. Así, puede estimarse la concentración de ADN de una solución, tras electroforesis en gel de agarosa, comparando la fluorescencia emitida por la banda en cuestión con la de patrones de ADN de concentración conocida. Como patrones se usó ADN del fago lambda digerido con *EcoRI*, con *HindIII*, o con las dos enzimas simultáneamente.

15. Manipulación enzimática del ADN

En la manipulación con enzimas de restricción y modificadoras del ADN se siguieron básicamente las indicaciones de Sambrook *et al.* (1989). A continuación se describen brevemente las condiciones en que se realizaron cada una de las reacciones con las diferentes enzimas.

15.1. Digestión con enzimas de restricción

Se usaron los tampones recomendados por la firma proveedora de las enzimas, y las reacciones se incubaron a 37 °C (o a 25 °C, en el caso de *SmaI*) un mínimo de 2 horas.

Cuando era necesario obtener un fragmento de ADN por medio de digestión parcial, ésta se llevaba a cabo sometiendo la preparación de ADN a un tiempo corto de tratamiento con la enzima correspondiente, transcurrido el cual se paraba la reacción añadiendo EDTA pH 8, a una concentración final de 12.5 mM y calentando a 60°C durante 20 min para inactivar la enzima. La duración óptima del tratamiento con la enzima de restricción se determinaba mediante una prueba previa, en la cual se obtenían muestras a distintos tiempos.

15.2. Tratamiento con el fragmento Klenow de la polimerasa de ADN I de *E. coli*

Esta reacción se usó para transformar en romo un extremo de ADN de cadena doble, cortado en bisel, con cadena 5' protuberante. Para ello, una preparación del ADN digerido con la restrictasa se trató con 0.2 U/ μ l de la enzima, en presencia de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato, a una concentración final de 25 μ M cada uno. En estas condiciones, la actividad principal de la enzima es polimerasa.

15.3. Tratamiento con la polimerasa de ADN del fago T4

Similar al descrito para la polimerasa de Klenow, pero utilizado cuando la cadena protuberante era la 3'. Los productos de digestión se incubaban a 37 °C durante 15 min. con 2 mU/ μ l de la enzima, en presencia de los cuatro dNTP, a una concentración final de 0.1 μ M, y BSA, 0.2 mg/ml, en tampón de la polimerasa. En estas condiciones, resultado neto de la reacción es la degradación del extremo 3' protuberante.

Tampón para la polimerasa de ADN de T4 (10x): Contiene acetato potásico 0.66 M, acetato magnésico 0.1 M y DTT 5 mM, en tampón Tris-acetato 0.33 M pH 7.9 (solución de Tris ajustada al pH 7.9 con ácido acético glacial).

15.4. Tratamiento con ADN ligasa del fago T4

La ligación de un fragmento de ADN a un vector se llevó a cabo mezclando el vector, previamente cortado, y el inserto en una proporción molar aproximada de 1:3, siendo la concentración final de ADN en la mezcla de reacción de aproximadamente 10 ng/ μ l. Se usó el tampón proporcionado por el fabricante. Las reacciones se incubaron a 16°C durante 12-16 horas.

Tampón de ligasa de T4 (10x): Contiene MgCl₂ 50 mM, DTE 10 mM y ATP 10 mM, en tampón Tris-HCl 0.66 M pH 7.5 (solución de Tris ajustada al pH 7.5 con HCl).

15.5 Tratamiento con exonucleasa I de *E. coli*

Esta reacción se usó para eliminar de una mezcla de PCR, las moléculas de cebador no incorporadas a lo largo del proceso de síntesis. La mezcla de reacción de PCR se incubaba con exonucleasa I a 37 °C durante 15 min tras lo cual se inactivaba la enzima calentando durante 15 min a 80 °C.

16. Secuenciación de ADN

Se llevó a mediante dos procedimientos distintos, uno manual y otro automático

16.1 Procedimiento manual

Se siguió el método de terminación de síntesis de las cadenas (Sanger *et al*, 1977), utilizando el kit "Sequenase 2.0" (United States Biochemical Corporation). La marca radiactiva se introdujo con [α -³⁵S] dATP.

Se partió de una solución que contenía, aproximadamente, 1 μ g de ADN plasmídico en 10 μ l de una mezcla que llevaba NaOH 0.1 M, y 10 pmoles del cebador correspondiente. El ADN se disoció a 68° C durante 10 minutos, y tras añadir 1 μ l de tampón TDMN (3X) se permitía la hibridación entre el cebador y el ADN molde incubando otros 10 minutos a temperatura ambiente. La marca radiactiva de las cadenas se realizó añadiendo a esta mezcla los cuatro dNTPs (aproximadamente 40 nM de cada uno de ellos), de los cuales sólo el dATP estaba marcado radiactivamente, y 3 U de polimerasa, diluída 9 veces en el tampón suministrado en el kit.

Cuando se trataba de secuenciar segmentos próximos al cebador, se añadió también 1 μ l de una solución de MnCl₂ 0.1 M e isocitrato sódico 0.15 M. Tras unos 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, 3.5 μ l de la mezcla de reacción se añadían a 2.5 μ l de cada una de las soluciones de terminación de síntesis, las cuales contenían 80 μ M de cada uno de los 4 dNTPs más 8 μ M del didesoxinucleótido (ddNTP) correspondiente. La reacción se mantuvo a 37 °C durante otros 5 min con lo cual se producía la elongación de las cadenas y su terminación por la incorporación a las mismas de los ddNTPs. Las reacciones se paraban añadiendo 4 μ l de Solución "Stop" y las cadenas generadas se disociaban,

calentando a 85 °C antes de resolverlas en un gel desnaturante de poliacrilamida-urea. El tampón de electroforesis era 0.8X TBE. La bandas se detectaban en una película de rayos X expuesta a las radiaciones del gel.

16.2 Procedimiento automático

Se llevó a cabo por la empresa Medigene (Martinsried, Alemania), donde se usó un secuenciador automático ABI 377 de Applied Biosystems, aplicando un método de terminación de las cadenas similar al anteriormente descrito, pero utilizando dideoxinucleótidos fluorescentes (Obermaier y Domdey, 1992).

Tampón TDMN (3x): Contiene TES (ácido N-tris[Hydroximetil]metil-2-aminoetanosulfónico) 0.84 M, HCl 0.36 M, DTT 0.15 M, MgCl₂ 0.24 M y NaCl 0.6 M

Solución "Stop": Contiene formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0.05% y xileno cianol 0.05%.

Gel desnaturante de poliacrilamida-urea: Contiene acrilamida 7.6%, bisacrilamida 0.4% y urea 8M en tampón TBE.

6.29. Tampón TBE (5x): Contiene Tris 0.45 M, ácido bórico 0.44 M y EDTA 10 mM pH 8 (Sambrook *et al.*, 1989).

17. Electroforesis convencional de ADN en gel de agarosa

La resolución de fragmentos de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa se llevó a cabo según se describe en Sambrook *et al.* (1989). La concentración de agarosa en los geles fue del 0.6-1%, según el tamaño de los fragmentos a analizar, y se usó tampón TAE 1x. Los geles se sumergían en el mismo tampón contenido en cubetas horizontales de electroforesis y se sometían a un voltaje de aproximadamente 5 V/cm de longitud del gel. Como patrón de tamaño se usó una "escalera" de 1 kb (Gibco BRL) o ADN del fago lambda digerido con *Hind*III, con *Eco*RI o con las dos enzimas simultáneamente. Las muestras se densificaron añadiendo 1/5 de volumen de tampón de carga. La tinción del ADN se realizó añadiendo al gel bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml. El gel, iluminado con luz ultravioleta (300 nm) procedente de un transiluminador Fotodyne UV-3-3002 (New Berlin, Wisconsin,

EE.UU.) se fotografió con una cámara Polaroid MP4 equipada con un filtro Kodak Wratten 22A y película instantánea Polaroid ISO 3000/36° tipo 667; alternativamente su imagen se registraba su imagen con un analizador electrónico (ImageStore 5000, Ultra Violet Products, UVP).

Tampón TAE (50x): Contiene Tris 2 M, ácido acético glacial 1 M y EDTA 50 mM pH 8 (Sambrook *et al.*, 1989).

Tampón de carga (5x): Constituido por Ficol 400 15% y azul de bromofenol 0.25% (modificado a partir de Sambrook *et al.*, 1989).

18. Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

El método utilizado, basado en el kit GeneClean de BIO 101 Inc. (La Jolla, California, EE.UU.), permite la extracción de fragmentos de ADN de un gel mediante fusión de la agarosa, adsorción del ADN a partículas de vidrio y su posterior elución.

Se cortaba con una bisturí y se colocaba en un vial la banda del gel, preparado con tampón TAE que contenía el fragmento de ADN de interés y se añadían tres volúmenes de solución NaI. Se calentó a 50 °C durante 10 min hasta que se disolvía la agarosa. Se añadían 5 µl de la suspensión de partículas de vidrio, se mezclaba y se mantenía 10 min. en hielo. A continuación se centrifugaba esta suspensión y se lavaba tres veces con 250 µl de solución de etanol/sales. Se resuspendía el precipitado en 20-40 µl de TE para eluir el ADN, se incubaba a 45 °C durante 5 min. y, tras centrifugar, se recogía el sobrenadante.

Tampón TAE (50x): Contiene Tris 2 M, ácido acético glacial 1 M y EDTA 50 mM pH 8 (Sambrook *et al.*, 1989).

Solución NaI: Se disuelven 45 g de NaI en 50 ml de agua destilada y se añade 5 g de Na₂SO₃ anhidro. Tras agitación durante una hora se filtra la solución para eliminar los cristales no disueltos y se almacena a 4°C protegida de la luz.

Suspensión de partículas de vidrio: Se prepara reduciendo a un fino polvo 0.5 g de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/F o GF/C). Esta matriz se lava tres veces con 10 ml de agua destilada y el precipitado se resuspende en 0.5 ml de agua.

Solución de etanol/sales: Contiene Tris-HCl 9 mM pH 7.2 (solución de Tris ajustada a pH 7.2 con HCl), NaCl 90 mM, EDTA 1 mM pH 8 y etanol al 55%.

Tampón TE: Solución de EDTA, 1 mM, en tampón Tris-HCl 10 mM (solución de Tris ajustada al pH requerido con HCl).

19. Obtención de diploides de *S. cerevisiae*

Los cruzamientos de cepas para obtener diploides se llevaron a cabo según los métodos convencionales descritos en Sherman y Hicks (1991).

Se tomaban cantidades equivalentes de biomasa de cada uno de los conjugantes y se mezclaban en una gota de agua destilada estéril depositada sobre una caja de medio YPD. La mezcla conjugante se incubaba a 30°C durante 3-4 horas.

Para aislar los diploides se utilizaron tres métodos distintos según el genotipo de los conjugantes:

19.1. Selección de los diploides por complementación de auxotrofías. Cuando las dos cepas parentales poseían auxotrofías complementarias, la mezcla conjugante se replicó mediante terciopelo a medio selectivo en el que sólo pudiera crecer el diploide formado.

19.2. Micromanipulación de cigotos. Cuando los diploides no eran seleccionables fenotípicamente, éstos se separaban de la mezcla conjugante mediante un micromanipulador (Lawrence Precision Machines, Hayward, California, EE.UU) fijado a un microscopio Olympus CK2 y dotado de una microaguja de fibra de vidrio. La separación se hacía sobre una caja de medio YPD. El carácter diploide de las células aisladas se comprobaba por su capacidad de esporular en las condiciones apropiadas.

19.3. Selección de los diploides por tamaño de colonia. A partir de la biomasa conjugante se aislaban colonias en medio rico. Se seleccionaban

varias colonias de entre las de mayor tamaño y se probaba su capacidad de esporular.

20. Esporulación y análisis de tétradas

Este método permite estimar el ligamiento entre caracteres mediante el análisis de la segregación de diferentes marcadores heterocigóticos en las cuatro esporas de una asca. Esencialmente se siguió el método descrito en Sherman *et al.* (1986). Para ello se inducía la esporulación en células diploides y los productos meióticos resultantes se separaban mediante micromanipulación.

La biomasa del diploide que se deseaba esporular se transfería, mediante réplica con terciopelo, a una caja de medio de preesporulación que se incubaba durante 24 horas a 30°C. Transcurrido este tiempo, la biomasa se transfería a una caja de medio de esporulación y se incubaba a 22 °C durante al menos 4 días.

Medio de preesporulación: Contiene extracto de levadura 0.8%, bacto-peptona 0.3% y glucosa 10% (Sherman *et al.*, 1986).

Medio de esporulación: Constituido por extracto de levadura 0.1%, acetato potásico 1% y glucosa 0.05% (Sherman *et al.*, 1986).

Para digerir las paredes de las ascas, una pequeña cantidad de biomasa esporulada se trató con 2 mg/ml de Zimoliasa 20-T durante 3 min. Parte de la biomasa se extendió sobre una caja conteniendo medio YPD. Las esporas de cada asca se separaban mediante micromanipulación con el sistema descrito anteriormente para el aislamiento de cigotos, se incubaban a 30 °C durante 48 horas y las colonias aparecidas se sembraban en los medios apropiados para determinar su fenotipo.

21. Determinación del sexo

Para determinar el sexo de una cepa determinada se cruzaba ésta por dos cepas de sexo conocido. Tras incubar la mezcla conjugante durante 3-4 horas a 30 °C, se observó al microscopio la formación de cigotos. Cuando las cepas a conjugarse tenían auxotrofías complementarias, la

formación de diploides se detectó transfiriendo la mezcla conjugante a cajas conteniendo medio selectivo para los mismos.

22. Mutagénesis con EMS

Se utilizó para obtener mutantes sensibles a treonina. Se llevó a cabo según el método descrito por Lawrence (1991), con ligeras variaciones.

Células de la cepa S288C procedentes de un cultivo en medio YPD en fase estacionaria (aproximadamente 10^8 células/ml) se recogieron por centrifugación y resuspendieron en tampón fosfato sódico 0.1 M pH 7. A 1 ml de esta suspensión se añadió 30 μ l de EMS, y la mezcla se incubó a 30 °C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, el mutágeno se neutralizó añadiendo 9 ml de una solución de tiosulfato sódico al 5%, y las células mutagenizadas se sembraron en cajas de medio YPD. El número de colonias aparecidas tras la mutagénesis se comparó con el obtenido a partir de la suspensión de células sin mutagenizar, calculándose así el porcentaje de células supervivientes a la mutagénesis.

23. Selección de mutantes *ura3* por resistencia a ácido 5-fluoro-orótico (5-FOA)

Este método se basa en la toxicidad selectiva del 5-FOA para las cepas *Ura3*⁺ (Boeke *et al.*, 1984).

Cajas que contenían 5-FOA se sembraron con la cepa en cuestión, previamente cultivada en medio YPD líquido, a razón de unas $5 \cdot 10^7$ células por caja, y se incubaron a 30°C durante una semana. La frecuencia de aparición de colonias resistentes fue siempre inferior a 10^{-7} . De entre los mutantes aparecidos, se seleccionaron aquellos que presentaban una menor frecuencia de reversión (entre 10^{-7} y 10^{-8}) según se comprobó sembrando una suspensión de cada uno de ellos en medio que carecía de uracilo. Los mutantes seleccionados se cruzaron por una cepa *Ura3*⁻ de sexo contrario. Para el trabajo posterior se eligieron aquellos que daban lugar a diploides *Ura*⁻.

Medio con 5-FOA: Se preparó añadiendo 750 mg/l de 5-FOA a medio SD con los suplementos nutritivos a la concentración recomendada por Sherman *et al.* (1986), salvo el uracilo que se añadía a la mitad de la cantidad habitual (Boeke *et al.*, 1984). La adición del 5-FOA se realizó después de haber esterilizado el medio e inmediatamente antes de distribuirlo en cajas de Petri.

24. Construcción de la cepa R7.C1.chal.

La cepa R7.C1.chal se obtuvo a partir de la R7.C1 por interrupción en esta última del gen *CHAI*, siguiendo el método de sustitución alélica descrito por Winston *et al.* (1983).

Para ello se utilizó el plásmido integrativo pICG9, que porta la construcción *chal::GAL1p-PCR1* (Figura 9) consistente en el gen *CHAI* con una inserción, realizada *in vitro*, del gen de la carboxipeptidasa Y de *S. cerevisiae* bajo el control del promotor del gen *GAL1* (Nielsen *et al.*, 1990).

Como se muestra en la Figura 9, la interrupción se realizó mediante dos pasos sucesivos: (1) la transformación con el plásmido y su integración en el genoma mediante recombinación homóloga entre las copia cromosómica y plasmídica de *CHAI*, y (2), la selección de derivados del transformante obtenido en el paso anterior, en los que el plásmido se haya escindido (igualmente por recombinación homóloga), pero que haya dejado en el cromosoma la copia interrumpida de *CHAI*.

Con el fin de aumentar la frecuencia de integración de pICG9 en el locus *CHAI*, el plásmido se sometió a una digestión parcial con *NruI* antes de la transformación. Los transformantes se seleccionaron sembrando en medio SD con isoleucina.

A partir de uno de los transformantes, se obtuvieron cepas Ura3⁻, seleccionándolos en medio con 5-FOA (ver apartado 6 de Metodos). De entre los clones así obtenidos, se seleccionó uno que no crecía en medio SDser, es decir, era incapaz de utilizar serina como fuente de nitrógeno, muy probablemente por carecer de la serina/treonina deaminasa catabólica, producto del gen *CHAI*.

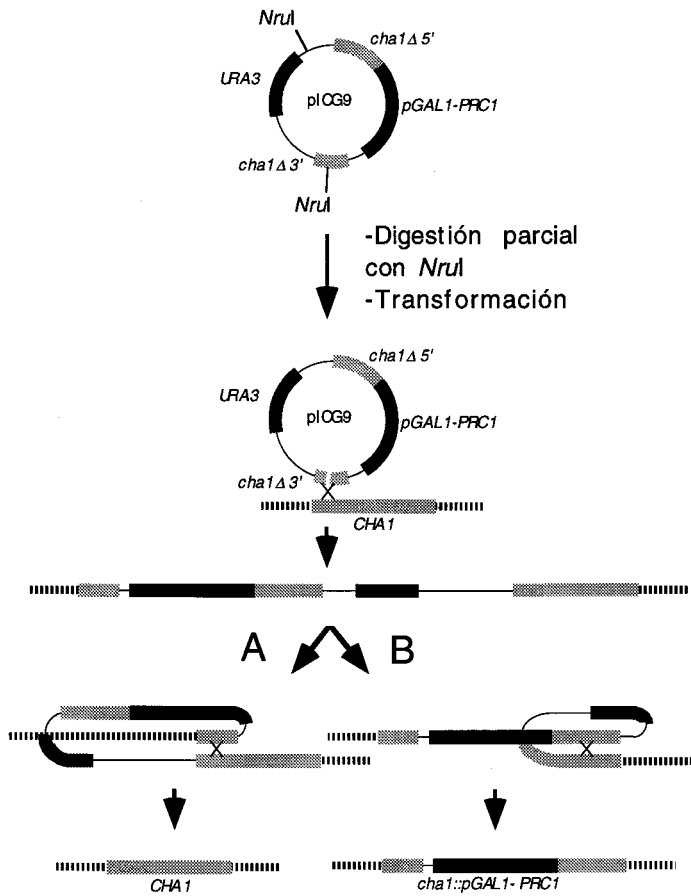


Figura 2.9. Obtención de una cepa de levadura con el gen *CHA1* interrumpido. La pérdida del marcador *URA3* previamente integrado puede darse de dos maneras distintas. Una de ellas (B) resulta en la sustitución del alelo *CHA1* silvestre por el alelo interrumpido *cha1::pGAL1-PRC1*.

25. Construcción de la cepa HT1

La cepa HT1 se obtuvo a partir de la SG76 por interrupción en esta última del gen *HOM3* (Figura 10), siguiendo el método de sustitución alélica en un sólo paso descrito por Rothstein (1983).

Para ello, se construyó primero el plásmido recombinante pMA50, que portaba el marcador *TRP1* de *S. cerevisiae* flanqueado por secuencias adyacentes a la región cromosómica que se pretendía eliminar. Tras digerir este plásmido con las enzimas de restricción *Bgl*II y *Bam*HI se aisló el fragmento de 1.54 kb conteniendo a *TRP1* flanqueado por 0.30 kb y 0.39 kb, respectivamente, de las secuencias flanqueantes. Este fragmento se utilizó para transformar la cepa SG76. De 8 transformantes *Trp*⁺, seleccionados en medio SD+ile+ura+thr+met, 4 resultaron ser auxótrofos para treonina y metionina. Una de estas cepas, HT1, se escogió para estudios posteriores.

Con el fin de caracterizar mejor la mutación *hom3* presente en HT1, se cruzó esta cepa con la cepa *trp1* AWY-1B. Los diploides resultantes se esporularon y un total de 26 productos meióticos se aislaron mediante micromanipulación de tétradas. Se observó que todos los productos *Hom*⁻ (8 en total) eran *Trp*⁺ y que todos los productos *Hom*⁺ (un total de 18) eran *Trp*⁻. El ligamiento observado entre los fenotipos *Hom*⁻ y *Trp*⁺ era el esperado si la integración del fragmento que contiene a *TRP1* hubiera tenido lugar en el locus *HOM3*.

Con el fin de analizar el alelo *hom3* de HT1, se amplificó mediante PCR la región presuntamente implicada. Para ello, se obtuvo primero ADN total de esta cepa y se preparó una mezcla de reacción que contenía 10 ng del ADN así obtenido, más 50 pmoles de cada uno de los cebadores *HOMpriA* y *HOMpriB* (ver Figura 1.6 de Materiales), los cuatro dNTP a una concentración de 200 μ M cada uno, y 5 U de la polimerasa *TaqPlus*TM, todo ello en un volumen total de 50 μ l de tampón para la polimerasa. Como experimento control, se preparó otra mezcla idéntica a la anterior, a excepción del ADN molde que, en este caso, procedía de una preparación de ADN total de la cepa SG76, de la que procede HT1. En ambos casos, la mezcla de reacción se sometió a 35 ciclos con periodos de 30 segundos a 94 °C para disociar las moléculas de ADN, 40 segundos a 50 °C para permitir la hibridación entre las cadenas del ADN molde y los cebadores, y 4 minutos a 72 °C para la síntesis de nuevas cadenas. Se

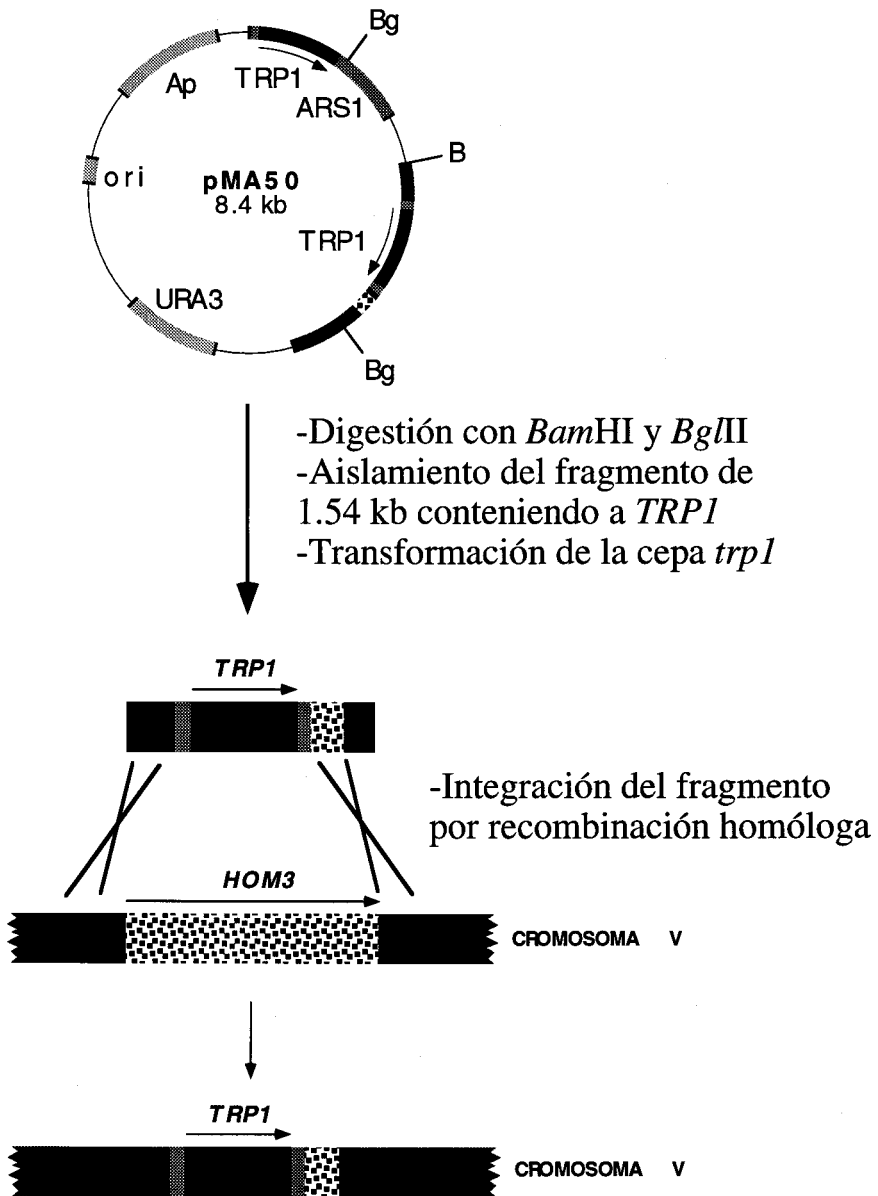


Figura 2.10. Interrupción del locus *HOM3* por integración de un fragmento que contiene al marcador *TRP1*. B, *Bam*HI; Bg, *Bg*III.

utilizó un termociclador GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin Elmer, Norwalk, EE.UU.)

