

R. 11727

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Se ha registrado el presente en el
al folio 146 y en el tomo 175
correspondiente a la serie
Sevilla, a los días 15 de septiembre de 1991



El Jefe del Negociado de Tesis,

Alvaro Loffitte

**CONSTRUCCION DE CEPAS DE LEVADURAS
SUPERPRODUCTORAS DE TREONINA MEDIANTE TECNICAS DE
INGENIERIA GENETICA MOLECULAR**

Trabajo realizado en el Departamento de Genética, Facultad de Biología,
Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctora en Genética, por la
Licenciada

M. Encarnación Martín Rendón

Encarnación Martín Rendón

Sevilla, Septiembre de 1991

Directora de la Tesis

Isabel López Calderón

Dra. Isabel López Calderón
Profesora Titular de Genética

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en el Dpto. de Genética
de la Facultad de Biología
de esta Universidad desde el día 4/9/91
hasta el día 25/9/91

Sevilla 15 de septiembre de 1991

EL DIRECTOR DE

R



TD
244

A mis padres

RESUMEN

El fin último de esta Tesis ha sido la obtención de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que superproduzcan treonina. Se trataba de probar si la amplificación de algunos genes implicados en la biosíntesis de este aminoácido redundaba en la acumulación del mismo. Para ello se construirían plásmidos multicopia que contuviesen los genes en cuestión y se introducirían en cepas de *S. cerevisiae* con distintos fondos genéticos. Esta estrategia tendría la ventaja respecto de las clásicas de mutagénesis y selección, de minimizar los cambios que se provocan en el organismo como consecuencia de la manipulación genética del mismo. El estudio se ha centrado en genes que determinan enzimas claves de la regulación de la ruta de síntesis de treonina en levaduras, concretamente *HOM3* y *THR1*.

El gen *HOM3* determina la aspartato quinasa que cataliza el primer paso de la ruta común de síntesis de metionina y treonina. La amplificación de este gen en un fondo genético esencialmente silvestre hace que la célula acumule 10 veces más treonina que la cepa silvestre y una gran cantidad de homoserina, intermediario de la