El análisis mediante electroforesis en gel de agarosa de los productos de estas amplificaciones reveló que, en la reacción con ADN procedente de la cepa SG76 se amplificó un único fragmento, cuyo tamaño coincidía con el esperado de 1.9 kb, correspondiente a la región de *HOM3* comprendida entre los pares de bases nº 151 y 2064. Cuando el ADN molde procedía de la cepa HT1, el producto de la amplificación presentó un tamaño de 1.4 kb, que concordaba con el esperado al sustituir en *HOM3* un fragmento de 1430 pares de bases por el de 852 pares de bases que contenía al marcador *TRP1*. Estos resultados demuestran que la cepa HT1 porta el alelo *hom3::TRP1*.

Polimerasa *TaqPlus*TM: De *Thermus aquaticus*; suministrada por Stratagene (La Jolla, California, EE.UU).

Tampón *TaqPlus*TM : Contiene KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM; MgSO₄ 2 mM, Triton® X-100 0.1%; y 0.1 mg/ml de BSA en Tris-HCl 20 mM pH 8.75 (solución de Tris ajustada al pH 8.75 con HCl).

26. Clonación de los alelos *HOM3*

Para llevar a clonar los alelos mutantes de *HOM3* se utilizó el método del rescate alélico descrito por Orr-Weaver y Szostak (1983).

Este método se basa en que cuando se transforma una cepa de *S. cerevisiae* con un plásmido al que se ha delecionado una región determinada de un gen y que contiene una rotura de doble cadena adyacente a esa región, con cierta frecuencia se produce la reparación de la delección por recombinación con la copia intacta del genoma. Si la región abarca a una región que contiene una mutación, el alelo reparado en el plásmido contendrá esa mutación.

El rescate de los distintos alelos *HOM3* se llevó a cabo de la misma forma en todos los casos (ver Figura 8); las cepas mutantes se transformaron con el plásmido pMAC33Δh, previamente cortado con *Hind*III. Los transformantes se seleccionaron en cajas de medio con los suplementos nutritivos de la cepa a transformar, excepto uracilo. A partir de varios de los transformantes obtenidos, se extrajo ADN total con el que se transformó la estirpe de *E. coli* DH5α. A continuación se extrajo ADN

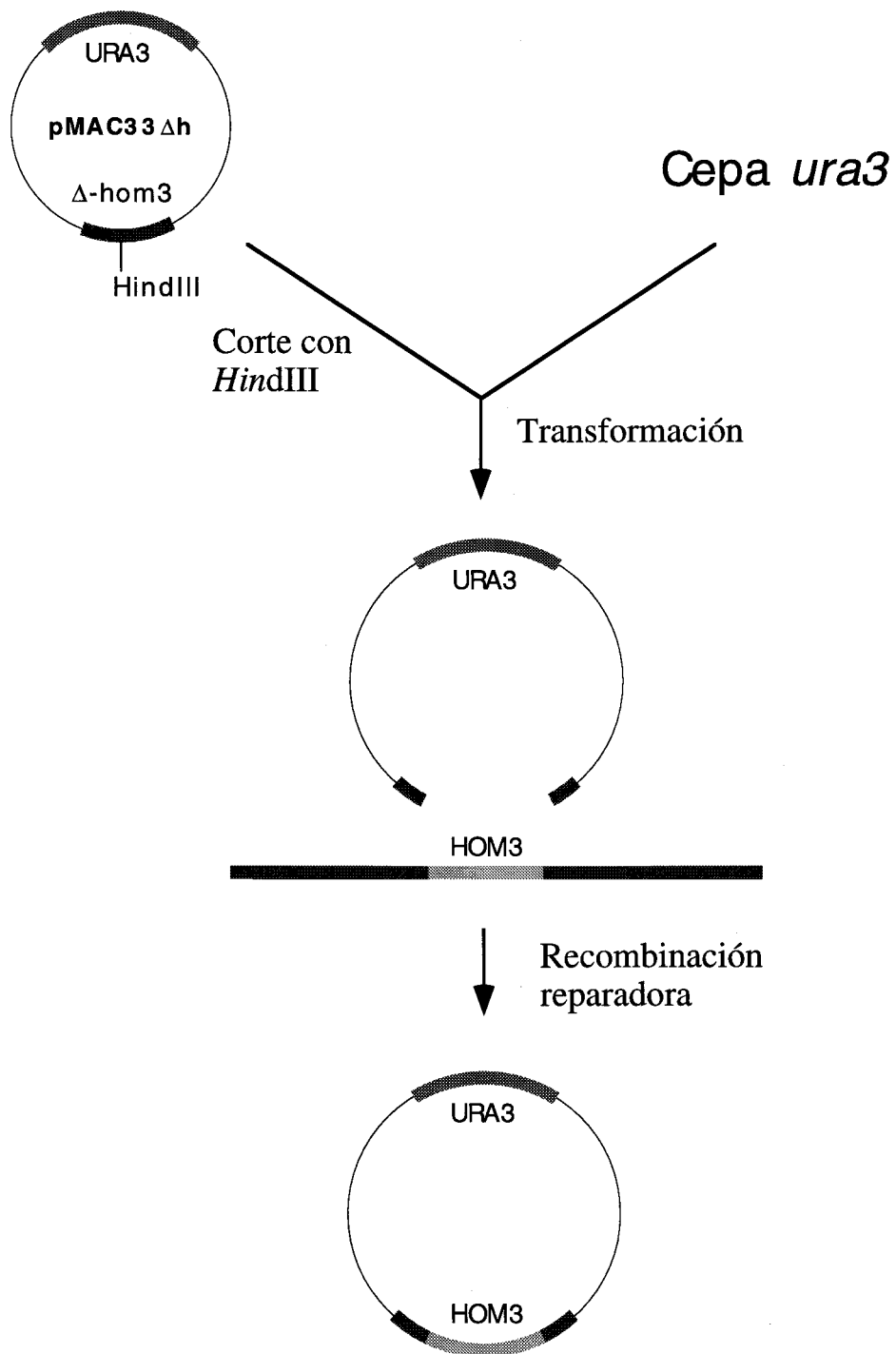


Figura 2.8. Clonación de un alelo de *HOM3* por el método del rescate alélico, utilizando el plásmido pMAC33Δh.

de estos transformantes, se cortó con *HindIII* y se analizó mediante electroforesis el patrón de bandas que aparecía, comparándolo con el del plásmido pMAC32wt, que lleva el alelo *HOM3* silvestre.

27. Mutagénesis dirigida de *HOM3* mediante PCR

27.1. Delección de la región determinante del motivo *KFGG* de la aspartoquinasa

Se llevó a cabo según la estrategia que se esquematiza en la Figura 1.11 y comprendió 3 pasos:

A) Síntesis mediante PCR de un fragmento de ADN con la delección

Para ello, se preparó una mezcla de reacción, que contenía:
como ADN molde el plásmido pMAC32wt (aproximadamente 1.3 ng)
cebadores DEL1 y OLIGO1 (ver Figura 1.6), 1 μ M cada uno
los 4 dNTP, 80 μ M cada uno
cloruro magnésico 5 mM
y 1.25 U de la polimerasa *Pfu*,
en un volumen total de 52 μ l de tampón *Pfu*..

Para evitar la evaporación se añadió una capa de aceite mineral.

La mezcla se sometió a 40 ciclos con periodos de 30 segundos a 94 °C para disociar las moléculas de ADN, 40 segundos a 50 °C para permitir la hibridación entre las cadenas del ADN molde y los cebadores, y 2.5 minutos a 72 °C para la síntesis de nuevas cadenas. Se utilizó un termociclador DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer, Norwalk, EE.UU.)

El fragmento amplificado en esta primera reacción tenía un tamaño que concordaba con el esperado de 264 pb según se dedujo por electroforesis. Este fragmento se utilizó en una nueva reacción en la cual una de las cadenas de ADN del producto, junto con un nuevo oligonucleótido, HOMpriA (Figura 1.6), servían como cebadores en la síntesis del producto final, de 508 pares de bases, que contenía la delección buscada. Para ello, 30 μ l de la primera reacción se trataron con 15 U de exonucleasa I (apartado 7.5), con el fin de eliminar las moléculas de

cebador no incorporadas durante el primer proceso de síntesis. A continuación se añadieron, aproximadamente,

100 pmoles del cebador HOM pri A
4 nmoles de cada uno de los dNTP
10 µl de tampón *Pfu* (10x)
10 µl de cloruro magnésico 50 mM
1.25 U de la polimerasa *Pfu*
agua bidestilada hasta un volumen total de 100 µl.

La mezcla se sometió a los mismos ciclos térmicos que la mezcla anterior. En esta segunda reacción se generó un fragmento de 508 pb que debía contener la delección (Figura 4.11).

Polimerasa *Pfu*: (Recombinant *Pfu* DNA Polymerase) de *Pyrococcus furiosus*; suministrada por Stratagene (La Jolla, California, EE.UU).

Tampón *Pfu*:: Contiene (NH₄)₂SO₄ 10 mM, MgCl₂ 2 mM, 0.1 mg/ml de BSA y Triton[®] X-100 0.1%, en Tris-HCl 20 mM pH 8.5 (solución de Tris ajustada a pH 8.5 con HCl).

B) Clonación del fragmento mutante

El fragmento de 508 pb obtenido en la segunda reacción se clonó en el sitio *SmaI* del vector bacteriano pUC19. Para ello, tanto el producto de PCR como el vector, fueron cortados con *SmaI*, aislados de un gel de agarosa, purificados y posteriormente ligados. Con la mezcla de ligación se transformaron células competentes de *E. coli* DH5α. Los plásmidos recombinantes eran fácilmente seleccionables, ya que la inserción de los fragmentos, al interrumpir la secuencia del gen *lacZ* presente en el vector, determinaba que los transformantes formasen colonias blancas, en lugar de azules, en un medio de selección que contenía X-GAL e IPTG y 50 µg/ml de ampicilina.

Medio X-GAL: Consiste en medio LB al cual se añade 40 µg/ml de X-GAL y 10 µg/ml de IPTG.

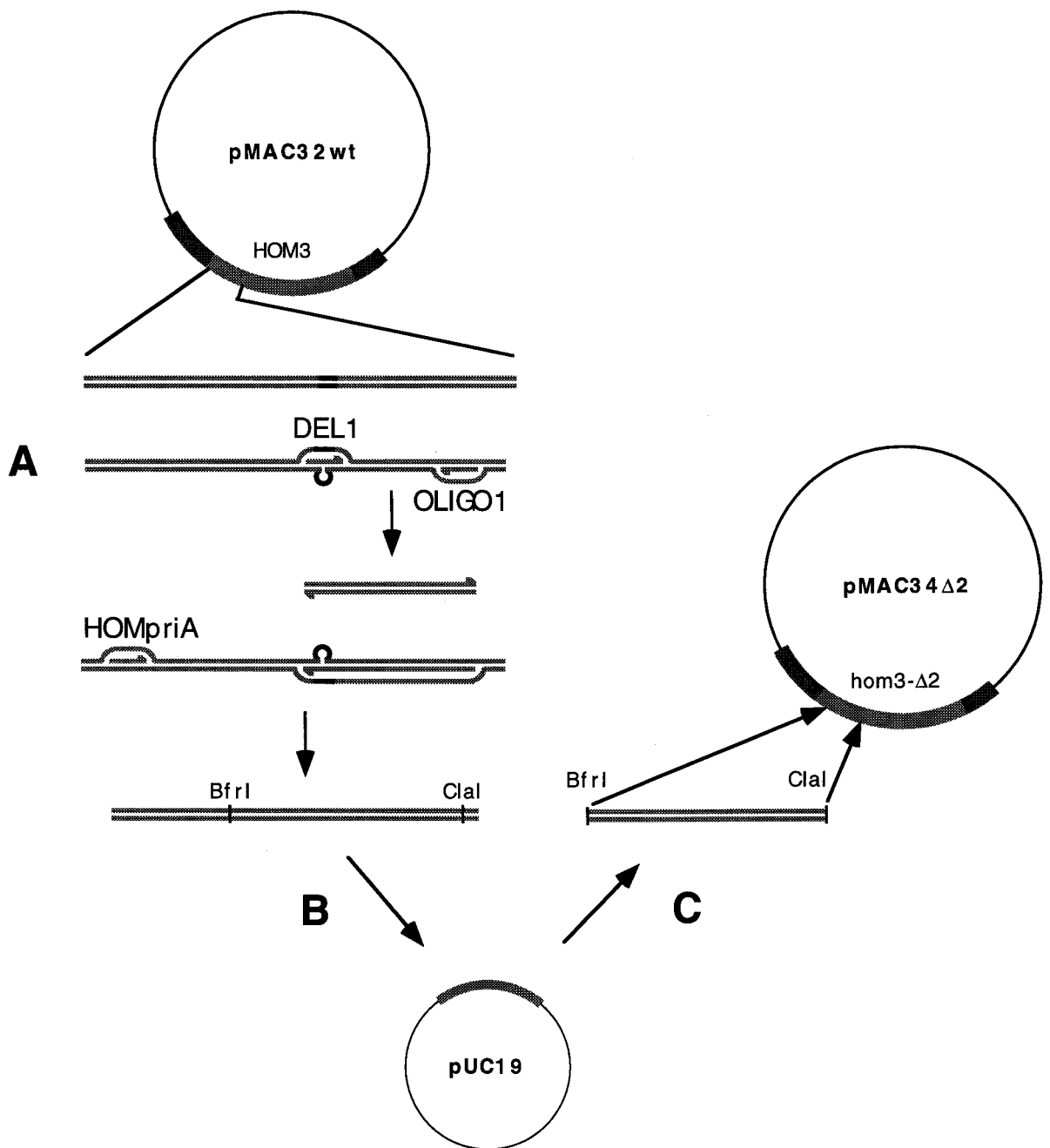


Figura 2.11. Delección mediante PCR de la región codificante del motivo KFGG de la aspartoquinasa. (A) Utilizando los cebadores DEL1 y OLIGO1 se amplificó un primer producto que fué utilizado en una segunda reacción, junto con el cebador HOMpriA, en la cual se amplificó el producto mutante, que se clonó (B) en el vector bacteriano pUC19. Por último, la mutación se introdujo en *HOM3* (C) por sustitución en el mismo del fragmento correspondiente.

C) Introducción de la delección en *HOM3*

Una preparación de ADN plasmídico procedente de uno los transformantes anteriores se digirió con las enzimas *BfrI* y *ClaI*; el fragmento de 340 pares de bases generado fué aislado de un gel de agarosa y ligado al fragmento *BfrI-ClaI* de 9.18 kb del plásmido pMAC32wt también purificado de un gel de agarosa. Así se generó el plásmido pMAC34 Δ 2, que contenía el alelo *hom3- Δ 2* .

El alelo *hom3- Δ 2* de pMAC34 Δ 2 se secuenció como se describe en el apartado 8.1 Métodos.

El análisis de la secuencia confirmó la presencia de la delección que se pretendía producir y la ausencia de mutaciones adicionales dentro de la región *BfrI-ClaI* sustituida.

27.2. Mutagénesis al azar de la región determinante del motivo KFGG

Se llevó a cabo siguiendo un estrategia similar a la empleada para la delección de la región determinante del motivo KFGG, con algunas variaciones. Comprendía 2 pasos:

A) Síntesis por PCR de una mezcla de fragmentos de ADN mutados en la región KFGG

Se preparó una mezcla de reacción, que contenía:

como ADN molde el plásmido pMAC32wt (aproximadamente 1.3 ng)

los cebadores (Figura 6) DOL1 y OLIGO1 1 μ M

cada uno de los dNTP 80 μ M

cloruro magnésico 5 mM

0.5 U de la polimerasa *Taq*

en un volumen de 52 μ l de tampón *Taq*.

La mezcla se sometía a 20 ciclos con periodos de 30 segundos a 94 °C para disociar las cadenas de ADN, 40 segundos a 50 °C para permitir la hibridación entre las cadenas del ADN molde y los cebadores, y 1 minuto a 72 °C para la síntesis de nuevas cadenas. Se utilizó un

termociclador GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin Elmer, Norwalk, EE.UU.)

El producto de esta primera reacción, de 276 pares de bases, se trató a continuación con polimerasa de T4 (apartado 7.3 de Métodos). La doble actividad polimerasa-exonucleasa de esta enzima permite tanto la eliminación de los extremos protuberantes que a menudo aparecen en los productos de amplificación con la polimerasa *Taq*, como la degradación de las moléculas de cebador no incorporadas durante el proceso de síntesis. Tras inactivar la enzima por calor (70° C durante 20 minutos), el producto de la PCR se purificó por filtración en una columna Microcon-100 (AmiconTM), siguiendo las instrucciones del fabricante; finalmente, se disolvió en H₂O destilada.

Se prepararon 100 µl de una nueva mezcla de reacción que contenía, como cebadores, alrededor de 0.6 µg del producto anterior y 100 pmoles del oligonucleótido HOMpriA (Figura 1.6); el resto de la composición de la mezcla era idéntica a la anteriormente descrita. Tras 40 ciclos de amplificación iguales a los descritos anteriormente en este mismo apartado, se obtuvo un producto del tamaño esperado de 520 pares de bases. El producto obtenido fué aislado de un gel de agarosa mediante el procedimiento descrito en el apartado 11 de Métodos y utilizado en el siguiente paso.

Polimerasa *Taq*: De *Thermus aquaticus*; suministrada por Boehringer Mannheim GmbH Biochemica (Mannheim, Alemania).

Tampón *Taq*: Contiene KCl 50 mM y MgCl₂ 1.5 mM, en Tris-HCl 10 mM pH 8.3 (solución de Tris ajustada a pH 8.3 con HCl).

B) Introducción de las mutaciones en *HOM3*

El producto obtenido al final del proceso anterior consistiría, teóricamente, en una mezcla de distintos fragmentos mutantes. Para completar el proceso de mutagénesis era necesario introducir en *HOM3* las mutaciones generadas. Para ello, la mezcla de fragmentos fué sometida a digestión con las enzimas *BfrI* y *Clal* (ver Figura 11) y la banda correspondiente a 352 pares de bases, aislada de un gel de agarosa. Alrededor 8 ng de ADN de esta banda se utilizaron en una mezcla de ligación que también llevaba 10 ng del fragmento de 9.18 kb *BfrI-Clal* del plásmido pMAC32wt, también purificado de un gel de agarosa. A esta

mezcla se le añadió 1 U de ligasa de T4 en un volumen de 12 μ l de tampón de ligasa. Tras incubarla a 16° C durante 6 horas, se usó toda la mezcla para transformar *E. coli* DH5 α . Una alícuota de la mezcla de transformación se sembró en medio LB + 50 μ g/ml de ampicilina con el fin de poder estimar el número total de transformantes; el resto se añadió a 10 ml del mismo medio de selección, para obtener un cultivo líquido a partir del cual extraer una mezcla de plásmidos, portadores de distintos alelos mutantes de *HOM3*.

RESULTADOS

CAPITULO 1

*Aislamiento y caracterización de mutantes superproductores de treonina por supresión fenotípica de una mutación *ilv1**

En una cepa de levadura cultivada en medio mínimo, la concentración intracelular de treonina y de serina no alcanza un valor lo suficientemente alto como para inducir la expresión de *CHA1*, de manera que una cepa *ilv1*, carente de la actividad treonina desaminasa anabólica (ver Figura 1.3 de Introducción), es, en estas condiciones, auxótrofa de isoleucina. Cuando a una cepa *ilv1* se le suministra treonina o serina en el medio de cultivo, la acumulación de estos aminoácidos induce la expresión de *CHA1*, cuyo producto suple de manera eficiente la falta de la treonina desaminasa anabólica, de forma que la cepa puede sintetizar isoleucina a partir de treonina (Ramos y Wiame, 1982). La idea era que esta misma supresión fenotípica de *ilv1* podría tener lugar en una cepa en la que la concentración de treonina endógena fuese capaz de inducir la expresión de *CHA1*.

Aislamiento de los mutantes

La selección de mutantes se llevó a cabo sembrando una suspensión de células de la cepa 8723c (*Ilv1*⁻) en medio SDpro. Este medio, con prolina como fuente de nitrógeno, había sido el empleado en otras ocasiones para la selección de mutantes superproductores de treonina por resistencia a hidroxinorvalina (Ramos y Calderón, 1992). A partir de cultivos líquidos de la cepa 8723c en medio YPD se sembraron cajas de medio SDpro a una densidad aproximada de 10^7 células por caja, y se incubaron a 30°C. Como experimento control se sembró una caja del mismo medio al que se añadió hidroxinorvalina a una concentración final de 10 mM (1.33 g/l) (Ramos y Calderón, 1992) y se incubó en las mismas condiciones.

Al cabo de unos días aparecieron, en el medio SDpro, alrededor de 100 colonias por caja; la frecuencia de aparición de mutantes *Ile*⁺ se estimó, por tanto, en 10^{-5} . En la caja de medio con hidroxinorvalina crecieron tan solo 5 (frecuencia de $2 \cdot 10^{-7}$).

Un número de 8 colonias crecidas en SDpro, las que mostraban un mayor tamaño, se sometieron a la prueba de alimentación cruzada con la

cepa auxótrofa de treonina F4, (ver Métodos) con el fin de determinar si algunas de ellas excretaban treonina al medio de cultivo. Dos de ellas dieron un resultado positivo en esta prueba, siendo, por tanto, candidatas a superproductoras de este aminoácido. La prueba dió un resultado positivo en dos de los mutantes. Uno de ellos, denominado R7, fué seleccionado para posteriores estudios.

El método de selección utilizado posibilitaba la obtención de otros mutantes no superproductores afectados en la expresión de *CHA1*. En concreto, cabía esperar la obtención de mutantes en el gen *CHA4*, que determina el activador de *CHA1* (Holmberg y Schjerling, 1996). Se han descrito mutaciones en *CHA4* que vuelven constitutiva la expresión de *CHA1* (Pedersen *et al.*, 1996). En este sentido, se investigó el fenotipo de dos mutantes *Ile*⁺, denominados R2 y R3, que no dieron un resultado positivo en la prueba de alimentación cruzada y no eran, por tanto, candidatos a superproductores de treonina.

Análisis de las cepas mutantes R2 y R3

La cepa R2 tiene un fenotipo muy particular, ya que sólo es *Ile*⁺ cuando se cultiva en medio SDpro, siendo auxótrofa de isoleucina en medio SD. El diploide formado entre R2 y la cepa *ilv1* SG76 resultó ser *Ile*⁺ en medio SDpro, lo cual indica que el fenotipo de supresión de *ilv1* en la cepa R2 es un caracter dominante. El análisis de tétradas procedentes de la esporulación de este diploide mostró dos tipos de segregaciones en medio SDpro: 2*Ile*⁺:2*Ile*⁻ y 1*Ile*⁺:3*Ile*⁻, lo cual puede indicar que el fenotipo *Ile*⁺ está causado por la presencia de más de una mutación en la cepa R2. El tipo de segregación no monogénico también podría explicarse por la diferencia de fondo genético entre las cepas R2 y SG76.

Se midió la activación del promotor de *CHA1* en la cepa *ura3* R2·C1 (previamente obtenida a partir de R2 por resistencia a 5-FOA, según se describe en métodos) cultivada en medios SDpro+ile y SD+ile, según el procedimiento descrito en Métodos, utilizando el plásmido pTK120, que porta una fusión traduccional entre el promotor de *CHA1* y el gen *lacZ* de *E. coli* (Bornæs *et al.*, 1993), y se comparó con la activación del p*CHA1* en la cepa 8723c·A1 cultivada en estos medios y en SDthr. Las medidas mostraron un grado de inducción de p*CHA1* en R2·C1 alrededor de 10 veces superior al de la misma cepa cultivada en SD+ile, y similar al encontrado en 8723c·A1 cultivada en SDthr (resultados no mostrados). Con el fin de determinar si la supresión de *ilv1* observada en R2

necesitaba la actividad del producto de *CHA1*, se llevó a cabo la interrupción de este gen en la cepa R2·C1, siguiendo el procedimiento descrito en métodos, y se estudió el crecimiento de la cepa *chal* resultante en medio SDpro. Se observó que la cepa con el alelo *chal* interrumpido era Ile⁻ en este medio, lo cual, junto con los resultados de la medida de la activación del promotor de *CHA1*, parece demostrar que la supresión de *ilv1* en la cepa R2 se produce a través de la inducción de *CHA1*.

La cepa R3 se cruzó con el mutante Sil 35, un supresor de *ilv1* portador de un alelo de *CHA4* que determina la expresión constitutiva de *CHA1* (Pedersen *et al.*, 1996). El análisis de 10 tétradas procedentes de la separación del diploide correspondiente mostró únicamente la segregación 4Ile⁺:0Ile⁻, lo cual indica que las cepas R3 también porta un alelo mutante de *CHA4*.

Caracterización fisiológica de la cepa R7

Mediante HPLC (ver Métodos) se determinó la cantidad de aminoácidos acumulada y excretada al medio de cultivo por la cepa R7 y por su parental 8723c. Con el fin de que los resultados fueran comparables, las dos cepas se cultivaron en medio SD+ile. Adicionalmente, se midió la cantidad de aminoácidos acumulados por la cepa R7 cultivada en medio mínimo SD.

Los resultados (Tabla 3.I.) muestran que la estirpe R7 acumula alrededor de 16 veces más treonina y unas 10 veces más homoserina que la cepa parental y excreta ambos aminoácidos al medio de cultivo. No se encontró diferencia entre ambas cepas en la concentración de serina, el principal inductor de la expresión de *CHA1*.

La concentración de aspartato en la cepa R7 es más baja que en 8723c, lo cual podría indicar que una cierta cantidad de este aminoácido está siendo utilizada en la síntesis de treonina. Se observa así mismo un cierto incremento en la concentración de isoleucina. La concentración de otro aminoácido, la glicina, también es algo más elevada la cepa superproductora de treonina; este incremento podría ser el resultado de la síntesis de glicina a partir de treonina que según Murata *et al.* (1986) tiene lugar en *S. cerevisiae*.

La cepa R7 resultó ser resistente a hidroxinorvalina, característica común de las cepas superproductoras de treonina. La hipótesis más aceptada para el mecanismo tóxico de la hidroxinorvalina propone que

Tabla 3.I: Concentration intracelular y extracelular (entre corchetes []) de distintos aminoácidos en las cepas 8723c y R7 cultivadas en distintos medios. Los valores representados son la media de dos medidas independientes; la desviación típica fue siempre inferior al 10%, salvo en **a**, donde fue 14%; nd: no detectado; ne: no estimado.

| Cepa | Medio | Aminoácidos (nmoles/mg peso seco) | | | | | |
|-------|--------|--------------------------------------|----------------|----------------------|--------------|--------------|--------------|
| | | Thr | Hom | Ser | Asp | Ile | Gly |
| 8723c | SD+Ile | 14.2 [nd] | 4,2 [nd] | 10.7 [nd] | 14.6 [nd] | 6.4 [ne] | 16.5 [nd] |
| R7 | SD+Ile | 229.7 [134,6] | 35,2 [30,2] | 9.7 a [nd] | 4.8 [nd] | 10.2 [ne] | 29.8 [nd] |
| R7 | SD | 254.4 [145,2] | 44,9 [43,3] | 8.2 [nd] | 5.1 [nd] | 11.6 [nd] | 23.4 [nd] |

este se produce a través de la inhibición de la aspartoquinasa, a causa de su semejanza estructural con el aminoácido; a consecuencia de ello, la síntesis de treonina y metionina se reduce hasta resultar limitante para la cepa en cuestión. En todos los casos analizados hasta ahora, la superproducción de treonina está asociada a la presencia de una aspartoquinasa insensible a inhibición por treonina; la resistencia a hidroxinorvalina se daría por falta de respuesta al análogo tóxico, que también también se daría para la treonina. Como consecuencia, el flujo metabólico quedaría desregulado y se acumularía treonina.

Análisis de la actividad aspartoquinasa de la cepa R7

La resistencia a hidroxinorvalina de R7 sugería que esta cepa portaba una aspartoquinasa insensible a retroinhibición por treonina. Para comprobar esta hipótesis, se llevó a cabo la purificación parcial de la aspartoquinasa de R7 y el ensayo de su actividad en presencia de distintas concentraciones de treonina, según los procedimientos descritos en Métodos. El grado de inhibición por treonina de la aspartoquinasa de R7 se comparó con el de la enzima de la cepa parental 8723c, purificada y ensayada de idéntica forma. La Figura 3.1 muestra los resultados obtenidos. Mientras que la aspartoquinasa de 8723c es claramente sensible a treonina, con un grado de inhibición similar al descrito con anterioridad para esta enzima (de Robichon-Szulmajster y Corrivaux, 1963, 1964; Stadman *et al.*, 1961; Ramos *et al.*, 1991), la aspartoquinasa de la cepa R7 resultó ser resistente a inhibición por treonina. La actividad específica obtenida en los extractos de ambas cepas resultó ser aproximadamente la misma.

Análisis genético de la cepa R7

En primer lugar se analizó la segregación de la superproducción de treonina en un cruzamiento entre R7 y la cepa silvestre $\Sigma 1278b$; se eligió esta cepa por tener el mismo fondo genético de la parental 8723c y sexo opuesto (Ramos y Wiame, 1982). La superproducción de treonina en las esporas resultantes de este cruzamiento se detectó por resistencia a hidroxinorvalina. El diploide R7/ $\Sigma 1278b$ resultó ser resistente a hidroxinorvalina, lo que indica el carácter dominante de la mutación. Las 22 tétradas descendientes de este diploide exhibieron una segregación 2:2 para el fenotipo de resistencia/sensibilidad a hidroxinorvalina, lo cual

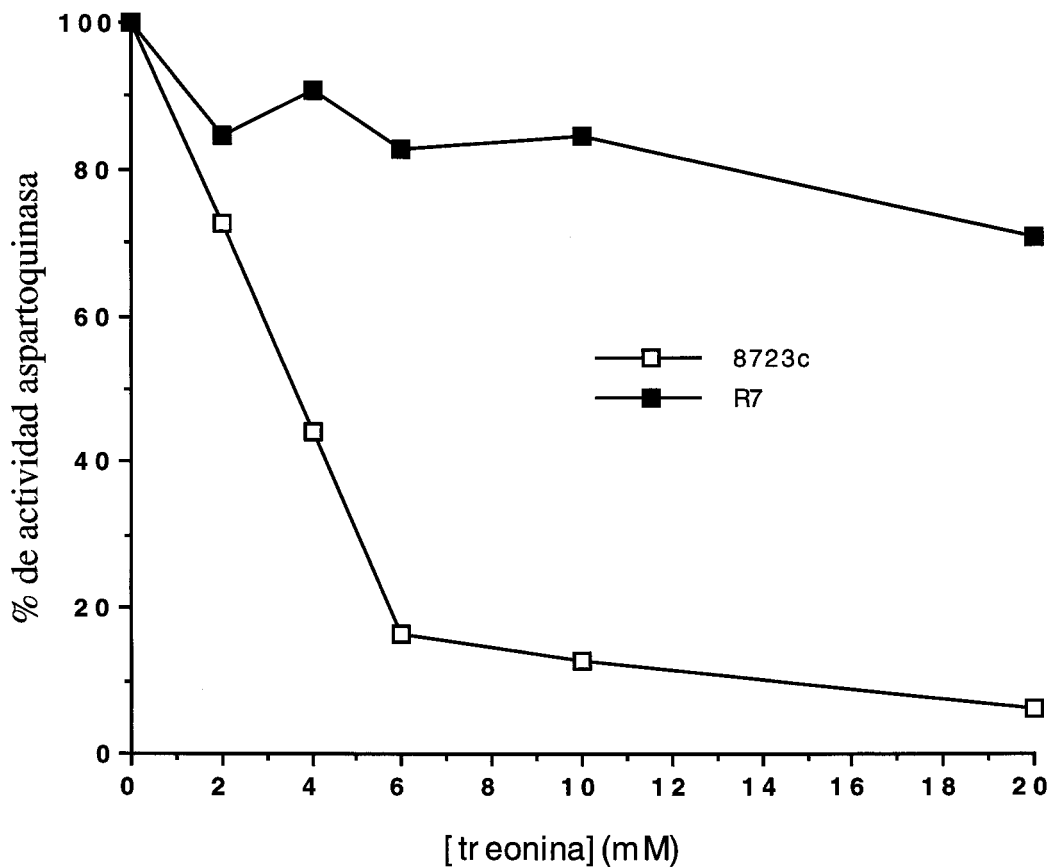


Figura 3.1. Inhibición de las aspartoquinasas de 8723c y R7 en presencia de distintas concentraciones de treonina. La actividad aspartoquinasa se expresa como porcentaje de la observada en cada cepa en ausencia del aminoácido. Cada valor representa la media de los resultados obtenidos en al menos dos ensayos; la desviación típica fue en todos los casos inferior al 20%.

indica que la superproducción de treonina en la cepa R7 es un carácter monogénico.

El análisis de la aspartoquinasa de R7 había revelado la insensibilidad de la misma a inhibición por treonina. Se investigó, por tanto, el ligamiento de la mutación de R7 al locus *HOM3*. Para ello, R7 se cruzó con la cepa *hom3* XMA52-1C y se analizaron 27 tétradas provenientes de este cruzamiento. En todas ellas se observó una segregación 2Hom⁺: 2Hom⁻. Además, todas las esporas Hom⁺ resultaron ser resistentes a hidroxinorvalina. Este resultado apoya la hipótesis que la cepa R7 posee un alelo mutante del gen *HOM3*, al que se denominó *HOM3-7R*.

Adicionalmente, se llevó a cabo un cruzamiento entre R7 y la cepa *hom3 ilv1* XMA54-16C. Los genes *ILV1* y *HOM3* están localizados en el cromosoma V, a una distancia estimada entre 19.0 y 33.5 cM (Mortimer y Schild, 1980).

El análisis de 26 tétradas procedentes de este cruzamiento mostró un único tipo de segregación, 2 Ile⁺ Hom⁺: 2 Ile⁻ Hom⁻, lo que confirma que el gen implicado en la supresión de la mutación *ilv1* en R7 está ligado a *HOM3*. Dado que el diploide es homocigótico *ilv1/ilv1*, el carácter Ile⁺ se debe a la presencia de un alelo de superproducción.

Clonación y secuenciación del alelo HOM3-R7

La clonación del alelo *HOM3* presente en R7 se llevó a cabo por el procedimiento del rescate alélico descrito en Métodos.

De un total de 6 plásmidos analizados se encontraron cuyo patrón de restricción con *Hind*III coincidía con el del plásmido pMAC32wt, portador del alelo *HOM3* silvestre. Uno de estos plásmidos fue denominado pMAC7R.

Con el fin de confirmar que pMAC7R contenía un alelo de *HOM3* y que éste era funcional se transformó con él la cepa Hom3⁻ XMP10-1B. La presencia del plásmido pMAC7R en XMP10-1B complementaba la mutación *hom3* de ésta y le confería resistencia a AHV, lo cual confirmaba que se había clonado el alelo de *HOM3* presente en la cepa R7.

La secuenciación del alelo *HOM3-7R* se llevó a siguiendo el procedimiento manual descrito en Métodos, utilizando los cebadores denominados OLIGO I a OLIGO VII (ver Figura 2.6) El análisis de la secuencia de este alelo reveló la presencia de varios cambios con respecto

a la secuencia del gen *HOM3* silvestre publicada (Rafalski y Falco, 1988). Las posiciones de estos cambios se muestran en la Tabla 3.II.

De los 5 cambios encontrados en *HOM3-7R*, tres darían lugar a lugar a codones sinónimos que no alterarían la estructura primaria de la aspartoquinasa. Los dos cambios restantes producirían sustituciones de tipo conservativo en la secuencia de la proteína.

Con el fin de determinar si los cambios no silenciosos estaban ya presentes en el alelo *HOM3* de la cepa 8723c de la que procede R7, se clonó aquel y se analizó su secuencia. Para ello, se siguió el mismo método de rescate alélico que fué empleado en la clonación de *HOM3-7R*, obteniéndose 12 plásmidos, de los cuales 3 presentaban un patrón de restricción con *HindIII* que coincidía con el del plásmido pMAC32wt. Uno de estos plásmidos fué denominado pMAC87wt y el nuevo alelo de *HOM3* se denominó *HOM3-87*. Mediante el procedimiento de secuenciación automática descrito en el apartado 8.2 de Métodos, y utilizando los cebadores MG1 y OLIGO IV (ver Figura 2.6), se secuenciaron las regiones donde se localizan las mutaciones no silenciosas en *HOM3-7R*.

El análisis de la secuencia de *HOM3-87* con el cebador MG1 reveló la presencia, en la posición 466, de la misma mutación observada *HOM3-7R*. La secuenciación con el cebador OLIGO IV permitió comprobar la ausencia de la mutación encontrada en la posición 1210 de *HOM3-7R*. Este cambio afectaría a un resto de glutámico conservado en la secuencia de las aspartoquinasas (ver Figura n en Discusión).

La presencia de los cambios silenciosos descritos podría reflejar la distancia que, en sentido genético, parece separar a la cepa Σ 1278b, isogénica de 8723c, y S288C, a partir de la cual se obtuvo el alelo de *HOM3* cuya secuencia se ha publicado

Papel de CHA1 en el fenotipo Ile⁺ de la cepa R7

Una vez probado que R7 es, efectivamente, superproductora de treonina y las bases moleculares de este fenotipo, se trató de probar la segunda premisa de la hipótesis de la que se partió para seleccionar los mutantes. Concretamente, se trató de probar el papel del gen *CHA1* en la supresión de *ilv1* observada en la cepa R7. Para ello se midió por una parte el nivel de inducción del promotor de *CHA1* en esta cepa, y por otro, se investigó el efecto de la interrupción de este gen. En ambos casos, era necesario disponer de versiones *ura3* tanto de R7 como de la cepa

Tabla 3.II. Mutaciones encontradas en la secuencia nucleotídica del alelo *HOM3-R7* respecto de la secuencia de *HOM3* silvestre publicada.

| Posición en la secuencia de ADN | Mutación | Cambio en la secuencia de aminoácidos |
|---------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| 466 | <u>GAC</u> → <u>GAA</u> | Asp ₃₄ →Glu |
| 1210 | <u>GAA</u> → <u>GAT</u> | Glu ₂₈₂ →Asp |
| 1324 | <u>ATT</u> → <u>ATC</u> | — |
| 1513 | <u>TTT</u> → <u>TTC</u> | — |
| 1947 | <u>TAA</u> → <u>TGA</u> | — |

parental 8723c; estas cepas, denominadas respectivamente R7.C1 y 8723c.A1 se obtuvieron a partir de las primeras por selección en medio con ácido 5-fluoro-orótico (5-FOA), según se describe en Métodos.

Inducción de la expresión de CHA1 en R7

Se midió, según el procedimiento descrito en Métodos, utilizando el plásmido pTK120, que porta una fusión traduccional entre el promotor de *CHA1* y el gen *lacZ* de *E. coli* (Bornæs *et al.*, 1993) Con él se transformaron las cepas R7.C1 y 8723c.A1, y se midió la actividad β -galactosidasa en los transformantes cultivados en SD+ile y SDser+ile y, adicionalmente, de la cepa R7.C1 transformada y cultivada en medio SD.

Como se muestra en la Figura 3.2, no se encontraron diferencias en la actividad β -galactosidasa de la cepa R7.C1 si se cultivaba en SD o en SD+ile. Sin embargo, en medio SD+ile la cepa R7.C1 mostró un nivel de actividad del p*CHA1* alrededor de 20 veces más elevado que el de la cepa parental 8723c.A1. Esta inducción es similar a la que se encuentra cuando se cultiva una cepa en medio con treonina como fuente de nitrógeno respecto del observado en medio con amonio en el que se considera que la actividad es la basal (Bornæs *et al.*, 1993).

En medio con serina como fuente de nitrógeno (SDSer+ile); el nivel de inducción detectado es similar en ambas cepas y se aproxima al descrito con anterioridad para las mismas condiciones de cultivo, consideradas de inducción máxima (Bornæs *et al.*, 1993).

Interrupción de CHA1 en la cepa R7

Se llevó a cabo según se describe en Métodos.

En primer lugar se comprobó que la cepa R7.C1.*chal* es auxótrofa para isoleucina, lo que indica que la supresión de *ilv1* en la cepa R7 depende de la actividad de *CHA1* inducida muy probablemente por la acumulación endógena de treonina que se da en la cepa.

También se investigó el papel de *CHA1* en la resistencia a hidroxinorvalina de la cepa R7. Para ello, se comparó el crecimiento de las cepas R7.C1 y R7.C1.*chal* en medio SDpro+10 mM AHV.

Los resultados muestran que la interrupción de *CHA1* en la cepa R7.C1.*chal* reducía parcialmente la resistencia de esta cepa a AHV. Este hecho indica que el grado de resistencia al análogo tóxico en la cepa superproductora depende, no sólo de la presencia de una aspartoquinasa

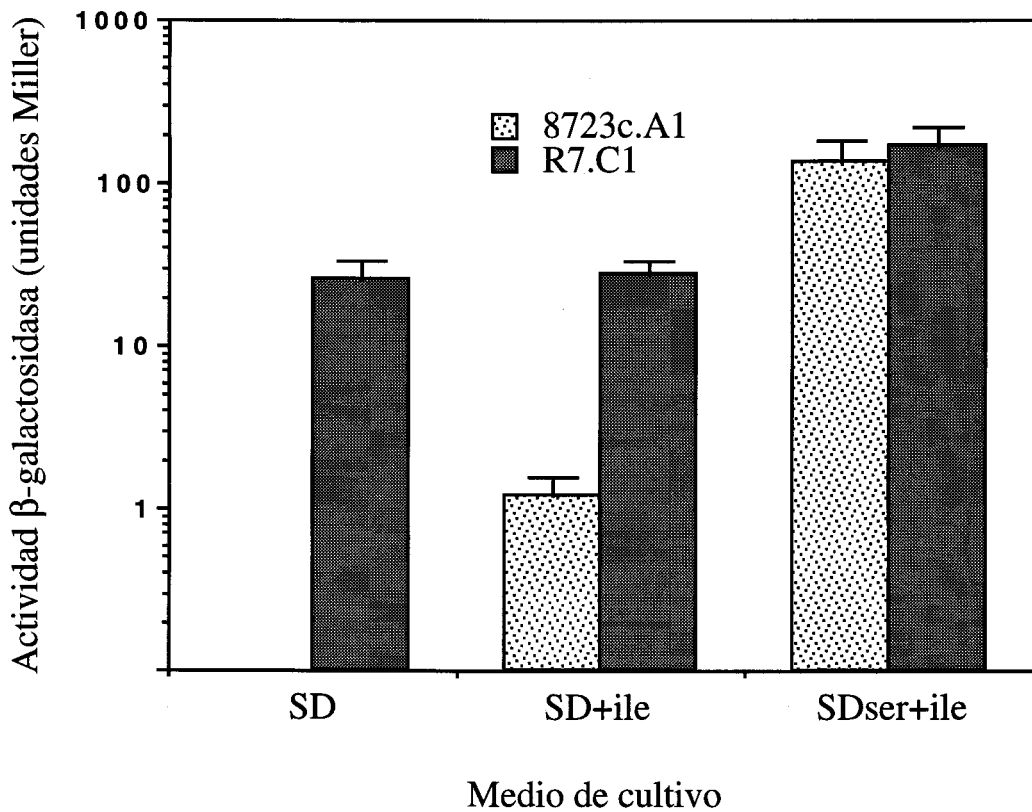


Figura 3.2. Inducción del promotor de *CHA1* de una fusión *pCHA1-lacZ* en las cepas 8723c.A1 y R7.C1 transformadas con el plásmido pTK120 en distintos medios de cultivo: SD, SD+ile y SDser+ile. Los resultados son la media de al menos 2 ensayos, realizados con transformantes independientes; en cada caso se indica la desviación típica, que fue siempre menor del 35%.

insensible a inhibición por AHV, sino también de la actividad del producto de *CHAI*. En este trabajo se ha podido comprobar que cepas no superproductoras de treonina donde *CHAI* se expresa de forma constitutiva son resistentes a AHV (resultados no mostrados). De hecho se ha descrito que la AHV constituye un buen sustrato ($K_M=3\text{mM}$) para la desaminasa catabólica de serina y treonina producto de *CHAI* (Ramos y Wiame, 1982), lo que implicaría que se podría dar un cierto grado de resistencia a AHV mediante la degradación efectiva del análogo y su transformación en un producto no tóxico. De hecho la cepa R7 es capaz de crecer en un medio con 1g/l de AHV como fuente de nitrógeno, lo que apoya la hipótesis anteriormente expresada.

Acumulación de treonina en cepas con diversas combinaciones de mutaciones y alelos clonados

La base de la estrategia usada para la selección de la cepa superproductora de treonina implicaba que parte de este aminoácido estaba siendo convertido en α -cetobutirato gracias a la actividad treonina desaminasa del producto de *CHAI*, salvando así el bloqueo metabólico de la síntesis de isoleucina impuesto por la mutación *ilv1*. La treonina desaminasa anabólica determinada por el gen *ILV1* se inhibe por isoleucina; no así la catabólica producto de *CHAI*, lo que implica que en R7 el ritmo de degradación de la treonina producida sería constante y podría afectar a su acumulación intracelular, cuyo nivel vendría determinado por el balance neto entre la síntesis y la eliminación de este aminoácido. Por tanto, parecía interesante estimar la importancia de la vía catabólica abierta por la inducción de *CHAI*.

Por otra parte, está descrito (referencia) que además de la aspartoquinasa, la homoserina quinasa es la otra enzima de la ruta que se inhibe por treonina y que, por tanto, podría ejercer un papel de regulación del flujo metabólico a su través. No se sabe si la actividad treonina sintasa es regulable del mismo modo. Así pues, sería plausible pensar que se puede mejorar la producción de treonina si se aumenta la dosis de estos genes y se combina con la presencia en la cepa de una mutación *chal*. Así, se construyeron las siguientes cepas por transformación:

8723c.A1 [PYSEL- Δ 1]
R7.C1 [PYSEL- Δ 1]
R7.C1.*chal* [PYSEL- Δ 1]
8723c.A1 [PYST1]
R7.C1 [PYST1]
R7.C1.*chal* [PYST1]
8723c.A1 [PYST4]
R7.C1 [PYST4]
R7.C1.*chal* [PYST4]

Se cultivaron las cepas arriba mencionadas en medio SD+ile y se midió la cantidad de treonina y homoserina acumulada por las mismas. Los resultados se muestran en la Figura 3.3.

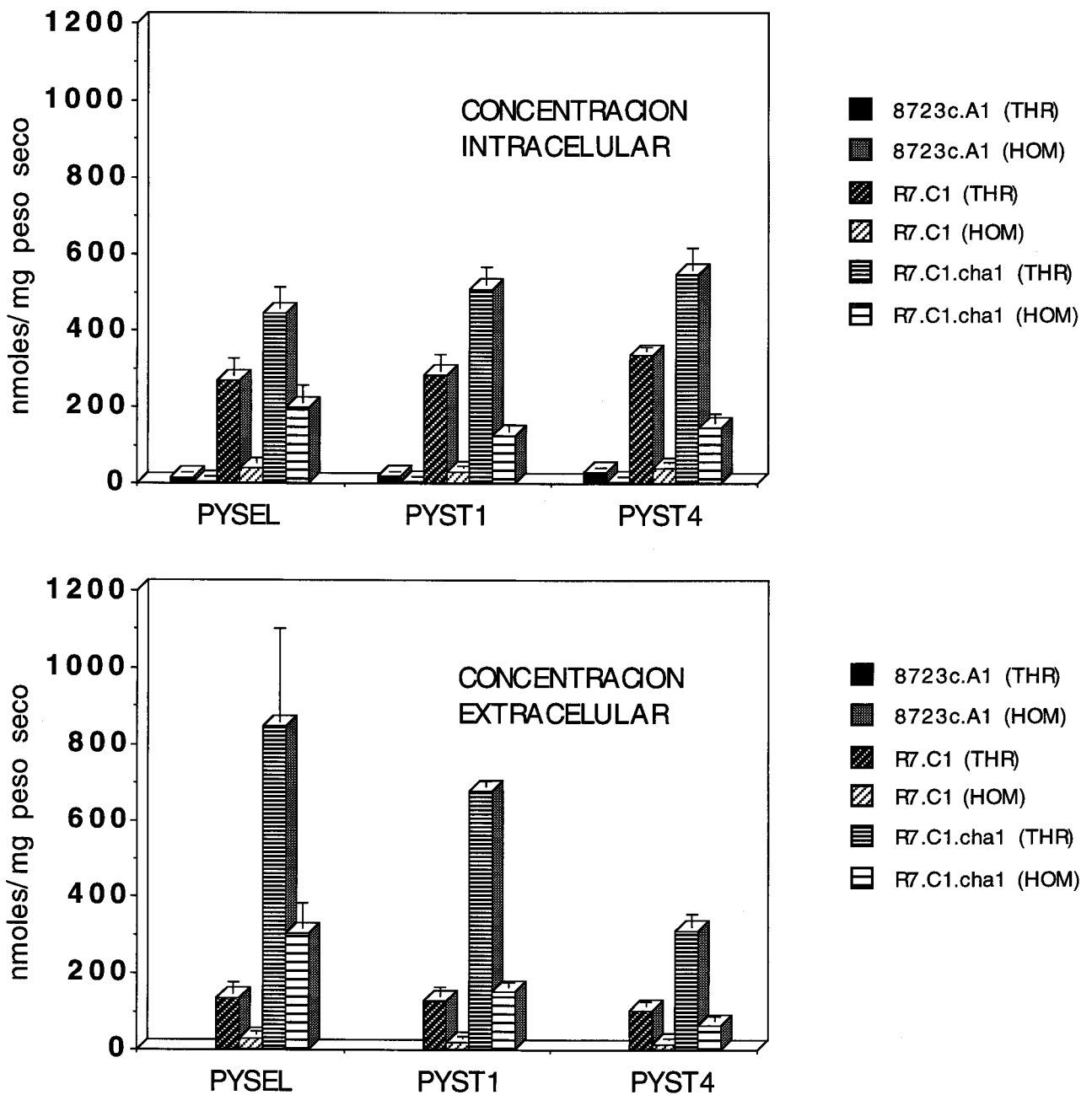


Figura 3.3. Concentración intracelular y extracelular (en el medio de cultivo) de treonina y homoserina en las cepas 8723c.A1, R7.C1 y R7.C1.cha1 transformadas con los plásmidos multicopia PYST1, PYST4, y con el vector PYSEL. Las cepas se cultivaron en medio SD+ile. Los resultados son la media de al menos dos experimentos realizados con transformantes diferentes; se indica la desviación típica.

CAPITULO 2

Aislamiento de mutantes hiperregulados por treonina

El análisis de las aspartoquinasas de los distintos organismos muestra que existe en ellas una región conservada, implicada tanto en la oligomerización como en la modulación de la actividad enzimática. En dicha zona se han localizado mutaciones que vuelven a la aspartoquinasa insensible a retroinhibición. Sin embargo, aún no se sabe qué residuos, dentro de esta región, son los directamente implicados en la interacción con el modulador.

La regulación alostérica implica que la unión de la molécula inhibidora induce un cambio conformacional en la proteína que se transmite y afecta al sitio activo. Esta capacidad de la enzima para detectar la presencia del inhibidor y la respuesta resultante constituyen una función añadida a la puramente catalítica. Las mutaciones que eliminan o disminuyen la inhibición de la enzima afectan a residuos situados en posiciones diversas, lo cual indica que existen varias formas (probablemente muchas) de destruir la regulación de la aspartoquinasa. La más drástica consiste en la eliminación total de la región asociada a la regulación, como ya se comentó para el caso de *S. marcescens*.

En principio, cabría esperar la existencia de otro tipo de mutantes afectados en la aspartoquinasa, con un fenotipo opuesto al de los mutantes desregulados; estos mutantes *hiperregulados* tendrían una aspartoquinasa con una retroinhibición más potente que la de la enzima silvestre. De existir, su estudio podría indicar con más precisión la localización de los residuos directamente implicados en la respuesta alostérica, ya que la hiperregulación sería, en cierto sentido, una *mejora de función*.

Se decidió, por tanto, intentar el aislamiento de mutantes de *S. cerevisiae* con una aspartoquinasa hiperregulada. Estos mutantes tendrían un fenotipo predecible: serían sensibles a treonina, es decir, en presencia de abundante treonina el flujo metabólico a través de la ruta de síntesis de treonina y metionina se vería drásticamente reducido, produciéndose una auxotrofía parcial o total para este último aminoácido, que sólo podría paliarse añadiendo homoserina o metionina al medio de cultivo. Obviamente no se podía descartar la posibilidad de que otras mutaciones produjeran este mismo fenotipo.

Coincidiendo en el tiempo con esta selección de mutantes, pudimos acceder a una pequeña colección de mutantes sensibles a treonina, aislados por el Dr. Steen Homlberg según se describe más adelante, y que fueron amablemente cedidos para su estudio.

Aislamiento de mutantes sensibles a treonina a partir de la cepa S288C.

La cepa silvestre S288C se sometió a mutagénesis con EMS según se describe en el apartado n de Metodos. La supervivencia al tratamiento se estimó en un 36%. Se probó la capacidad de crecer en medio conteniendo treonina de 8000 colonias supervivientes al tratamiento resultando que 4 de ellas eran incapaces de crecer en este medio. Estas cepas mutantes, a las que se denominó TS1, TS2, TS3 y TS4, fueron sometidas a estudios posteriores.

De los mutantes aislados, sólomente TS1 era capaz de crecer con treonina si se añadía homoserina o metionina al medio, es decir, tenía un fenotipo congruente con lo esperado para un mutante en *HOM3*. El hecho de que los otros tres mutantes aislados no cumplieran esta condición se interpretó como indicativo de que el fenotipo de sensibilidad a treonina podía tener otras causas. Se estimó que podría ser interesante tratar de investigar cuáles podían ser estas causas. Sin embargo, TS2 mostraba un crecimiento muy débil en medio SD, lo que dificultaba su estudio. TS3 no crecía en medio YPD, y era sensible a otros aminoácidos, como histidina y arginina, lo que indicaba que el mecanismo de toxicidad por treonina en este mutante era, probablemente, de una naturaleza más compleja. Estos dos mutantes no fueron objeto de estudios posteriores.

En el otro mutante, TS4, se probó el efecto de otros aminoácidos sobre la sensibilidad a treonina, observándose que sólo la valina suprimía el efecto inhibitorio de la treonina, por lo que se profundizó en su estudio. Este efecto resultaba interesante porque sugería que, o bien la treonina, o bien un producto de su metabolismo estaba interfiriendo con la síntesis de valina en esta cepa. De hecho, en *Salmonella* se ha descrito que, en determinadas circunstancias, la acumulación de α -cetobutirato, producto del catabolismo de la treonina, provoca una reducción en la síntesis de valina, debido a la competencia del cetoácido con el α -cetoisovalerato, precursor de la valina, por la enzima correspondiente. Se consideró la posibilidad de la existencia de un mecanismo tóxico similar en la cepa TS4, provocado por una acumulación excesiva de

treonina procedente del medio externo, y su conversión en α -cetobutirato por medio de la actividad del producto del gen *CHA1*. Un exceso de acumulación de treonina podría ser el resultado de un aumento en la tasa de entrada en la célula. El principal transportador de treonina es la permeasa general de aminoácidos (gap), si bien de forma minoritaria también entra por otra/s permeasa/s (Martín-Rendón *et al*, manuscrito en preparación). Con el fin de probar si, efectivamente TS4 estaba afectado en la actividad de la gap, se probó la sensibilidad de TS4 a D-histidina, un aminoácido tóxico que utiliza dicha permeasa para entrar en la célula. Como control se utilizó la cepa X2180.1A isogénica de S288C. El crecimiento de la cepa TS4 se inhibió completamente en medio SD suplementado con 0.1 M de D-histidina, mientras que el de la cepa X2180.1A apenas se vió afectado. Este resultado era consistente con la hipótesis de partida, pero, para confirmarla, se midió directamente el transporte de treonina en las cepas TS4 y S288C. Para ello se cultivaron ambas cepas en medio SD y se sometieron a experimentos en los que se determinó la velocidad de entrada de treonina radiactiva en la célula.

Los resultados (Figura 5.1a), muestran que, efectivamente, la cepa mutante transporta el aminoácido a una velocidad sensiblemente superior que la cepa parental. Con el fin de averiguar si este incremento en la velocidad de transporte afectaba a la permeasa general de aminoácidos, se midió, en ambas cepas, el transporte de citrulina, un aminoácido que sólo utiliza ésta permeasa para entrar en la célula. Como muestra la Figura 5.1b, el transporte de citrulina también es superior en la cepa mutante, lo cual indica que la cepa TS4 es mutante en la permeasa general de aminoácidos. Un experimento similar reveló que la cepa TS1 no está afectada en el transporte de treonina (resultados no mostrados).

Análisis genético de la sensibilidad a treonina en la cepa TS4

Con el fin de analizar el modo de herencia de la sensibilidad a treonina, el mutante TS4 se cruzó con la cepa X2180.1A, y se analizó la sensibilidad a treonina, tanto del diploide resultante, como de los productos meióticos de 10 tétradas derivadas del mismo. El diploide TS4/X2180.1A resultó ser resistente a treonina, lo que parecía indicar que la sensibilidad a treonina era un carácter recesivo. En siete de las tétradas se observó una segregación 2:2 en el fenotipo sensibilidad/resistencia a treonina; en las tres tétradas restantes aparecieron esporas con fenotipos intermedios, no siendo claramente sensibles ni resistentes. Al analizar el

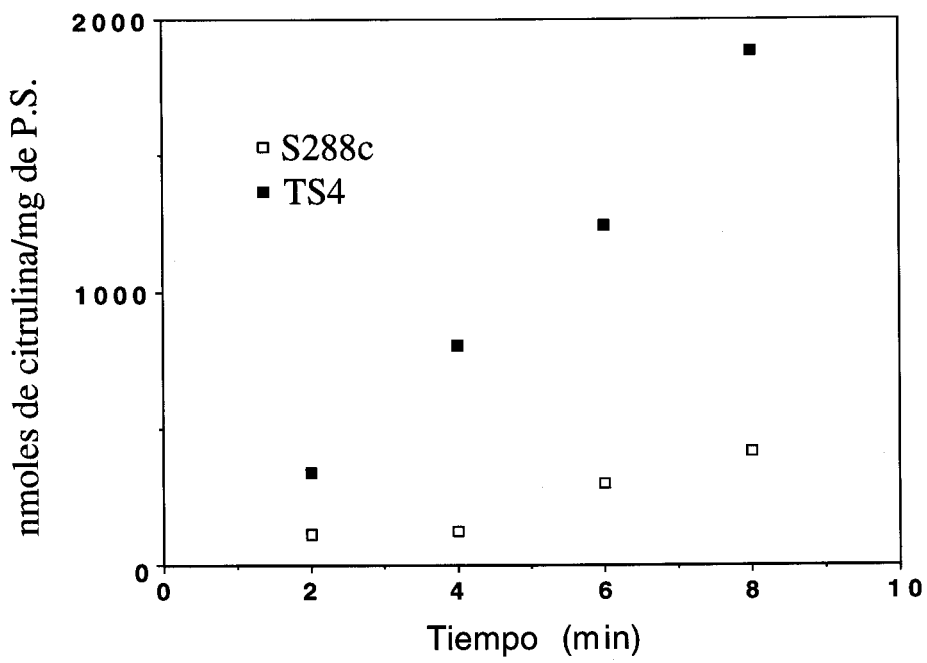
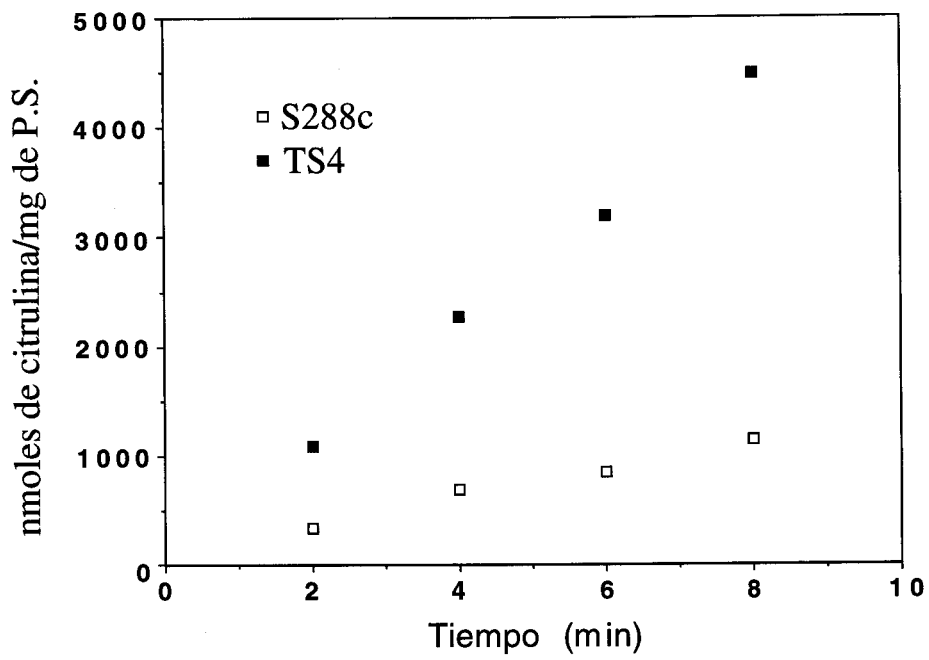


Figura 5.1. Transporte de treonina y citrulina en las estirpes S288C y TS4.

crecimiento de las tétradas en presencia de D-histidina, se observó una segregación 2:2 en el fenotipo de sensibilidad/resistencia frente a este aminoácido, coincidiendo que todas las D-his^s eran Thr^s.

Los datos obtenidos sugieren que en TS4 la presencia de una mutación provoca un incremento en el transporte a través de la permeasa general de aminoácidos que potencia el efecto tóxico de la D-histidina, al acelerar su entrada al interior celular. Este incremento en el transporte a través de la gap parece estar asociado a la sensibilidad a treonina en esta cepa.

Efecto de la interrupción del gen CHA1 sobre la sensibilidad a treonina de la cepa TS4

Con el fin de determinar si, en esta cepa, la toxicidad la ejercía directamente la treonina o algún producto derivado de la misma, se investigó el efecto de interrumpir en la misma el gen *CHA1*, determinante de la treonina desaminasa catabólica. Para ello, se obtuvo previamente una cepa derivada, la TS4.A1, mutante *ura3* aislado a partir de TS4 por resistencia a 5-FOA. La cepa así obtenida, denominada TS4.A1.*chal*, resultó ser ligeramente menos sensible a treonina que la cepa original lo que se interpreta como que el CHA1p participa sólo de forma limitada.

Análisis genético de la sensibilidad a treonina en el mutante TS1

Según se expuso con anterioridad, el mutante TS1 tenía un fenotipo que concidía con el esperado si la mutación que confiere sensibilidad a treonina estuviera en el gen *HOM3*, es decir, si tuviese una aspartoquinasa hipersensible a treonina. Con el fin de determinar si éste era el caso, se realizaron cruzamientos y se analizaron las tétradas derivadas de ellos.

En primer lugar se cruzó TS1 con la cepa XMP-10 (*hom3*) y se analizó la sensibilidad a treonina de 9 tétradas completas. Como se esperaba, se encontró una segregación 2 Hom⁺ : 2 Hom⁻ en todas las tétradas analizadas. Debido a que la presencia de L-homoserina anula el efecto inhibitorio de la L-treonina, sólo se pudo probar la sensibilidad a L-treonina de los productos meióticos que eran Hom⁺. Sorprendentemente, sólo la mitad de ellos eran sensibles a treonina lo que significa que no hay ligamiento entre estos dos caracteres.

Para confirmar este resultado, se realizó otro cruzamiento, esta vez por la cepa 8723c que *esilv1*, marcador situado a cM del locus *HOM3*. Por conveniencia de manipulación, el cruzamiento se realizó con un derivado *ura3* de TS1, la cepa TS1.A2 obtenido por resistencia a 5-FOA, según se indica en Métodos El análisis de 10 tétradas completas reveló que en todos los casos se dió una segregación 2:2 para la sensibilidad/resistencia a treonina confirmando su carácter monogénico. Sin embargo, no se observó ligamiento entre el mismo y el locus *ILV1*, confirmando, pues, que la mutación de sensibilidad a la treonina de TS1 no estaba en *HOM3*.

El hecho de que en TS1 la homoserina y la metionina contrarresten el efecto tóxico de la treonina podría deberse a que, en presencia de éste último, el flujo de metabolitos en la primera parte de la ruta sea insuficiente. Una vez demostrado que la mutación no estaba ligada al locus *HOM3*, se probó si los alelos silvestres *HOM2* u *HOM6* la complementaban. Para ello, se transformó la cepa TS1.A1 con los plásmidos centroméricos *pHOM2-7* y *pMF6-1*, portadores, respectivamente, de los genes *HOM2* y *HOM6*, y se probó la sensibilidad a treonina de los transformantes. Como control, se transformó también con el plásmido *pMR33*, portador del alelo silvestre *HOM3*. Los plásmidos *pHOM2-7* y *pMF6-1* no paliaban la sensibilidad a treonina pero, sorprendentemente, el *pMR33* lo hacía parcialmente. Se probó si aumentando el número de copias de *HOM3* la complementación mejoraba. Efectivamente, la introducción en TS1.A1 del plásmido replicativo *p1AK4*, portador de *HOM3*, hacía a esta cepa resistente a treonina. No hallamos una explicación plausible a la incongruencia encontrada entre este resultado y la falta de ligamiento con el locus *HOM3*.

Análisis genético de la sensibilidad a treonina en los mutantes SG36, SG37, SG44, SG45, SG46 Y SG49.

Según se comentó con anterioridad, el Dr. Holmberg nos cedió para su estudio un grupo de mutantes sensibles a treonina. Estas cepas, denominadas SG36, SG37, SG44, SG45, SG46 y SG49, fueron aisladas durante una búsqueda de mutantes incapaces de inducir *CHAI* y, por tanto, utilizar treonina y/o serina como fuente de nitrógeno. Para ello, tras tratamiento mutagénico de la cepa TG107, se sembraron las células en cajas conteniendo serina y treonina como fuentes de nitrógeno. De los mutantes aislados, los denominados SG36, SG37, SG44, SG45, SG46 y SG49 tenían las siguientes características:

- (1) Capacidad de utilizar serina como fuente de nitrógeno.
- (2) Incapacidad de crecer en medio conteniendo treonina, tanto si ésta era la única fuente de nitrógeno como si, además, contenía amonio en cantidad suficiente como para ser utilizado como fuente de nitrógeno.
- (3) Capacidad de crecer con treonina si además se añadía al medio de cultivo homoserina o metionina (Fig. 4.1).

Este sería el fenotipo esperado si tuvieran la aspartoquinasa hipersensible a retroinhibición por treonina y, por consiguiente, fueron sometidos a los análisis que a continuación se exponen.

Con el fin de investigar el ligamiento a *HOM3* de la sensibilidad a treonina se cruzaron estos mutantes con la cepa XMP10-1B (*Hom3*⁻), analizándose la sensibilidad a treonina en los diploides correspondientes. Los diploides resultantes de las cepas SG36, SG37, SG44 resultaron ser resistentes a treonina, lo cual indicaba que no estaba afectados en *HOM3*, por lo que no fueron objeto de estudios posteriores. El crecimiento de los diploides procedentes de SG45, SG46 y SG49 se inhibía en presencia de treonina; se procedió al análisis de las tétradas procedentes de la esporulación de los mismos. Como control, se analizaron tétradas procedentes del cruzamiento entre la cepa parental de los mutantes sensibles a treonina, TG107, y la estirpe XMP10-1B.

Como se esperaba, se encontró una segregación 2 *Hom*⁺ : 2 *Hom*⁻ en todas las tétradas analizadas; debido a que la presencia de homoserina anula el efecto inhibitorio de la treonina, sólo se pudo probar la sensibilidad a treonina en los productos meióticos *Hom*⁺. En todas las tétradas procedentes de los diploides SG45/XMP10-1B (9 en total) y

SG49/XMP10-1B (12 en total), los dos productos Hom⁺ resultaron ser sensibles a treonina, lo cual indicaba que existía ligamiento entre el determinante de la sensibilidad a treonina y el locus *HOM3*. En el caso de SG46/XMP10-1B, se obtuvo una tétrada (de un total de 18) en la cual uno de los productos Hom⁺ resultó ser resistente a treonina; en el resto de las tétradas se obtuvo la misma segregación fenotípica que en los dos cruzamientos anteriores. Como era de esperar, todas las esporas Hom⁺ del cruzamiento control TG107/XMP10-1B eran resistentes a treonina.

Efectos de la treonina y la metionina sobre el crecimiento en medio líquido de las cepas SG45, SG46 y SG49

Con el fin de determinar si la inhibición del crecimiento por treonina era un fenómeno irreversible, se realizaron experimentos con cultivos en medio líquido, a los que se añadía treonina durante la fase exponencial de crecimiento, a una concentración final de 1g/l. Transcurrido un tiempo, durante el cual se incubaron en las mismas condiciones los cultivos con y sin treonina, se añadía metionina a los cultivos que contenían treonina. Los resultados de estos experimentos, representados en la Figura 4.2, muestran que el efecto inhibitorio de la treonina se manifiesta de forma prácticamente inmediata, provocando el cese o la disminución drástica del crecimiento en los cultivos de las cepas sensibles. La adición de metionina permitía que los cultivos de las cepas sensibles reanudaran su crecimiento.

Análisis bioquímico de los mutantes SG45, SG46 y SG49

Con el fin de determinar si estaba afectada la aspartoquinasa, se abordó su purificación parcial y posterior análisis bioquímico en las tres estirpes mutantes, así como en la estirpe parental, siguiendo el procedimiento descrito en Metodos.

Los resultados de los ensayos anteriores, representados en la Tabla 4.II, muestran que los extractos procedentes de las cepas mutantes tenían una reducida actividad específica en comparación con la observada en la cepa parental. Así, la sensibilidad a treonina de estas cepas podría estar determinada por:

- (1) una AK que fuera hipersensible a la retroinhibición

Tabla 4.II. Actividad aspartokinasa en los extractos parcialmente purificados obtenidos a partir de las estirpes TG107, SG45, SG46 y SG49. Cada medida de actividad se realizó al menos dos veces, y se calculó la media de los valores obtenidos.

| Cepa | Actividad específica (mU . mg ⁻¹ proteína) |
|-------|--|
| TG107 | 804 |
| SG45 | 147 |
| SG46 | 5 |
| SG49 | 16 |

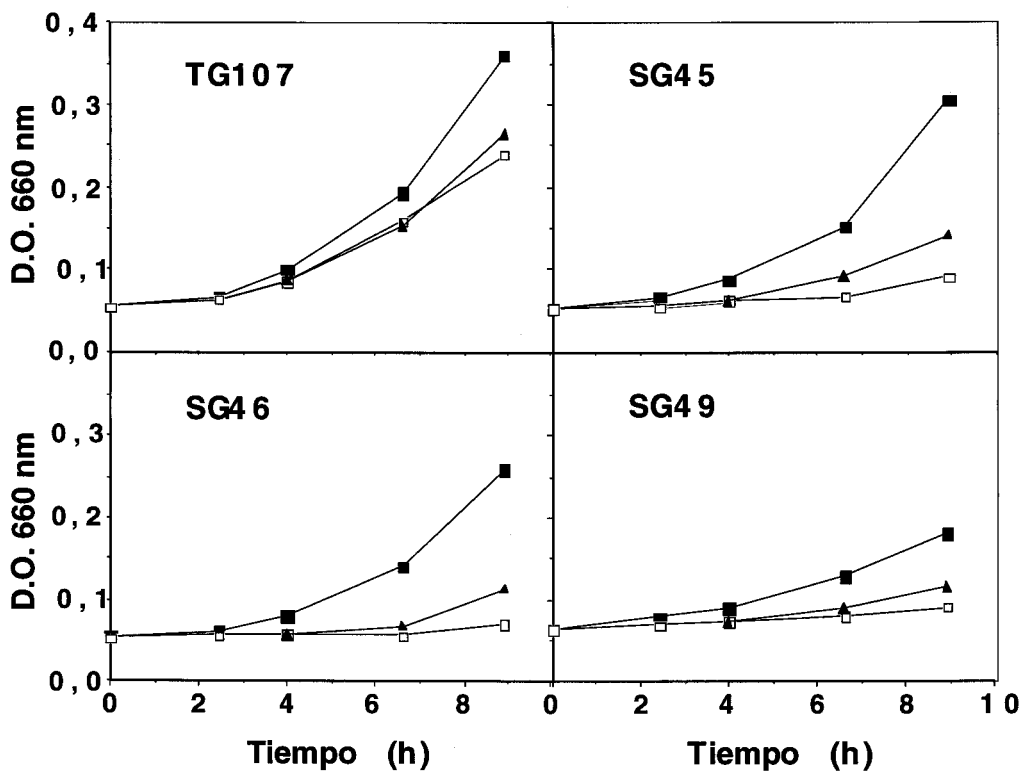


Figura 4.2. Crecimiento de las estirpes TG107, SG45, SG46 y SG49 en medio SD suplementado con L-isoleucina y L-triptófano (—■—), y en el mismo medio más L-treonina (—□—). A tiempo $t=4$ horas se añadió L-metionina a una parte del cultivo que contenía L-treonina, y se siguió el crecimiento de este nuevo cultivo (—▲—).

(2) una AK que fuera igual de sensible a treonina que la silvestre pero que debido a baja actividad enzimática, fuera insuficiente en presencia de treonina.

(3) ambas cosas

Con el fin de discernir entre estas posibilidades se determinó el grado de inhibición por treonina de las AK de las cepas mutantes.

La baja actividad específica que exhibían los extractos procedentes de las cepas SG46 y SG49 no permitía siquiera la realización de ensayos de inhibición fiables, al menos en estas circunstancias (ver más adelante); estos ensayos se llevaron a cabo sólo con los extractos de la cepa SG45 y de la estirpe parental TG107. Los resultados (Figura 4.3) muestran que, efectivamente, la AK de la cepa SG45 es más sensible a inhibición por treonina que la parental.

Clonación de los alelos *hom3* presentes en las cepas SG45, SG46 Y SG49.

Tanto el análisis de tétradas como los ensayos de actividad AK realizados con los mutantes indicaba que el fenotipo de sensibilidad estaba asociado a la presencia de alelos *hom3* mutantes en estas cepas. Con el fin de confirmar estos resultados y de determinar el tipo de mutación, se abordó la clonación de los alelos *hom3* de las cepas mutantes, siguiendo la estrategia de rescate alélico descrita en Métodos. Como paso previo, se obtuvieron versiones *ura3* de las cepas sensibles, para poder utilizar el gen *URA3* del plásmido centromérico pMAC33Δh como marcador seleccionable en la transformación. La selección de mutantes *ura3* se realizó en medio con 5-FOA según se describe en el apartado n de Métodos. A partir de las cepas SG45 y SG46 se obtuvieron dos cepas *ura3*, denominadas respectivamente SG45-C5 y SG46-C10. Sin embargo, las cepas *ura3* obtenidas a partir de SG49 recertían al fenotipo Ura⁺ con una frecuencia muy alta, así que se obtuvo por usar la cepa XMA57-1A (ver Tabla 1.I), un descendiente meiótico Hom⁺ Ura⁻ Thr^S procedente del cruzamiento SG49/XMP10-1B.

A partir de las cepas SG45-C5, SG46-C10 y XMA57-1A y mediante el procedimiento del rescate alélico descrito en el apartado n de Métodos, se obtuvieron los plásmidos pMAC45S, pMAC46S y pMAC49S,

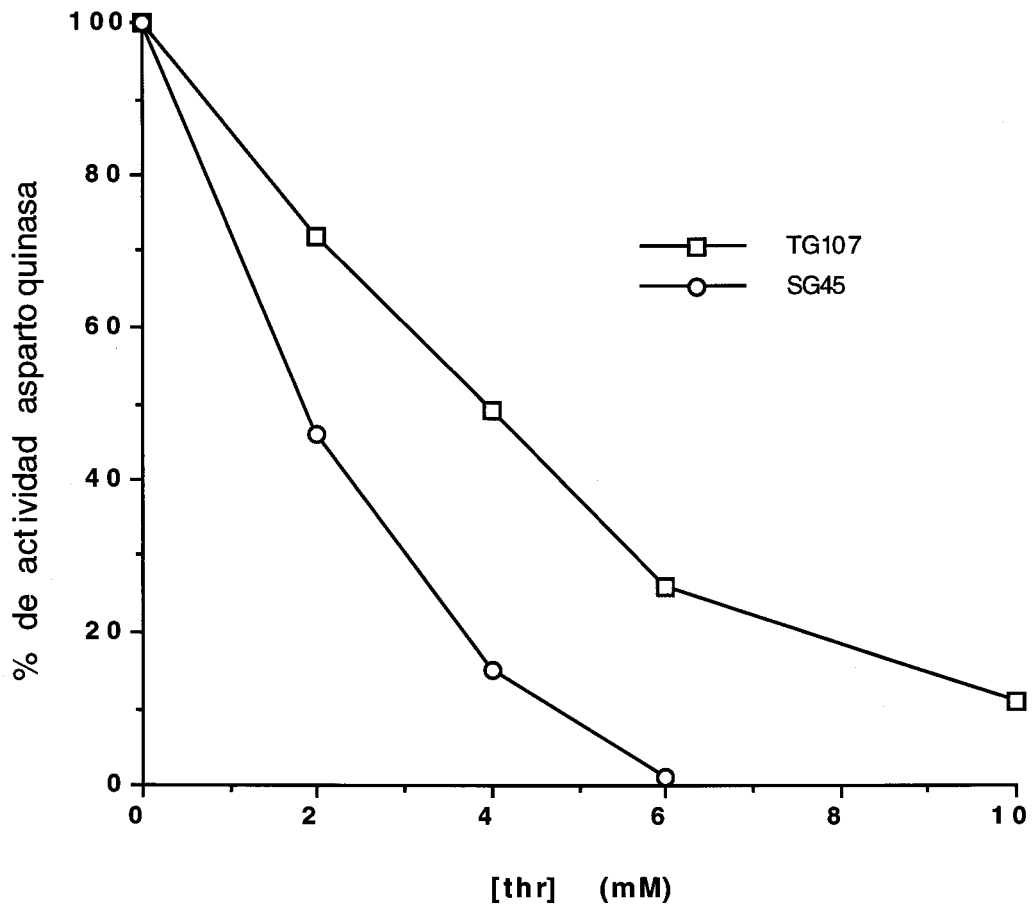


Figura 4.3. Efecto inhibitorio de la L-treonina sobre la actividad aspartoquinasa de las cepas TG107 y SG45.

respectivamente. Sometidos a digestión con *Hind*III y a electroforesis, estos plásmidos mostraban un patrón de restricción que coincidía con el del plásmido pMAC32wt, portador del alelo *HOM3* silvestre. Los alelos *hom3* portados por estos plásmidos fueron denominados *hom3-45S*, *hom3-46S* y *hom3-49S*, respectivamente.

Expresión de los alelos hom3-S clonados en un fondo genético hom3

Se pretendía averiguar si la presencia de los alelos mutantes *hom3-S* confería sensibilidad a treonina a una cepa *hom3*. La cepa *hom3* utilizada fué la HT1, que porta el alelo interrumpido *hom3::TRP1*. La razón de utilizar esta cepa era la siguiente: Las aspartoquinasa de otros organismos son agrupaciones oligoméricas, pero en *S. cerevisiae* no se ha demostrado su carácter mono- u oligomérico. Si la aspartoquinasa de *S. cerevisiae* fuera un oligómero, cabría la posibilidad de que el alelo *hom3* de la cepa receptora de la transformación produzca un péptido que, aún desprovisto de actividad catalítica, pueda interferir con la expresión de los alelos mutantes mediante la formación de dímeros híbridos con los péptidos producidos a partir de los alelos *hom3-S*. Así pues, se consideró conveniente utilizar un alelo *hom3* lo más deletado posible.

La cepa HT1 fué transformada con los plásmidos pMAC45S, pMAC46S y pMAC49S, así como con el plásmido pMAC32wt, portador del alelo *HOM3* silvestre. Una vez obtenidos los transformantes, por selección en medio SD+Trp+Ile+Thr+Met se probó el crecimiento de los mismos en medios SD+Trp+Ile y SD+Trp+Ile con treonina (1g/l). En el primero de ellos crecieron todos los transformantes, lo que demuestra que todos los plásmidos contenían alelos funcionales de *HOM3*. Sin embargo, sólo el transformante que llevaba el plásmido pMAC32wt (*HOM3*) era capaz de crecer en este medio con 1g/l, lo que implica que los alelos *hom3-S* confieren el carácter Thr^S a la cepa HT1.

Efecto del incremento en la dosis génica de los alelos hom3-S sobre la sensibilidad a treonina.

Según estudios anteriores (Martín-Rendón *et al.*, 1993), la presencia del alelo silvestre *HOM3* en alto número de copias en *S. cerevisiae* incrementa de forma considerable los niveles celulares de actividad aspartoquinasa. Considerando que la baja actividad aspartoquinasa

detectada en los extractos procedentes de las cepas SG45, SG46 y SG49 podría ser responsable del fenotipo de sensibilidad a treonina que presentan dichas cepas se estudió el efecto de aumentar la dosis génica de cada uno de estos alelos sobre el fenotipo de sensibilidad.

Para ello, y según se describe en el apartado n de Métodos, se contruyeron los plásmidos pMAE45, pMAE46 and pMAE49 a partir de los plásmidos centroméricos pMAC45S, pMAC46S y pMAC49S. Con estos plásmidos se transformó la cepa HT1, y se analizó el crecimiento de los transformantes en diferentes medios de cultivo, en presencia y ausencia de treonina. Los resultados se muestran en la Figura 4. Como puede observarse, los transformantes con los plásmidos pMAEP45 y pMAEP46 se comportan como el que contiene el plásmido pMAC32^{wt}, es decir, no muestran sensibilidad a treonina. El transformante obtenido a partir de pMAE49 es parcialmente resistente a treonina.

Caracterización de la actividad aspartoquinasa en cepas con alto número de copias de los alelos hom3-S

Los resultados aquí expuestos no descartan ninguna de las hipótesis propuestas con anterioridad acerca de la causa de la sensibilidad a treonina en los mutantes SG. Por ello, se procedió a la caracterización de la actividad aspartoquinasa de la cepa HT1 transformada con los alelos hom3-S en alto número de copias.

Así, se purificó la aspartoquinasa según se describe en el apartado n de Métodos, de las cepas HT1[pMAE45], HT1[pMAE46] y HT1[pMAE49], y se realizaron ensayos enzimáticos con los siguientes fines:

- (1) Determinar la actividad aspartoquinasa.
- (2) Determinar las afinidades de estas enzimas mutantes por sus sustratos, aspartato y ATP, expresadas como sus respectivas K_M por estos sustratos.
- (3) Determinación de la inhibición por L-treonina de las aspartoquinasas mutantes

A partir de los transformantes, y según los procedimientos descritos en Métodos, se obtuvieron y ensayaron extractos parcialmente

purificados, con los resultados que se muestran en la Tabla IV. Como era de esperar, la actividad específica aspartokinasa es sensiblemente más elevada en los transformantes que portan los alelos *hom3-S* en alto número de copias, cuando se compara con la de los extractos procedentes de las cepas sensibles originales.

Para el cálculo de la K_M para L-aspartato se realizaban series de ensayos de actividad en los cuales se mantenía una concentración constante de ATP, fijada en 10 mM, y se determinaba la velocidad inicial en presencia de distintas concentraciones de L-aspartato. Como control, se realizaron los mismos experimentos con extracto procedente de la cepa parental de los mutantes TG107. Con los datos obtenidos se realizaban representaciones de dobles inversos, según la transformación de Lineweaver-Burk (Figuras 5a y 5b). Para el cálculo de la K_M para ATP se realizaron experimentos similares a los anteriores, pero manteniendo a 10 mM la concentración de L-aspartato y se variando la concentración de ATP (Figuras 6a y 6b). A partir de las representaciones de dobles inversos se obtuvieron los valores aproximados de K_M que se muestran en la Tabla V.

La elevada actividad específica observada en los extractos obtenidos a partir de los transformantes permitía la realización de ensayos de inhibición por L-treonina de las aspartokinasas AK-46 y AK-49, así como la repetición de estos mismos ensayos con la aspartokinasa AK-45. Para ello, se realizaron ensayos de inhibición según se describe en el apartado n de Métodos.

La Figura 4.7 muestra los resultados obtenidos

Como puede observarse, la curva de inhibición correspondiente a AK-45 difería sensiblemente a la obtenida con anterioridad (Figura 4.3); los nuevos datos parecen indicar que el grado de inhibición por L-treonina es aproximadamente el mismo para las enzimas AK-45 y AK-49, cuando se comparan con la silvestre AK-107. No se ha encontrado una explicación satisfactoria a la discrepancia observada entre las dos series de datos relativos a la inhibición de la aspartoquinasa AK-45.

En cambio, la aspartoquinasa AK-46 era más sensible a inhibición que la enzima silvestre. En presencia de 2mM treonina, la actividad de AK-46 se inhibía en más de un 97%, alrededor de 30 veces más que la enzima silvestre, que lo hacía sólo en un 30%, aproximadamente, a la misma concentración de treonina.

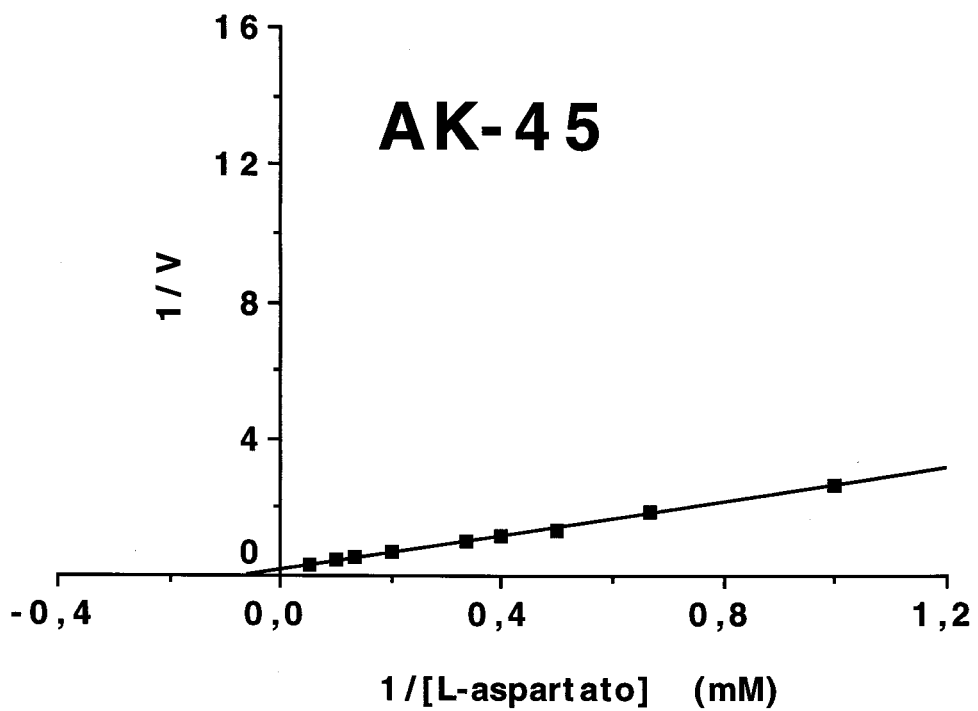
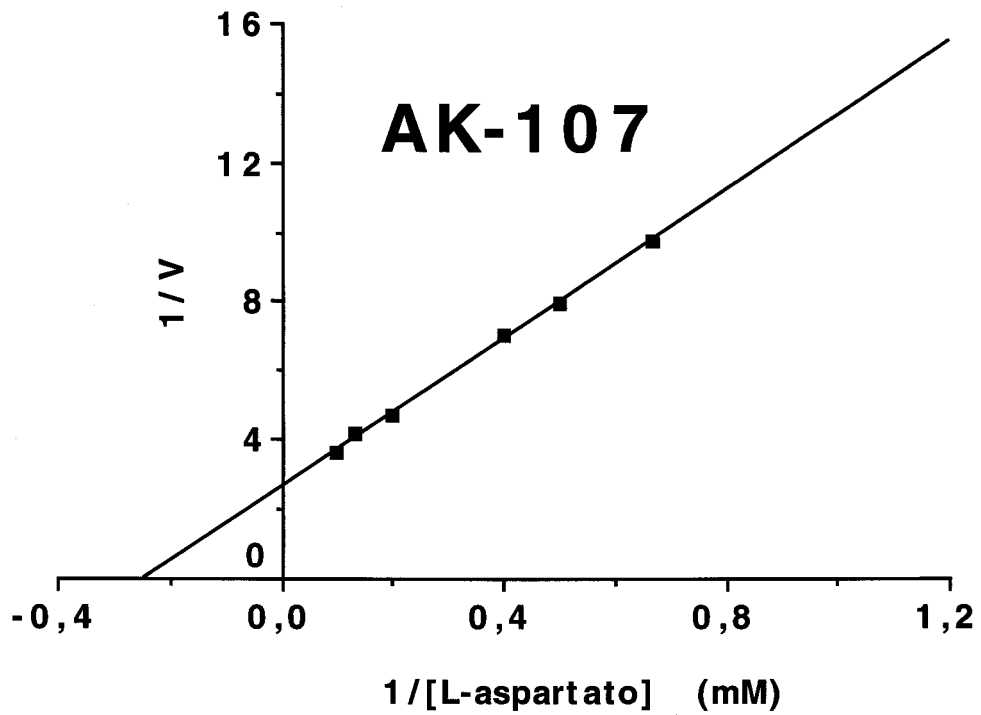


Figura 4.5a. Variación de la actividad de las aspartoquinasas AK-107 y AK-45 con la concentración de L-aspartato. V: velocidad inicial ($-\Delta D.O.340nm \cdot min^{-1}$).

La concentración de ATP se mantuvo constante a 10 mM.

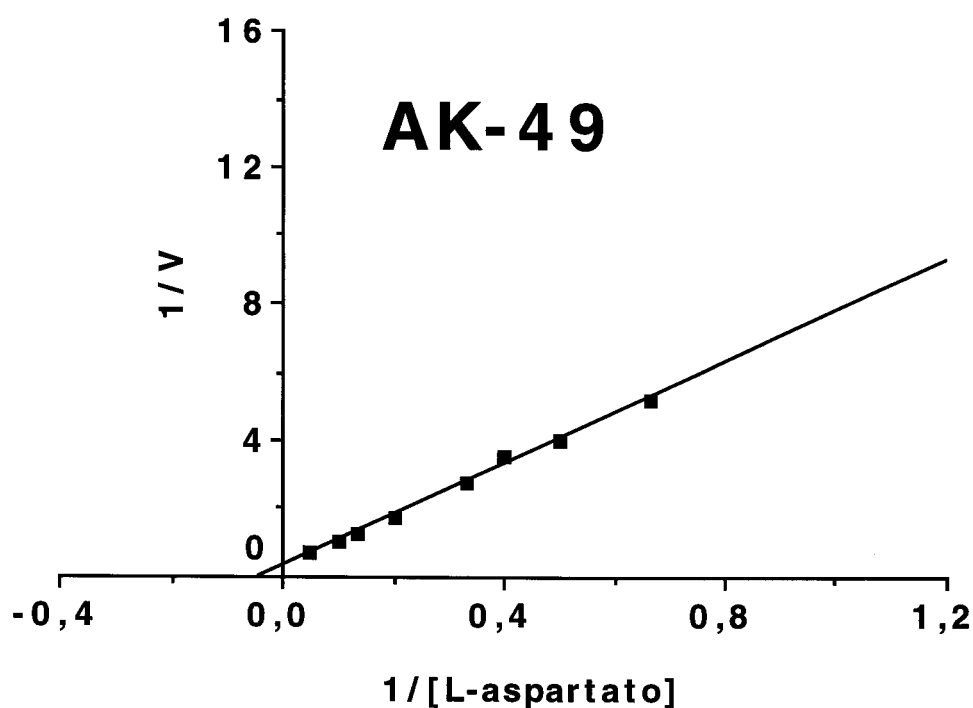
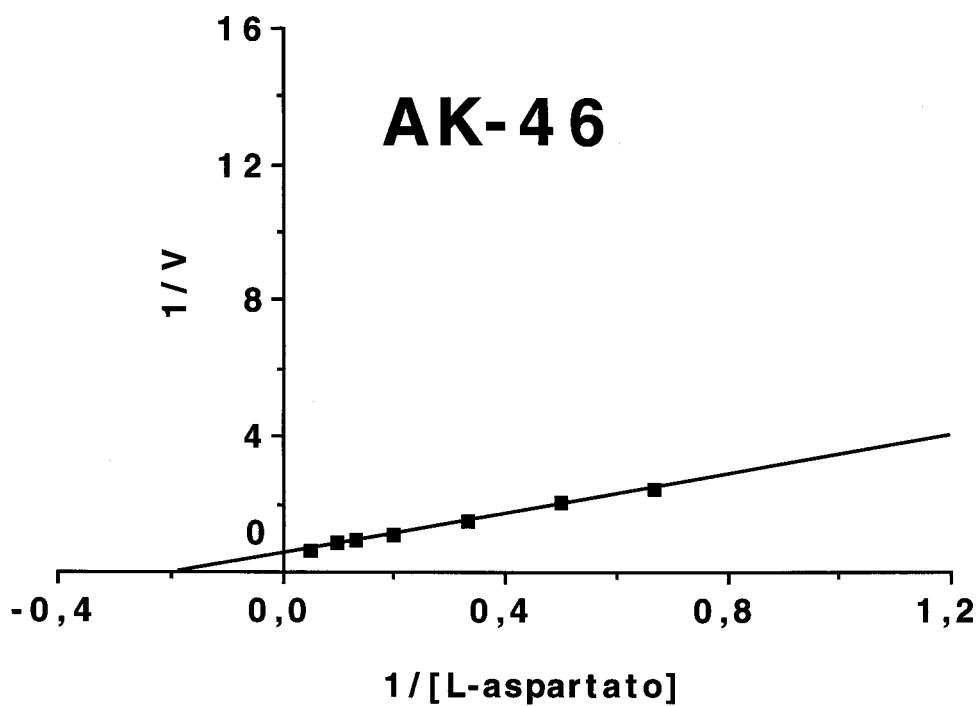


Figura 4.5b. Variación de la actividad de las aspartoquinasas AK-46 y AK-49 con la concentración de L-aspartato. V : velocidad inicial ($-\Delta D.O.340nm \cdot min^{-1}$).

La concentración de ATP se mantuvo constante a 10 mM.

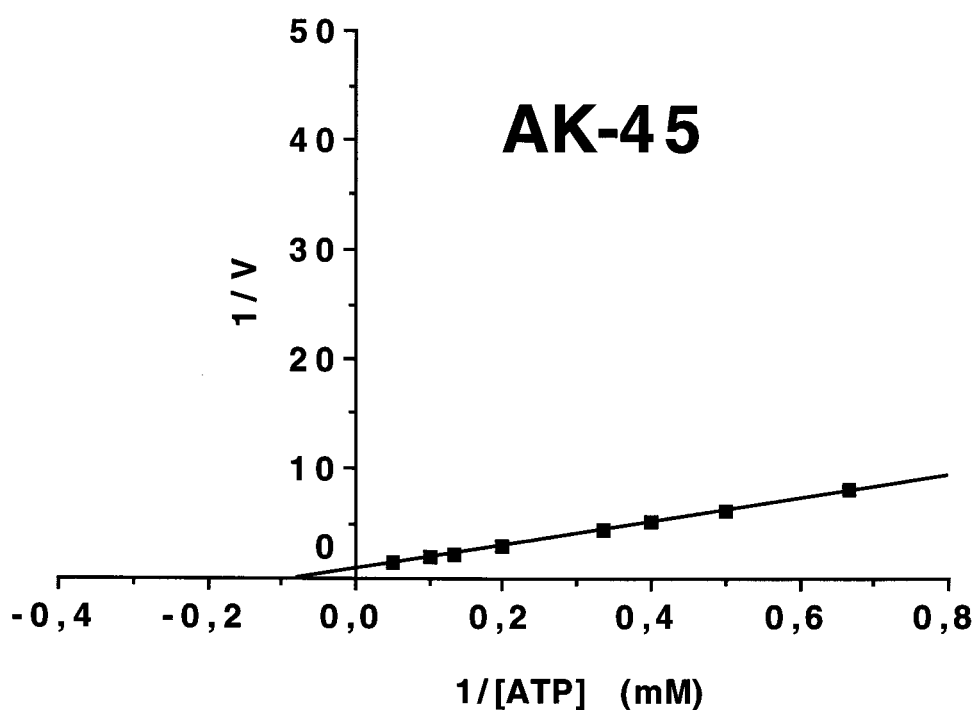
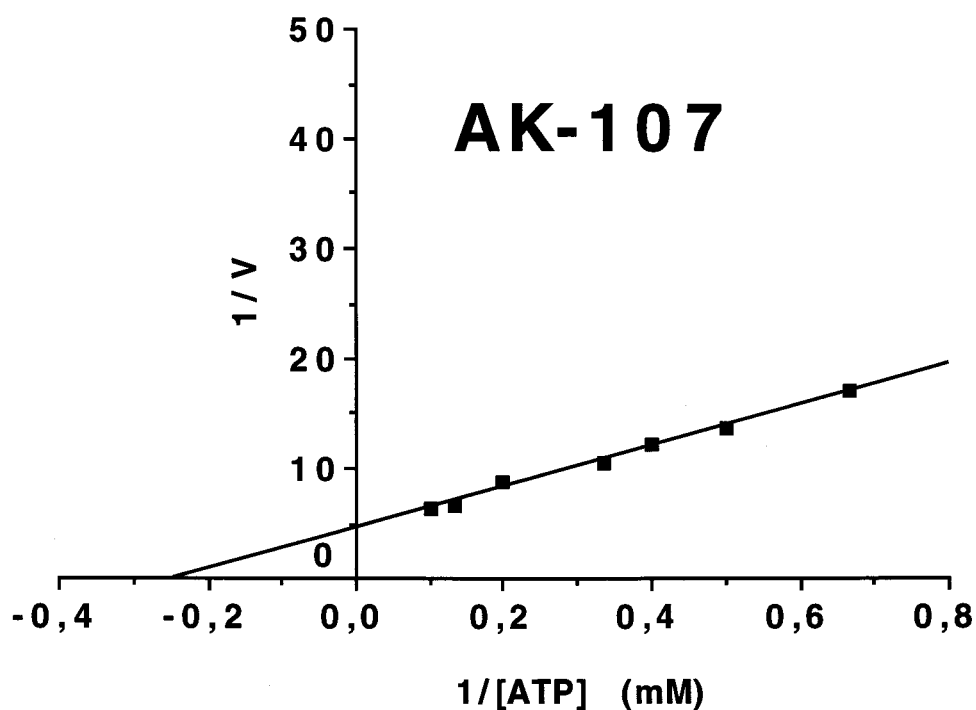


Figura 4.6a. Variación de la actividad de las aspartoquinasas AK-107 y AK-45 con la concentración de ATP. V: velocidad inicial ($-\Delta D.O.340nm \cdot min^{-1}$).

La concentración de L-aspartato se mantuvo constante a 10 mM.

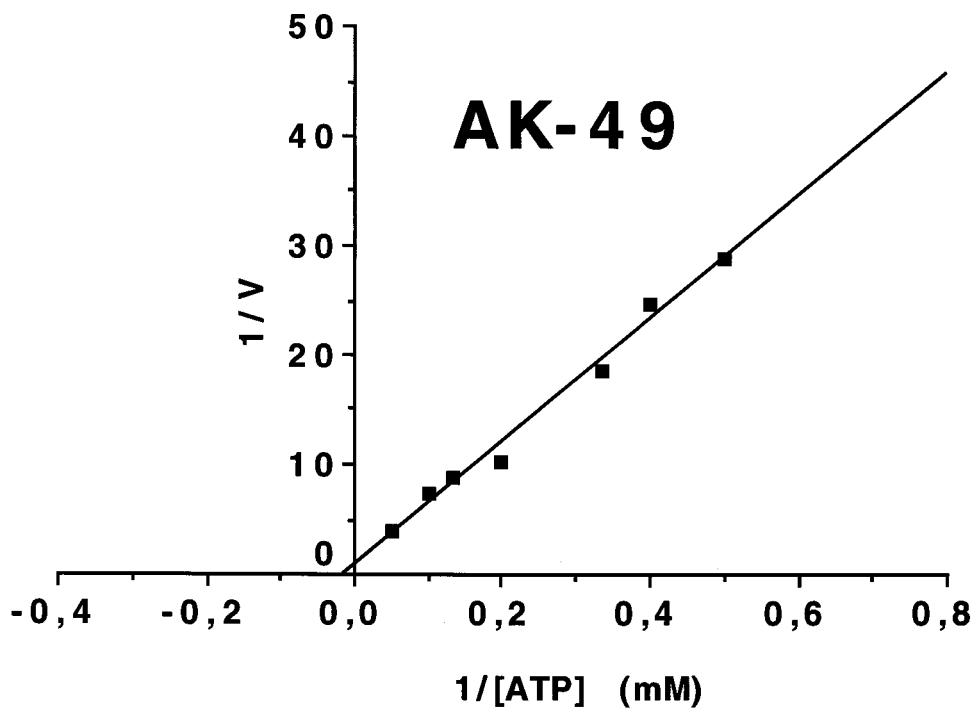
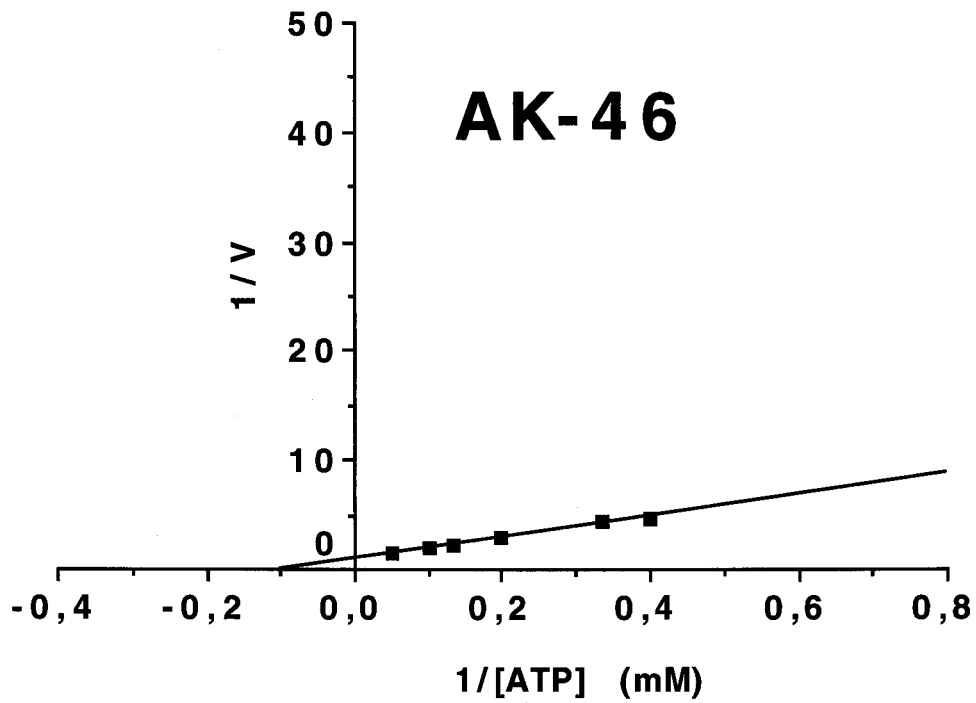


Figura 4.6b. Variación de la actividad de las aspartoquinasas AK-107 y AK-45 con la concentración de ATP. V: velocidad inicial ($-\Delta D.O.340nm \cdot min^{-1}$).

La concentración de L-aspartato se mantuvo constante a 10 mM.

Tabla 4.V. Valores aparentes de K_M para L-aspartato y para ATP calculados a partir de las representaciones de dobles inversos

| Aspartoquinasa | K_M L-aspartato (mM) | K_M ATP (mM) |
|----------------|------------------------|----------------|
| AK-107 | 4.06 | 4.18 |
| AK-45 | 13.97 | 12.58 |
| AK-46 | 5.55 | 9.90 |
| AK-49 | 25.80 | 58.81 |

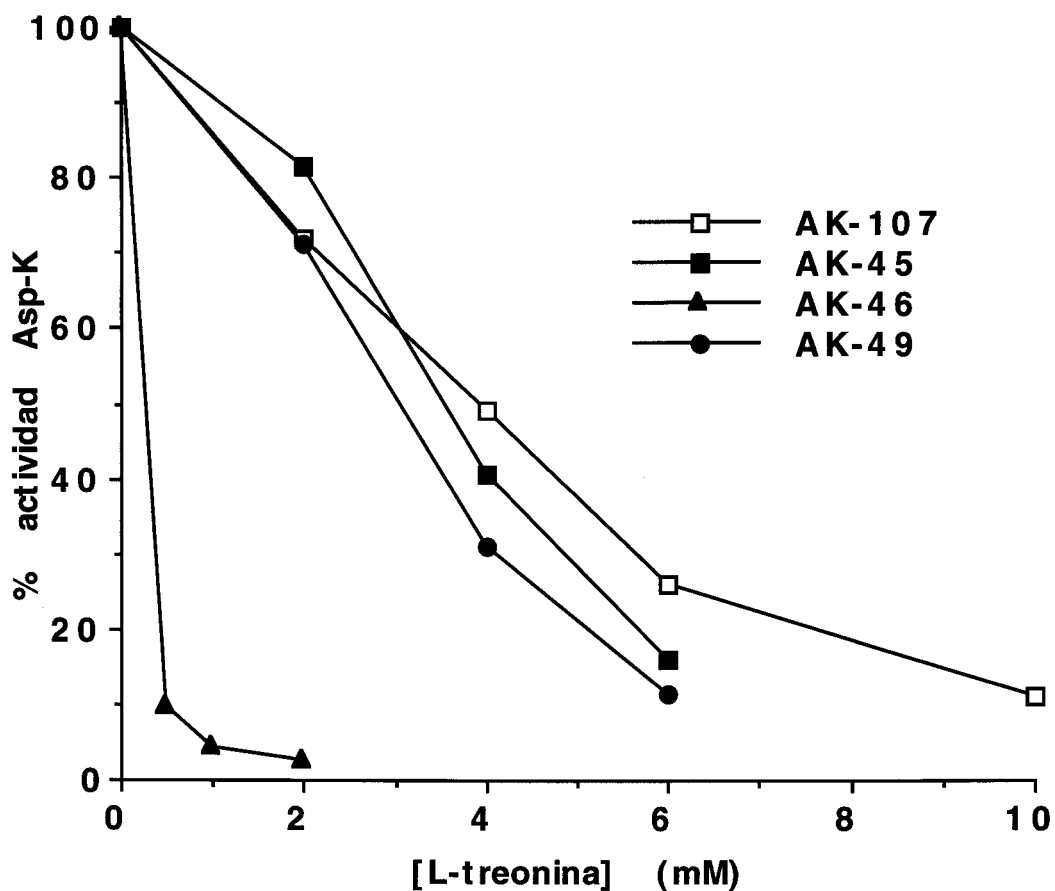


Figura 4.7. Inhibición de las aspartokinasas AK-107, AK-45, AK-46 y AK-49 en presencia de distintas concentraciones de L-treonina. Para cada valor de concentración de L-treonina, la actividad aspartokinasa resultante se expresa como porcentaje de la observada en ausencia del aminoácido. La curva correspondiente a la enzima silvestre AK-107 es la misma que se muestra en la **Figura 4.3**.

Determinación de la secuencia de ADN de los alelos *hom3-S*

Con el fin de determinar el tipo de mutación de los alelos *hom3-S* se secuenciaron éstos mediante procedimiento manual descrito en el apartado 8.1 de Métodos.

En la Tabla 4.VI se detallan las mutaciones halladas dentro de la región codificante para *HOM3* y los cambios que éstas producirían en la cadena peptídica. En la Figura 4.8 se muestra un esquema de la situación de los cambios dentro de la secuencia de la aspartoquinasa de *S. cerevisiae*. Al comparar la secuencia de la enzima en la levadura con las de otros organismos, se pone de manifiesto que los cambios predichos para *AK-S45* y *AK-S49* se localizan dentro de una región muy conservada en todas las aspartoquinasas, mientras que el cambio en *AK-S46* se sitúa en otra región muy distante de la primera.

Mutagénesis de la región KFGG de la aspartoquinasa

La proximidad de las mutaciones halladas en las secuencias de los alelos *hom3-45S* y *hom3-49S* al motivo KFGG indicaba que esta región, altamente conservada, podría estar relacionada con el sitio activo de la aspartokinasa, aunque también podría jugar algún papel en la modulación de la actividad, como así lo indicaba la aparente hipersensibilidad de la aspartokinasa *AK-45* a inhibición por treonina. Con el fin de contrastar estas hipótesis, se llevaron a cabo dos experimentos de mutagénesis dirigida.

El primero de ellos estaba encaminado a eliminar el motivo KFGG de la aspartoquinasa; si la inhibición por treonina de la actividad depende de esta región, su eliminación podría resultar en una aspartoquinasa resistente a retroinhibición, o alternativamente, una aspartoquinasa inactiva.

El segundo experimento era la mutagénesis al azar de una región de 64 pares de bases de la secuencia de *HOM3*, centrada en los cuatro codones correspondientes al motivo KFGG de la aspartoquinasa. El propósito de este experimento era el de obtener una serie de alelos mutantes, a partir de la cual se podrían seleccionar para posteriores estudios aquellos alelos cuya presencia en la levadura confiriese a la misma un fenotipo interesante. Si la región mutagenizada estaba implicada en la regulación de la actividad enzimática cabría esperar tres fenotipos mutantes diferentes en la cepa HT1 transformada con los distintos alelos:

Tabla 4.VI. Mutaciones encontradas en las secuencias nucleotídicas de los alelos *HOM3-S45*, *HOM3-S46* y *HOM3-S49*.

| Alelo | Posición en la secuencia de ADN | Mutación | Cambio en la secuencia de aminoácidos |
|----------------|---------------------------------|----------|---------------------------------------|
| <i>HOM3-45</i> | 441 | A → T | Lis ₂₆ → Ile |
| <i>HOM3-46</i> | 1580 | G → A | Ala ₄₀₆ → Thr |
| <i>HOM3-49</i> | 438 | G → A | Gly ₂₅ → Asp |

| | | | | | | |
|-------|----|---------------|----------------|---------------|-------------|-----------|
| At | 71 | NSVENGHLPKGD | SWAVHKFGGTCVGN | SERIKDVA | AVV | 107 |
| Dc | 79 | DSVEKVHLPRG | MWSIHKFGGTCVGS | SERIRNVA | EIV | 115 |
| Zml | 81 | QAEA IADLPKGD | MWSVHKFGGTCMGT | SERIHNV | ADIV | 117 |
| ZmII | 78 | QDEVNTYLPKGD | MWSVHKFGGTCMGT | PKRIQCV | ANIV | 114 |
| Hi | 1 | - - - - - | - - - - - | MRVLKFGGTS | LANPERFSQA | AKLI 24 |
| Sm | 1 | - - - - - | - - - - - | MRVLKFGGTS | VANAERFLRV | ADIM 24 |
| Ecl | 1 | - - - - - | - - - - - | MRVLKFGGTS | VANAERFLRV | ADIL 24 |
| EcII | 1 | MSVIAQAGAKG | - - RQLHKFGGSS | LADV | KCYLRVAGIM | 35 |
| EcIII | 1 | - - - - - | - - - - - | MSEIVVSKFGGTS | VADFDAMNRS | ADIV 27 |
| BstII | 1 | - - - - - | - - - - - | MGLIVQKFGGTS | VGSIERIQHV | ANRV 26 |
| BsplI | 1 | - - - - - | - - - - - | MGLIVQKFGGTS | VGSVERILNV | ANRV 26 |
| Bsl | 1 | - - - - - | - - - - - | MKILIVQKFGGTS | VKDDKGRKLA | LGHI 26 |
| BsII | 1 | - - - - - | - - - - - | MGLIVQKFGGTS | VGSVEKIQNA | ANRA 26 |
| Cg | 1 | - - - - - | - - - - - | MALVVQKYGGSS | LESAERIRNVA | ERI 26 |
| Cf | 1 | - - - - - | - - - - - | MALVVQKYGGSS | LESAERIRNVA | ERI 26 |
| Ms | 1 | - - - - - | - - - - - | MALVVQKYGGSS | VADAERIRRVA | ERI 26 |
| Tf | 1 | - - - - - | - - - - - | MALVVQKYGGTS | VGDLERIHKVA | QRI 26 |
| Sc | 1 | MPMDFQPTSSHS | NWVVQKFGGTS | VGKFPVQI | VDDIVK | 37 |
| SG45 | 1 | MPMDFQPTSSHS | NWVVQKFGGTS | VG | IFPVQI | VDDIVK 37 |
| SG49 | 1 | MPMDFQPTSSHS | NWVVQKFGGTS | V | DKFPVQI | VDDIVK 37 |

Figura 4.8. Región de las aspartoquinasas correspondiente al motivo KFGG. Se indican los cambios deducidos para las aspartoquinasas de los mutantes SG45 y SG49.

| | | | |
|-------|-----|---|-----|
| At | 395 | G F A T I D N L A L V N V E G A G M A G V P G T A S A I F S A V K E V G A N V I M I S Q | 438 |
| Dc | 405 | G F A T I D N L A L I N V E G T G M A G V P G T A T A I F G A V K D V G A N V I M I S Q | 448 |
| Zml | 404 | A F A T I D K L A L V N V E G T G M A G V P G T A N A I F G A V K D V G A N V I M I S Q | 447 |
| Zmll | 401 | S F A T V D N L A L V N V E G T G M A G V P G T A S A I F S A V K D V G A N V I M I S Q | 444 |
| Hi | 308 | G I T N L D N L A M F N V S G P G M Q G M V G M A S R V F S A M S G A G I S V I L I T Q | 351 |
| Sm | 308 | G I T N L N N M A M I N V S G P G M K G M V G M A A R V F A V M S R A G I S V V L I T Q | 351 |
| Ecl | 308 | G I S N L N N M A M F S V S G P G M K G M V G M A A R V F A A M S R A R I S V V L I T Q | 351 |
| Ecll | 310 | I V T S H D D V C L I E F Q V P A S Q D F K L A H K E I D Q I L K R A Q V R P L A V G V | 353 |
| Eclll | 301 | A L A L R R N Q T L L T L H S L N M L H S R G F L A E V F G I L A R H N I S V D L I T | 343 |
| Bstll | 254 | G I A F E D Q V T R V T V - - V G I E K Y L Q S V A T I F T A L A N R G I N V D I I I Q | 295 |
| Bspll | 254 | G V A F E D E I T R V T V - - F G L P N S L T S L S T I F T T L A Q N R I N V D I I I Q | 295 |
| Bsl | 264 | G I A H V K D V T Q F K V - - P A K I G Q Y N V Q T E V F K A M A N A G I S V D F F - - | 303 |
| Bsll | 254 | G I A F E D Q I T R V T I - - Y G L T S G L T T L S T I F T T L A K R N I N V D I I I Q | 295 |
| Cg | 257 | G V A T D K S E A K V T V - - L G I S D K P G E A A K V F R A L A D A E I N I D M V L Q | 298 |
| Cf | 257 | G V A T D K S E A K V T V - - L G I S D K P G E A A K V F R A L A D A E I N I D M V L Q | 298 |
| Ms | 257 | G V A H D R S E A K V T V - - V G L P D V P G Y A A K V F R A V A E A D V N I D M V L Q | 298 |
| Tf | 253 | G V A L D L D H A Q I G L - - I G I P D Q P G I A A K V F Q A L A E R G I A V D M I I Q | 294 |
| Sc | 355 | A I T T K N D I F V I N I H S N K K T L S H G F L A Q I F T I L D K Y K L V D L I - - | 396 |
| | | | |
| At | 439 | A - - - - S S E H S V C F A V P E K E V K A V S E E L N S R F R Q A L A G G R L S Q I | 477 |
| Dc | 449 | A - - - - S S E H S I C F A V P E S E V K A V A K A L E A R F R Q A L D A G R L S Q V | 487 |
| Zml | 448 | A - - - - S S E H S V C F A V P E K E V A L V S A A L H A R F R E A L A A G R L S K V | 486 |
| Zmll | 445 | A - - - - S S E H S V C F A V P E K E V A V V S A E L H D R F R E A L A A G R L S K V | 483 |
| Hi | 352 | S - - - - S S E Y S I S F C V P V K S A E V A K T V L E T E F A N E L N E H Q L E P I | 390 |
| Sm | 352 | Ⓢ - - - - S S E Y S I S F C V P Q G E L Q R A R R A L E E E F Y L E L K D G V L D P L | 390 |
| Ecl | 352 | S - - - - S S E Y S I S F C V P Q S D C V R A E R A M L E E F Y L E L K E G L E P L | 390 |
| Ecll | 354 | H - - - - N D R Q L L Q F C Y T Q S E V A D S A L K I L D E - - - - A G L P G E L | 385 |
| Eclll | 344 | - - - - - T S E V S V A L T L D T T G S T S T G D T L L T - Q S L L M E L S A L C R V | 380 |
| Bstll | 296 | - - N A T N S E T A S V S F S I R T E D L P E T L Q V L Q A - - - - L E G A D - - - V | 329 |
| Bspll | 296 | - - S A T D A E T T N L S F S I K S D D L E E T M A V L E N - N K N L L N Y Q G - - - I | 333 |
| Bsl | 304 | - - - - - N I T P S E I V Y T V A G N K T E T A Q R I L - - - - M D M G Y D P - - - M | 334 |
| Bsll | 296 | - - T Q A E - D K T G I S F S V K T E D A D Q T V A V L E E - Y K D A L E F E K - - - I | 332 |
| Cg | 299 | N V Ⓢ V E D G T T D I T F T C P R S D G R R A M E I L K K - L Q V Q G N W T N - - - V | 338 |
| Cf | 299 | N V S S V E D G T T D I T F T C P R A D G R R A M E I L K K - L Q V Q G N W T N - - - V | 338 |
| Ms | 299 | N I S K I E D G K T D I T F T C A R D N G P R A V E K L S A - L K S E I G F S Q - - - V | 338 |
| Tf | 295 | G V P G H D P S R Q Q M A F T V K K D F A Q E A L E A L E P - V L A E I G - G E - - - A | 333 |
| Sc | 397 | - - - S T S E V H V S M A L P I P D A D S L K S L R Q A E E K L R I - - - - - L G S V | 431 |
| | | | |
| SG46 | 397 | - - - S T S E V H V S M T L P I P D A D S L K S L R Q A E E K L R I - - - - - L G S V | 431 |
| | | | |
| At | 478 | E I I P N C S I L A A V G Q K M A S T P G V S A T F F N A L A K A N I N I R A I A Q G C | 521 |
| Dc | 488 | A N N P N C S I L A T V G Q K M A S T P G V S A T L F N A L A K A N I N V R A I A Q G C | 531 |
| Zml | 487 | E V I H N C S I L A T V G L R M A S T P G V S A T L F D A L A K A N I N V R A I A Q G C | 530 |
| Zmll | 484 | E V I N G C S I L A A V G L R M A S T P G V S A I L F D A L A K A N I N V R A I A Q G C | 527 |
| Hi | 391 | E V I K D L S I I S V V G D G M K Q A K G I A A R F F S A L A Q A N I S I V A I A Q G S | 434 |
| Sm | 391 | D V M E R L A I I S V V G D G M R T L R G I S A R F F S A L A R A N I N I V A I A Q G S | 434 |
| Ecl | 391 | A V A E R L A I I S V V G D G L R T L R G I S A K F F A A L A R A N I N I V A I A Q G S | 434 |
| Ecll | 386 | R L R Q G L A L V A M V G A G V T R N P L H C H R F W Q Q L K G Q P V E F T W - - Q S D | 427 |
| Eclll | 381 | E V E E G L A L V A L I G N D L S K A C G V G K E V F G V L E P F N I R M I C Y G A S - | 423 |
| Bstll | 330 | H Y E S G L A K V S I V G S G M I S N P G V A A R V F E V L A D Q G I E I K M V S I S - | 372 |
| Bspll | 334 | E S E T G L A K V S I V G S G M I S N P G V A A K M F E V L A L N G I Q V K M V S T S - | 376 |
| Bsl | 335 | V - T R N C A K V S A V G A G I M G V P G V T S K I V S A L S E K E I P I L Q S A D S - | 376 |
| Bsll | 333 | E T E S K L A K V S I V G S G M V S N P G V A A E M F A V L A Q K N I L I K M V S T S - | 375 |
| Cg | 339 | L Y D D Q V G K V S L V G A G M K S H P G V T A E F M E A L R D V N V N I E L I S T S - | 381 |
| Cf | 339 | L Y D D Q V D K V S L V G A G M K S H P G V T A E F M E A L R D V N V N I E L I S T S - | 381 |
| Ms | 339 | L Y D D H I G K V S L I G A G M R S H P G V T A T F C E A L A E A G I N I D L I S T S - | 381 |
| Tf | 334 | I L R P D I A K V S I V G V G L A S T P E V P A K M F Q A V A S T G A N I E M I A T S - | 376 |
| Sc | 432 | D I T K K L S I V S L V G K H M K Q Y I Ⓢ I A G T M F T T L A E E G N I E M I S Q G A | 475 |

Figura 4.9. Región de las aspartoquinasas presuntamente implicada en la regulación de la actividad. Se indica el cambio deducido para la aspartoquinasa del mutante SG46. Los residuos encerrados en un círculo se encuentran en posiciones donde se han encontrado cambios que desregulan las aspartoquinasas de *S. marcescens* (G330->D; S352->F), *C. glutamicum* (S301->Y) y *S. cerevisiae* (G452->D).

-sensibilidad a treonina, causada por la presencia de un alelo *hom3* que codifica para una aspartoquinasa hipersensible a inhibición por treonina.

-superproducción de treonina, ocasionada por la presencia de una aspartoquinasa insensible a retroinhibición por treonina.

-auxotrofia de treonina y metionina, debida a un alelo nulo o codificante de una aspartoquinasa no funcional.

(a) Delección por PCR de la región KFGG

En este procedimiento mutagénico, descrito en Métodos, la secuencia silvestre de *HOM3* servía como molde para la amplificación *in vitro*, por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de un fragmento de ADN que contenía la delección, y que más tarde reemplazaría al fragmento original en *HOM3*.

Para ello, utilizando la secuencia de nucleótidos del gen *HOM3* publicada por Rafalski y Falco (1988), se diseñó el oligonucleótido DEL1, cuya secuencia presentaba, con respecto a la secuencia silvestre, una delección de 12 bases, correspondientes a los 4 tripletes determinantes de la secuencia de aminoácidos KFGG en la aspartoquinasa. Este oligonucleótido y el denominado OLIGO I (ver Figura 2.6) se utilizaban como cebadores, en una primera reacción de amplificación en la cual, tomando como molde la secuencia de *HOM3*, se amplificaba un fragmento de 264 pares de bases que contenía la delección.

A continuación, el producto de esta reacción, junto con el cebador HOM pri A (ver Figura 2.6), se usaba en una segunda reacción, en la que se generaba un fragmento de 508 pares de bases. El paso siguiente era introducir el fragmento así generado en el alelo *HOM3* silvestre. Para ello, se clonó se sustituyó el fragmento *BfrI-ClaI* de éste último por el correspondiente aislado a partir del producto de PCR, previamente clonado en el vector de bacteriano pUC19.

De esta forma se construyó el plásmido pMAC34 Δ 2, que portaba el alelo mutante *hom3- Δ 2*.

Con el fin de averiguar si el nuevo alelo *hom3- Δ 2* complementaba una mutación *hom3*, se transformó la cepa XMA54-26D (ver Tabla1.I)

con el plásmido pMAC34 Δ 2. Como control, se transformó la misma cepa con el plásmido pMAC32wt, portador del alelo *HOM3* silvestre. El plásmido pMAC34 Δ 2 no era capaz de complementar la mutación *hom3* presente en XMA54-26D, lo que indicaba que la proteína mutante sintetizada a partir de *hom3*- Δ 2 carecía de actividad aspartoquinasa.

(b) Mutagénesis al azar de la región KFGG

Se llevó a cabo siguiendo una estrategia similar a la empleada para la delección del motivo KFGG (Métodos). En este caso, para la amplificación por PCR se empleaba una mezcla de oligonucleótidos sintéticos obtenidos por un procedimiento que permitía la incorporación de bases mutantes con una frecuencia controlada. La frecuencia de mutaciones dependía de la proporción de incorporación de bases "erroneas" en cada paso de elongación durante la síntesis de los oligonucleótidos. Esta proporción se ajustó de forma que la mezcla de oligonucleótidos resultante fuese rica en moléculas mutantes pero sin un excesivo número de moléculas con dos o más mutaciones. Así, la mezcla debía contener alrededor de un 20% de oligonucleótidos con una única mutación y menos de un 3% de moléculas con dos o más mutaciones; el resto serían iguales a la secuencia silvestre.

La mutagénesis se realizó utilizando esta mezcla de oligonucleótidos mutados en un experimento similar al descrito anteriormente. Al final del proceso, se obtenía una mezcla de plásmidos con alelos *HOM3* mutantes y silvestres. Empíricamente, en la mezcla de reacción debería haber un total de 196 cebadores diferentes, de los cuales 195 serían mutantes. Es de esperar que el número de cebadores mutantes incorporados durante el proceso de amplificación por PCR fuera sensiblemente inferior, debido a que los mismos se aparearan menos eficientemente al ADN molde. Además, las mutaciones cercanas al extremo 3' del cebador dificultarían la polimerización durante la primera PCR, mientras que las situadas en el extremo 5' lo harían durante la segunda amplificación. A consecuencia de ello, se esperaba que el procedimiento enriquecería la mezcla en mutaciones la zona central de la región de 66 pares de bases amplificada; el paso siguiente era la introducción de las mutaciones en *HOM3*, según se describe en Métodos. A partir del número de colonias obtenidas con una alícuota de la transformación total se estimó el número total de transformantes en unos 400. Se aisló ADN plasmídico de estos transformantes y se utilizó para transformar la cepa HT1. Los transformantes se seleccionaron en medio SD+Ile+Thr+Met.

Análisis de los transformantes de levadura con los alelos mutantes

Un total de 1337 transformantes de la cepa HT1 con la mezcla de plásmidos mutantes fueron cultivados en el mismo medio de selección y sembrados en distintos medios, con los resultados que se muestran en la Tabla VII. De los 1337 transformantes, 1065 resultaron ser protótrofos para treonina y metionina; de estos últimos, 63 eran sensibles a treonina; no se encontró ninguno que fuese Ile⁺.

La Figura 4.10 muestra el crecimiento de algunos de los transformantes sensibles a treonina en medios conteniendo este aminoácido.

Análisis de la secuencia de algunos de los alelos obtenidos por mutagénesis

Mediante el procedimiento automático descrito en el apartado 8.2 de Métodos se determinó la secuencia nucleotídica de algunos de los alelos *HOM3* que conferían a la cepa HT1 distintos grados de sensibilidad a treonina, encontrándose las mutaciones cuya posición se muestra en la Tabla 4.VIII. Las secuencias de aminoácidos deducidas para las aspartoquinasas producidas a partir de los alelos mutantes se muestran en la Figura 4.11.

DOL1

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|---|---------------|-----|--------|---|---|--------------------|--------|--------------------|--------|---|---|----------|---|---|----------|--------|---|---|---|---|---|---|---|----|---|---|---|----|---|----|---|---|---|---|---|---|----|
| AK-S1A | 1 | MPMDFQPTSSHSN | VQK | FGGTSV | C | K | FPVQIVDDIVKHYSKPDG | 44 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AK-S4A | 1 | MPMDFQPTSSHSN | VQK | FGGTSV | G | I | FPVQIVDDIVKHYSKPDG | 44 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AK-S6A | 1 | MPMDFQPTSSHS | Y | W | V | V | QK | FGGT | P | V | G | K | FPVQIVDD | T | V | KHYSKPDG | 44 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AK-S10A | 1 | MPMDFQPTSSHS | Y | W | V | V | QK | FGGT | P | V | G | K | FPVQIVDD | T | V | KHYSKPDG | 44 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AK-S25A | 1 | MPMD | S | Q | P | T | S | S | H | S | Y | W | A | V | Q | K | FGGTSV | G | K | I | P | V | Q | I | V | D | D | I | V | K | H | Y | S | K | P | D | G | 44 |
| AK-S1B | 1 | MPMDFQPTSSHSN | VQK | FGGTSV | F | V | G | K | FPVQIVDDIVKHYSKPDG | 44 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AK-S2B | 1 | MPMDFQPTSSHSN | VQK | FGGTSV | G | K | FPVQIVDDIVKHYSKPDG | 44 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AK-S1C | 1 | MPMDFQPTSSHSN | VQK | FGGTSV | G | K | I | P | V | Q | I | V | D | D | I | V | K | H | Y | S | K | P | D | G | 44 | | | | | | | | | | | | | |
| AK-S2C | 1 | MPMDFQPTSSH | T | N | W | V | M | Q | K | FGGTSV | G | K | F | P | V | Y | I | V | D | D | I | V | K | H | Y | S | K | P | D | G | 44 | | | | | | | |
| AK-S3C | 1 | MPMDFQPTSSHSN | VQK | FGGTSV | G | N | F | P | V | Q | I | V | D | D | I | V | K | H | Y | S | K | P | D | G | 44 | | | | | | | | | | | | | |
| AK-S1D | 1 | MPMDFQPTSSHSN | VQK | FGGTSV | G | K | F | L | V | Q | I | V | D | D | I | V | K | H | Y | S | K | P | D | G | 44 | | | | | | | | | | | | | |
| AK-S2D | 1 | MPMDFQPTSSHSN | VQK | FGGTSV | P | V | G | K | FPVQIVDDIVKHYSKPDG | 44 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AK-S3D | 1 | MPMDFQPTSSHSN | VQK | FGGTSV | P | V | G | K | FPVQIVDDIVKHYSKPDG | 44 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AK-S4D | 1 | MPMDFQPTSSHSN | VQK | FGGTSV | P | V | G | K | FPVQIVDDIVKHYSKPDG | 44 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AK-S7D | 1 | MPMDFQPTSSHSN | C | V | V | Q | K | FGGTSV | G | K | L | P | V | Q | I | V | D | D | I | V | K | H | Y | S | K | P | D | G | 44 | | | | | | | | | |

| | | | | |
|---------|----|------------------|-----------|----|
| AK-S1A | 45 | PNNNVAVVCSARSSYT | KAEGTTSRL | 69 |
| AK-S4A | 45 | PNNNVAVVCSARSSYT | KAEGTTSRL | 69 |
| AK-S6A | 45 | PNNNVAVVCSARSSYT | KAEGTTSRL | 69 |
| AK-S10A | 45 | PNNNVAVVCSARSSYT | KAEGTTSRL | 69 |
| AK-S25A | 45 | PNNNVAVVCSARSSYT | KAEGTTSRL | 69 |
| AK-S1B | 45 | PNNNVAVVCSARSSYT | KAEGTTSRL | 69 |
| AK-S2B | 45 | PNNNVAVVCSARSSYT | KAEGTTP | RL |
| AK-S1C | 45 | PNNNVAVVCSARSSYT | KAEGTTSRL | 69 |
| AK-S2C | 45 | PNNNVAVVCSARSSYT | KAEGTTSRL | 69 |
| AK-S3C | 45 | PNNNVAVVCSARSSYT | KAEGTTSRL | 69 |
| AK-S1D | 45 | PNNNVAVVCSARSSYT | KAEGTTSRL | 69 |
| AK-S2D | 45 | PNNNVAVVCSARSSYT | KAEGTTSRL | 69 |
| AK-S3D | 45 | PNNNVAVVCSARSSYT | KAEGTTSRL | 69 |
| AK-S4D | 45 | PNNNVAVVCSARSSYT | KAEGTTSRL | 69 |
| AK-S7D | 45 | PNNNVAVVCSARSSYT | KAEGTTSRL | 69 |

Figura 4.10. Secuencias deducidas para las aspartoquinasas producto de los alelos *Hom3* obtenidos por mutagénesis dirigida. Se indican los cambios, así como la zona correspondiente al oligonucleótido empleado en la mutagénesis.

DISCUSION

Aislamiento y caracterización de mutantes superproductores de treonina por supresión fenotípica de una mutación *ilv1*

En la primera parte de este trabajo se ha llevado a cabo una selección de mutantes superproductores de treonina, basada en la supresión metabólica de una mutación *ilv1* a través de la inducción de *CHA1*.

La supresión de la mutación *Ilv1* por la inducción de *CHA1* ha sido estudiada con anterioridad, encontrándose que la expresión constitutiva de este último gen puede darse por mutaciones en el gen *CHA4* que convierten a su producto en activador constitutivo del promotor de *CHA1*. Sin embargo, no se habían aislado mutantes superproductores de serina o de treonina.

La búsqueda realizada ha permitido el aislamiento de al menos 3 tipos de mutantes.

Análisis de las cepas mutantes R2 y R3

Uno de ellos (R3) parece corresponder al tipo de mutantes aislados previamente.

Otro de ellos (R2) exhibe un fenotipo totalmente nuevo, ya que en este mutante la inducción de *CHA1*, y por tanto la supresión de la mutación *ilv1* sólo se produce cuando la cepa es cultivada en una fuente de nitrógeno pobremente asimilable, como es la prolina. Este hecho parece indicar que la expresión de *CHA1* podría estar regulada por la fuente de nitrógeno como lo está la de algunos genes implicados en el catabolismo del nitrógeno, por medio del denominado control catabólico. Se ha descrito que en presencia de amonio la inducción de *CHA1* por treonina disminuye drásticamente, aunque no se ha podido descartar que este efecto esté producido por una disminución en la entrada de treonina en la célula.

El tercer tipo de mutantes, representado por R7, es el que se pretendía aislar.

Como experimento control, se realizó una búsqueda de mutantes resistentes a hidroxinorvalina en medio SDpro con el análogo tóxico. El número de colonias obtenidas en este medio fué sensiblemente inferior. La explicación podría ser que en cada medio aparecen distintos tipos de mutantes. Como veremos más adelante, la resistencia a hidroxinorvalina puede ser el resultado de una aspartoquinasa insensible al análogo y también de la actividad del producto de *CHA1*. Los mutantes

superproductores pueden tener ambos mecanismos, mientras que los mutantes en *CHA4* sólo poseen la segunda; aquellos que tengan un nivel menor de inducción de *CHA1* no podrán eliminar la AHV a un ritmo suficiente como para evitar que el análogo inhiba la aspartoquinasa, y no podrán sintetizar treonina ni metionina, ni tampoco, por tanto, isoleucina.

El análisis del contenido en aminoácidos de R7 ha permitido comprobar que esta cepa acumula treonina a una concentración *n* veces superior a la observada en la cepa parental de la que deriva; se observa también un incremento en la concentración de homoserina. La concentración de aspártico en esta cepa es menor que en la parental, muy probablemente debido a su papel de precursor en la síntesis de treonina. Las concentraciones de glicina parece experimentar un ligero incremento, que podría ser debido a la degradación de treonina fruto de la actividad treonina aldolasa. La concentración de serina es aparentemente la misma en ambas cepas

La aspartoquinasa de R7 resultó ser resistente a inhibición por treonina; esta parece ser una característica común a los mutantes superproductores de este aminoácido. El análisis genético de R7 mostró que la superproducción de treonina en esta cepa es un carácter monogénico determinado por la presencia de un alelo mutante de *HOM3* denominado *HOM3-7R*, que es responsable, así mismo, de la supresión de la mutación *ilv1* en esta cepa.

Clonación y secuenciación del alelo HOM3-R7

La clonación de *HOM3-7R* permitió confirmar los resultados obtenidos por medio del análisis de tétradas, ya que una cepa *hom3 ile1* transformada con el alelo mutante se vuelve *Ile*⁺ y resistente a AHV.

El análisis de la secuencia de *HOM3-7R* muestra la presencia de 5 cambios en su ORF con respecto a la secuencia previamente publicada. De ellos, 2 darían lugar a cambios de tipo conservativo en la secuencia de aminoácidos de la aspartoquinasa. Uno de estos cambios, el que daría lugar a la sustitución Asp₃₄→Glu, se encuentra también en la secuencia nucleotídica de *HOM3-87*. El otro cambio, que resultaría en la sustitución Glu₂₈₂→Asp sólo se encuentra en *HOM3-7R*, lo cual indica que esta mutación es responsable de la resistencia a retroinhibición de la aspartoquinasa mutante.

Como muestra la Figura n, la sustitución Glu₂₈₂→Asp en la aspartoquinasa de la cepa R7 se localiza en las proximidades de una región

que algunos autores han relacionado con el dominio catalítico de la enzima.

El cambio afecta a un resto de glutámico conservado en la totalidad de las secuencias de las aspartoquinasas publicadas, con la sola excepción de la aspartoquinasa I de *B. subtilis*, que tiene en su lugar un resto de asparragina. Este último dato podría indicar que el resto Glu₂₈₂ no participa directamente en el centro activo de la enzima; además, el hecho de que la AKI de *B. subtilis* sea resistente a inhibición por treonina o lisina sugiere que este residuo está implicado en la modulación de la actividad catalítica más que en la propia catálisis.

Papel de CHAI en la supresión de ilv1

Con la ayuda de la fusión traduccional *CHAIp-lacZ* se ha podido determinar el nivel de activación del promotor de *CHAI* en la cepa R7.C1, encontrándose que éste es similar al de una cepa creciendo con treonina como fuente de nitrógeno.

La interrupción de *CHAI* en la cepa R7.C1 tiene por consecuencia la pérdida de su fenotipo Ile⁺, lo cual demuestra que la supresión de *ilv1* en esta cepa depende de la actividad de este gen.

Acumulación de treonina en cepas con diversas combinaciones de mutaciones y alelos clonados

La actividad del producto de *CHAI* parece tener una cierta importancia en la acumulación de treonina, ya que en una cepa superproductora interrumpida en este gen, la concentración de treonina, tanto intracelular como en el medio de cultivo, alcanza un valor significativamente superior al observado en la cepa con el alelo *CHAI* silvestre.

Como vimos en la Introducción, el nivel de acumulación de un metabolito determinado depende de la relación entre las velocidades de síntesis y degradación del mismo. En una cepa superproductora de treonina, la acumulación del aminoácido induce la expresión de *CHAI*, de forma que la treonina desaminasa producto de este gen degrada constantemente parte de la treonina producida. En ausencia de la treonina desaminasa catabólica, la acumulación de treonina alcanza un valor más alto, como era de esperar.

Un hecho interesante es que la cepa superproductora *chal* acumula también más homoserina que la superproductora *CHAI*.

La relación concentración de homoserina/concentración de treonina es también más elevada en la cepa superproductora *chal*, lo cual podría indicar que en esta cepa el flujo metabólico se encuentra limitado en la última parte de la ruta, la conversión de homoserina en treonina. Esta conversión se da por medio de dos pasos consecutivos, catalizados por la homoserina quinasa y la treonina sintasa, respectivamente.

La homoserina quinasa, producto del gen *THR1*, se inhibe por treonina. Esta doble inhibición podría ser responsable de la limitación del flujo metabólico, cuyo efecto directo sería la acumulación de homoserina observada en las cepas superproductoras de treonina.

La homoserina quinasa de la cepa superproductora *chal* podría estar más fuertemente inhibida debido a que la acumulación de uno de sus inhibidores, la treonina, es más elevada. Como consecuencia, la concentración de homoserina, el otro inhibidor, también experimenta un incremento.

La presencia en una cepa de levadura del plásmido multicopia *PYST1*, que porta el gen *THR1*, que determina la homoserina quinasa, induce un aumento de *n* veces en la actividad de esta enzima (Farfán *et al.*, 1996). Con el fin de determinar si este incremento en la actividad homoserina quinasa provocaba algún cambio en las concentraciones de homoserina y de treonina en las cepas superproductoras, se analizó el contenido en estos aminoácidos en las cepas superproductoras *CHAI* y *chal* transformadas con el plásmido *PYST1*.

Mientras que en la cepa *CHAI* [*PYST1*] no se apreció un cambio significativo en las concentraciones de treonina y homoserina, en la cepa *chal* [*PYST1*] se observó un ligero decremento en la concentración de homoserina. Esta disminución en la concentración de homoserina no viene acompañada, sin embargo, de un aumento en la concentración de treonina.

Cuando se incrementa en las cepas la dosis génica de *THR4*, determinante de la treonina sintasa, transformándolas con el plásmido multicopia *PYST4*, el resultado es similar, aunque en este caso se observa una disminución en la concentración de treonina. Se ha descrito que la treonina sintasa de *E. coli* puede catalizar la conversión directa de homoserina-fosfato en α -cetobutirato. Se desconoce si la enzima de *S. cerevisiae* puede catalizar la misma reacción, aunque existe cierta evidencia a favor de esta hipótesis; la cepa superproductora *chal* [*PYST1*] crece en medio SD sin isoleucina (resultados no mostrados). De ser cierto

que la treonina sintasa de *S. cerevisiae* es capaz de transformar, mediante una actividad secundaria, la homoserina-fosfato en α -cetobutirato, el incremento en la actividad treonina sintasa mediado por la alta dosis génica de *THR4* podría eliminar una parte significativa de la homoserina-P, impidiendo por tanto su conversión en treonina.

Aislamiento y caracterización de mutantes sensibles a treonina a partir de la cepa S288C.

A partir de la cepa S288C se aislaron 4 mutantes sensibles a treonina de los cuales sólo uno, TS1, poseía un fenotipo congruente con lo esperado para un mutante en *HOM3*. Los mutantes TS2 y TS3 no fueron objeto de posteriores estudios.

La sensibilidad a treonina del mutante TS4 podría estar relacionada con un bloqueo en la síntesis de valina. Este mutante, que muestra un transporte de treonina n veces superior al de la cepa silvestre, parece estar afectado en la permeasa general de aminoácidos, según se desprende de los experimentos de transporte de citrulina y de su hipersensibilidad a D-histidina. El análisis genético de TS4 indica que la sensibilidad a treonina en esta cepa podría estar determinada por más de una mutación, ya que el análisis de tétradas realizado no mostró claramente una segregación 2:2 para el fenotipo de sensibilidad/resistencia al aminoácido. Se desconoce el mecanismo por el cual la treonina inhibe el crecimiento de esta cepa. La acumulación de α -cetobutirato procedente de la desaminación de la treonina podría interferir en la síntesis de valina, tal como se ha visto en otros organismos, aunque este no parece ser el mecanismo tóxico en TS4.A1, ya que la interrupción de *CHAI* en esta cepa no tiene un efecto significativo en la sensibilidad a treonina. Ya que la actividad de la treonina desaminasa producto de *ILVI* se inhibe por isoleucina, esta enzima no sería, en principio, responsable de de una acumulación excesiva de α -cetobutirato.

Análisis del mutante TS1

El mutante TS1 tenía un fenotipo que concidía con el esperado si la mutación que confiere sensibilidad a treonina estuviera en el gen *HOM3*. Sin embargo, el análisis genético de este mutante indica que la sensibilidad a treonina se debe a una sola mutación no ligada a este gen. La presencia

en la cepa TS1.A1 de plásmidos con los genes *HOM2* u *HOM6* silvestres no impide el efecto inhibitorio de la treonina. Curiosamente, la presencia del alelo *HOM3* silvestre suprime la sensibilidad a treonina de forma parcial o total, dependiendo de si el alelo se encuentra en un plásmido centromérico o en uno de alto número de copias, respectivamente.

Analisis de los mutantes SG36, SG37, SG44, SG45, SG46 Y SG49.

El fenotipo de estos mutantes es similar al de TS1; la sensibilidad a treonina es contrarrestada por homoserina o por treonina. En SG45, SG46 y SG49, la sensibilidad a treonina viene determinada por la presencia de alelos mutantes de *HOM3*. Estos alelos han sido clonados y se ha analizado su secuencia nucleotídica.

Los alelos *HOM3* mutantes de SG45, SG46 y SG49 determinan aspartoquinasas con propiedades bioquímicas diferentes a las de la enzima silvestre, que aparentemente causan la sensibilidad a treonina observada en estas cepas.

La aspartoquinasas de los mutantes SG45 y SG49 tienen una afinidad reducida por sus sustratos, ATP y aspartato. Los valores de concentración intracelular para el ATP y el aspartato en una cepa silvestre han sido estimados en n mM y n mM, respectivamente, lo que indica que ambas aspartoquinasas están funcionando por debajo de su velocidad máxima, aunque la actividad de ambas es suficiente, en condiciones normales, para mantener el flujo metabólico en la ruta. En presencia de treonina, la actividad de la aspartoquinasa se inhibiría hasta un nivel insuficiente, de forma que en estas condiciones ambas cepas requieren metionina.

Cuando se probó la sensibilidad a treonina de la aspartoquinasa de SG45, en un extracto obtenido de esta cepa, se observó en ella un grado de inhibición superior al de la aspartoquinasa silvestre. Sin embargo, cuando los ensayos de inhibición se llevaron a cabo con extractos procedentes de HT1 transformada con *hom3-45S* en alto número de copias, los resultados mostraron un nivel de inhibición similar al silvestre. No se ha encontrado una explicación para esta discrepancia en los resultados.

La aspartoquinasa de SG46 es unas 30 veces más sensible a retroinhibición que la enzima silvestre, y además parece tener una actividad más reducida. Como en el caso de los mutantes anteriores, la

presencia de treonina provocaría una disminución en el flujo metabólico a través de la inhibición de la aspartoquinasa.

Cuando se incrementa la dosis génica de los alelos *hom3-S* la sensibilidad a treonina desaparece (o disminuye significativamente en el caso de *hom3-49S*). Como se ha observado con anterioridad, la presencia de *HOM3* en un plásmido de alto número de copias determina un incremento en la actividad aspartoquinasa; al incrementar la dosis génica de los alelos *hom3-S* se podría elevar la actividad aspartoquinasa, contrarrestando así la inhibición de la enzima por treonina y, por tanto, su efecto sobre el crecimiento de las cepas.

El efecto tóxico de la treonina se manifiesta de manera muy rápida en las cepas sensibles, debido probablemente a que la metionina es precursora en la síntesis de S-adenosil-metionina, molécula donadora de grupos metilo que participa en muchas reacciones de metilación. La adición de metionina a un cultivo inhibido previamente inhibido por treonina restablece el crecimiento del cultivo.

El análisis de las secuencias de *hom3-45S* y *hom3-49S* muestra que éstos poseen mutaciones que se localizan en las proximidades de una región muy conservada en la secuencia de las aspartoquinasas, y que podría estar implicada en la catálisis. La secuencia KFGG podría tal vez estar implicada en la unión a ATP, aunque no ha sido identificado en otras quinasas. La eliminación por mutagénesis dirigida de la secuencia KFGG crea un alelo de *HOM3* que no complementa una mutación en este gen, lo cual indica que esta región es esencial para la actividad de la aspartoquinasa. La mutagénesis al azar de esta región ha permitido la obtención de alelos *HOM3* mutantes que inducen sensibilidad a treonina en la cepa HT1. El análisis de la secuencia de 15 de estos alelos muestra la presencia de mutaciones determinantes de cambios a ambos lados de la secuencia KFGG, sin llegar a afectarla; esto indica que estos residuos son necesarios para la actividad enzimática, lo cual se sospechaba dado el alto grado de conservación de los mismos en las secuencias de las aspartoquinasas. Algunos de los alelos secuenciados poseen más de una mutación en la región correspondiente al oligonucleótido mutagénico; no se ha encontrado una explicación a este hecho, si aceptamos como ciertas las proporciones entre oligonucleótidos mutagénicos y silvestres en la mezcla usada en la mutagénesis. Así mismo, en algunos de los alelos se han encontrado mutaciones fuera de la región correspondiente al oligonucleótido mutagénico. Estas mutaciones puede haberlas introducido

la propia polimerasa empleada en la amplificación, dado que la misma, al carecer de actividad correctora, introduce bases erróneas con una cierta frecuencia.

La utilización de HT1, como cepa receptora de los alelos procedentes de la mutagénesis, permitía la selección directa de mutantes superproductores de treonina por supresión de *ilv1*. No se encontró ningún transformante Ile⁺, lo cual indica que ninguno de los alelos mutantes determinaba una aspartoquinasas resistente a retroinhibición. Este hecho sugiere que la región KFGG no está implicada en la regulación de la actividad de la aspartoquinasas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1 La acumulación de treonina en una cepa superproductora de este aminoácido puede suprimir una mutación *ilv1*, a través de la expresión del gen *CHA1*.
- 2 Mediante la selección de mutantes supresores de *ilv1* se ha aislado un mutante que acumula 20 veces más treonina que la cepa parental. Esta cepa posee un alelo *HOM3* mutante que determina una aspartoquinasa resistente a retroinhibición por treonina.
- 3 La actividad de la serina(treonina) desaminasa catabólica producto de *CHA1* influye negativamente en la acumulación de treonina. La interrupción de *CHA1* en una cepa superproductora de treonina aumenta la acumulación del aminoácido y también la de homoserina. La amplificación de los genes *THR1* o *THR2* no produce un incremento significativo en la acumulación de treonina.
- 4 Existen varias mutaciones que provocan inhibición por treonina del crecimiento. Se han aislado tres de ellas que afectan al gen *HOM3*. Las cepas que contienen estas mutaciones exhiben un tipo de sensibilidad a treonina que es suprimible por homoserina o metionina.
- 5 Dos de los alelos *HOM3* mutantes determinan aspartoquinasas con una afinidad reducida por sus sustratos, ATP y aspartato. Estos alelos contienen mutaciones que se localizan cerca de una región muy conservada en las secuencias de las aspartoquinasas, y que podría estar implicada en la catálisis. La eliminación por mutagénesis dirigida del núcleo de esta región da lugar a una aspartoquinasa aparentemente inactiva. Esta región no parece estar implicada en la modulación de la actividad enzimática.
- 6 El tercer alelo *HOM3* mutante determina una aspartoquinasa superinhibible por treonina, y contiene una mutación localizada en una región asociada a la modulación de la actividad aspartoquinasa.

BIBLIOGRAFIA

Ahmed, S.I., Bollon, A.P., Rogers, S.J. and Magee (1976): Purification and properties of threonine deaminase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemie* **58**:225-232.

Bornæs, C., Ignjatovic, M. W., Schjerling, P., Kielland-Brandt, M. C., & Holmberg, S. (1993). A regulatory element in the CHA1 promoter which confers inducibility by Serine and Threonine on *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, **13**(12): 7604-7611.

Bryan, JK (1980): Synthesis of the aspartate family and branched-chain amino acids. En Miflin BJ (ed) *The Biochemistry of Plants: A comprehensive Treatise*, vol. 5, pp. 329-357. Academic Press, New York.

Cantoni, R., Labo, M., De Rossi, E. and Riccardi, G. (1996): Sequence of the *Bacillus stearothermophilus* gene encoding aspartokinase II. *Gene* **169**: 135-6.

Cirillo, J. D., Weisbrod, T. D., Pascopella, L., Bloom, B. R., & Jacobs, W. R. (1994). Isolation and characterization of the aspartokinase and aspartate semialdehyde dehydrogenase operon from mycobacteria. *Molecular Microbiology*, **11**(4): 629-639.

Chen, N. Y., & Paulus, H. (1988). Mechanism of Expression of the Overlapping Genes of *Bacillus subtilis* Aspartokinase II. *The Journal of Biological Chemistry*, **263**(19): 9526-9532.

Chen, N., Hu, F., & Paulus, H. (1987). Nucleotide sequence of the overlapping genes for the subunits of *Bacillus subtilis* aspartokinase II and their control regions. *The Journal of Biological Chemistry*, **262**(18): 8787-8798.

Chen, N., Jiang, S., Klein, D., & Paulus, H. (1993). Organization and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* diaminopimelate operon, a cluster of genes encoding the first three enzymes of diaminopimelate synthesis and dipicolinate synthase. *J Biol Chem*, **268**: 9448-9465.

Cherry, J. M. (1995). Genetic nomenclature guide for *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends In Genetics*, suplemento de marzo de 1995, 11-12.

Dautry-Varsat, A., and Cohen, G.N. (1977): Proteolysis of the bifunctional methionine-repressible aspartokinaseII-homoserine dehydrogenase II of *Escherichia coli*. K12. Production of an active homoserine dehydrogenase fragment. *J. Biol. Chem.* **252**:7685-7689.

Dautry-Varsat, A., Sibilli-Weill, L., and Cohen, G.N. (1977): Subunit structure of the methionine-repressible aspartokinaseII-homoserine dehydrogenase II of *Escherichia coli*. K12. *Eur. J. Biochem.* **76**:1-6.

De Robichon-Szulmajster, H., & Corrivaux, D. (1963). Régulations métaboliques de la biosynthèse de la Méthionine et de la Thréonine chez *Saccharomyces cerevisiae*. Répression et rétro-inhibition de L'Aspartokinase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **73**: 248-256.

De Robichon-Szulmajster, H., & Corrivaux, D. (1964). Régulations métaboliques de la biosynthèse de la Méthionine et de la Thréonine chez *Saccharomyces cerevisiae*. Étude cinétique de la répression et de la dérépression des trois premiers enzymes de la chaîne. *Biochimica et Biophysica Acta*, **92**: 1-9.

De Robichon-Szulmajster, H., and Magee, P.T. (1968): The regulation of isoleucine-valine biosynthesis enzymes in yeast. *Eur. J. Biochem.* **3**:492-501.

De Robichon-Szulmajster, H., Surdin, Y., & Mortimer, R. K. (1966). Genetic and biochemical studies of genes controlling the synthesis of threonine and methionine in *Saccharomyces*. *Genetics*, **53**: 609-619.

Deutch, A.H., Rushlow, K.E. & Smith, C.J. (1984). Analysis of the *Escherichia coli* proBA locus by DNA and protein sequencing. *Nucleic Acids Res.* **12**:6337-6355.

Farfán, M-J., Martín-Rendón, E. and Calderón, I.L. (1996). Effect of gene amplification on threonine production by yeast. *Biotechnology and Bioengineering*, **49**: 667-674.

Fazel, A., Müller, K., Le Bras, G., Garel, J. R., Véron, M., & Cohen, G. N. (1983). A Triglobular Model for the Polypeptide Chain of Aspartokinase I-Homoserine Dehydrogenase I of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **22**: 158-165.

Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.-F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., Mckenney, K., Sutton, G., Fitzhugh, W., Fields, C.A., Gocayne, J.D., Scott, J.D., Shirley, R., Liu, L.-I., Glodek, A., Kelley, J.M., Weidman, J.F., Phillips, C.A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M.D., Utterback, T.R., Hanna, M.C., Nguyen, D.T., Saudek, D.M., Brandon, R.C., Fine, L.D., Fritchman, J.L., Fuhrmann, J.L., Geoghagen, N.S.M., Gnehm, C.L., McDonald, L.A., Small, K.V., Fraser, C.M., Smith, H.O. and Venter, J.C. (1995): Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**:496-512.

Follettie, M. T., Shin, H. K., & Sinskey, A. J. (1988). Organization and regulation of the *Corynebacterium glutamicum* *hom-thrB* and *thrC* loci. *Molecular Microbiology*, **2**(1): 53-62.

Follettie, M., Peoples, O., Agoropoulou, C., & Sinskey, A. (1993). Gene structure and expression of the *Corynebacterium flavum* N13 *ask-asd* operon. *J. Bacteriol.*, **175**: 4096-4103.

Ghislain, M., Frankard, V., Vandebossche, D., Matthews, B. F., & Jacobs, M. (1994). Molecular analysis of the aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, **24**: 835-851.

Hananhan, D. (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. En: DNA Cloning. A practical Approach (Clover, D.M., ed.) vol. I, IRL Press, Oxford pp. 109-114.

Hu, C.A., Delauney, A.J. & Verma, D.P. (1992): A bifunctional enzyme (delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**:9354-9358.

Kalinowski, J., Bachmann, B., Thierbach, G., & Pühler, A. (1990). Aspartokinase genes *lysCa* and *lysCb* overlap and are adjacent to the aspartate α -semialdehyde dehydrogenase gene *asd* in *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular and General Genetics*, **224**: 317-324.

Kalinowski, J., Cremer, J., Bachmann, B., Eggeling, L., Sahm, H., & Pühler, A. (1991). Genetic and biochemical analysis of the aspartokinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular Microbiology*, **5**(5): 1197-1204.

Kase, H., and K. Nakayama (1974). Mechanism of L-threonine and L-lisine production by analog-resistant mutants of *Coynebacterium glutamicum*. *Agric. Biol. Chem.* **38**: 993-1000.

Katsunuma, T., Elsässer, S. and Holzer, H. (1971): Purification and properties of threonine deaminase from yeast. *Eur. J. Biochem.* **24**:83-97.

Kim, E., & Lea, H. (1986). Molecular cloning and restriction endonuclease mapping of homoserine dehydrogenase gene (*HOM6*) in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. Jour. Microbiol.*, **24**(4): 357-363.

Komatsubara, S. (1994). Amino Acids: Genetically Engineered *Serratia marcescens*. In Y. Murooka & T. Imanaka (Eds.), *Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Applications*

Kosuge, T., Tabata, K. & Hoshino, T. (1994): Molecular cloning and sequence analysis of the proBA operon from an extremely thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **123**:55-61.

LaFuma, C., Gros, C. and Patte, J.C. (1970). Regulation of the lysine biosynthetic pathway of *Escherichia coli*. K12. Isolation, molecular weight and amino acid analysis of the lysine-sensitive aspartokinase. *Eur. J. Biochem.* **15**:111-115.

Mannhaupt, G., Pohlenz, H. D., Seefluth, A. K., Pilz, U., & Feldmann, H. (1990). Yeast homoserine kinase. Characteristics of the corresponding gene, *THR1*, and the purified enzyme and evolutionary

relationships with other enzymes of threonine metabolism. *Eur. J. Biochem.*, **191**: 115-122.

Mannhaupt, G., Van Der Linden, G., Vetter, I., Maurer, K., Pilz, U., Planta, R., & Feldmann, H. (1990). Analysis of the *THR4* region on chromosome III of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **6**: 1-9.

Marmorstein, R., M. Carey, M. Ptashne y S. C. Harrison (1993). *Nature* **339**: 408

Martín-Rendón, E., Farfán, M. J., Ramos, C., & Calderón, I. L. (1993). Isolation of a mutant allele that deregulates the threonine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, **24**: 465-471.

Matthews, B.F., Farrar M.J., Gray, A.C. (1989): Purification and interconversion of homoserine dehydrogenase from *Daucus carota* cell suspension cultures. *Plant Physiol.* **91**:1569-1574.

Miyajima, K S.-I. Otsuka, and I. Shiio. (1968). Regulation of aspartate family amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.* **63**: 138-148.

Moir, D., and Paulus, H. (1977): Properties and subunit structure of aspartokinase II from *Bacillus subtilis* VB217. *J. Biol. Chem* **252**:4648-4654.

Mortimer, R. K., & Schild, D. (1980). Genetic map of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, **44**(4): 519-571.

Muelbahuer, G., Somers, D. A., Matthews, B. F., & Gengenbach, B. G. (1994). Molecular Genetics of the Maize (*Zea mays* L.) Aspartate Kinase-Homoserine Dehydrogenase Gene Family. *Plant Physiology*, **106**: 1303-1312.

Murata, K., Saikusa, T., Fukuda, Y., Watanabe, K., Inoue, Y., Shimosaka, M., & Kimura, A. (1986). Metabolism of 2-oxoaldehydes in yeasts. Possible role of glycolytic bypath as a detoxification system in L-threonine catabolism by *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **157**: 297-301.

Nielsen, T.L., Holmberg, S. and Petersen, J. L. G. (1990). Regulated overproduction and secretion of yeast carboxipeptidase Y. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* **33**: 307-312.

Niles, E. and Westhead, E.W. (1973). The variable subunit structure of lysine-sensitive aspartokinase from *E. coli* TIR-8. *Biochemistry* **12**:1715-1722.

Nishiyama, M., Kukimoto, M., Beppu, T. and Horinouchi, S. (1995): An operon encoding aspartokinase and purine phosphoribosyltransferase in *Thermus flavus*. *Microbiology* **141**:1211-1219.

Obermaier, B., and Domdey, H. (1992). Automated sequencing and mapping of cosmid DNA with fluorescently-labeled dideoxynucleotide terminators. *Biotechniques*, **13**: 46-47.

Omori, K., Suzuki, S., Imai, Y. & Komatsubara, S. (1991): Analysis of the *Serratia marcescens* proBA operon and feedback control of proline biosynthesis. *J. Gen. Microbiol.* **137**:509-517.

Omori, K., Imai, Y., Suzuki, S., & Komatsubara, S. (1993). Nucleotide sequence of the *Serratia marcescens* threonine operon and analysis of the threonine operon mutations which alter feedback inhibition of both aspartokinase I and homoserine dehydrogenase I. *Journal of Bacteriology*, **175**(3): 785-794.

Patte, J.-C. (1996). Biosynthesis of Threonine and Lysine. In F. C. Neidhard, R. Curtis III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, & H. E. Umbarger (Eds.), *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology* (pp. 528-541). Washington DC: ASM Press.

Pedersen, J.Ø., M. A. Rodríguez, M. Prætorius Ibba, T. Nilsson-Tillgren, I.L. Calderón & S. Holmberg: Analysis of *D-ilv1* suppressors: Aspects of *CHA1* regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. (En preparación).

Petersen, J. G. L., Kielland-Brandt, M. C., Nilsson-Tillgren, T., Bornæs, C., & Holmberg, S. (1988). Molecular Genetics of Serine and Threonine Catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **119**: 527-534.

Petersen, J. G., Holmberg, S., Nilsson-Tillgren, T., & M.C., K.-B. (1983). Molecular cloning and characterization of the threonine deaminase (*ILV1*) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Carslberg Res. Commun.*, **48**: 149-159.

Rafalski, J. A., & Falco, S. C. (1988). Structure of the yeast *HOM3* gene which encodes aspartatokinase. *The Journal of Biological Chemistry*, **263**(5, 15): 2146-2151.

Ramos, C., & Calderón, I.L., . (1992). Overproduction of threonine by yeast mutants resistant to hydroxynorvaline. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 1677-1682.

Ramos, C., Delgado, M. A., & Calderón, I. L. (1991). Inhibition by different amino acids of the aspartate kinase and the homoserine kinase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Biochemical Societies*, **278**: 123-126.

Ramos, F., & Wiame, J. M. (1982). Occurrence of a Catabolic L-Serine (L-Threonine) Deaminase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **123**: 571-576.

Richaud, C., Mazat, J.P., Gros, C. and Patte, J.C. (1973): Subunit structure of lysine-sensitive aspartokinase from *E. coli* K12. *Eur. J. Biochem.* **40**:619-629.

Rothstein, R.J. (1983). One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* **101**: 202-211.

Schendel, F., & Flickinger, M. (1992). Cloning and nucleotide sequence of the gene coding for aspartokinase II from a thermophilic methylotrophic *Bacillus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 2806-2814.

Schjerling, P., S. Holmberg. (1996). *Nucleic Acids Res.* (enviado)

von Dippe, P.J., Abraham, A., Nelson, C.A. and Smith, W.G. (1972). Kinetic and molecular properties of lysine-sensitive aspartokinase. Quaternary structure, catalytic activity and feedback control. *J. Biol. Chem.* **247**: 2433-2438.

Weisemann, J. M., & Matthews, B. F. (1993). Identification and expression of a cDNA from *Daucus carota* encoding a bifunctional aspartokinase-homoserine dehydrogenase. *Plant Molecular Biology*, **22**: 301-312.

Wilson, B. J., Gray, A. C., & Matthews, B. J. (1991). Bifunctional Protein in Carrot Contains Both Aspartokinase and Homoserine Dehydrogenase Activities. *Plant Physiology*, **97**: 1323-1328.

Yamanaka, K., Ogura, T., Niki, H., & Hiraga, S. (1992): Identification and characterization of the smbA gene, a suppressor of the mukB null mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**:7517-7526.

Zhang, J., Hu, F., Chen, N., & Paulus, H. (1990). Comparison of the three aspartokinase isozymes in *Bacillus subtilis* Marburg and 168. *J. Bacteriol.*, **172**: 701-8.

Sherman, F., G.R. Fink y C.W. Lawrence (1986). *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Shiio, I. and R. Miyajima (1969). Concerted inhibition and its reversal by end products of aspartate kinase in *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.* **65**:849-855.

Sibilli, L., LeBras, G., LeBras, G., and Cohen., G.N. (1981): Two regions of the bifunctional protein I-homoserine dehydrogenase I are connected by a short hinge. *J. Biol. Chem.* **265**:10228-10230.

Stadtman, E. R.,Cohen, G. N.,LeBras, G., & de Robichon-Szulmajster, H. (1961). Feed-back inhibition and repression of aspartokinase activity in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, **236**(7): 2033-2038.

Struhl, K., Stinchcomb, D. T., Scherer, S., & Davis, R. W. (1979). High-frequency transformation of yeast: Autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**(3): 1035-1039.

Thomas, D., & Surdin-Kerjan, Y. (1989). Structure of the *HOM2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* and regulation of its expression. *Molecular and General Genetics*, **217**: 149-154.

Thomas, D., & Surdin-Kerjan, Y. (1989). Structure of the *HOM2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* and regulation of its expression. *Molecular and General Genetics*, **217**: 149-154.

Turano, F.J., Jordan, R.L., Matthews, B.F (1990): Immunological characterization of in vitro forms of homoserine dehydrogenase from carrot suspension cultures. *Plant Physiol.* **92**:395-400.

Veron, M., Guillou, Y., Fazel, A., and Cohen., G.N. (1985): Reversible dissociation of aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I from *Escherichia coli*. K12. The active species is a tetramer. *Eur. J. Biochem.* **151**:521-524.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. MIGUEL AREVALO RODRIGUEZ
titulada AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE
 MUTACIONES DEL GEN HOM3 QUE ALTERAN LA
 REGULACION DE LA SINTESIS DE TREONINA Y METIONINA
 EN SACCHAROMYCES CEREVISIAE APTO

Sevilla, 16 de DICIEMBRE 1996

El Vocal,
Talicio Quintanilla
El Presidente

El Vocal,
[Signature]
El Secretario,

El Vocal,
A. Rivas
El Doctorado,

V. Rueda

F. J. Arevalo

[Signature]



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672080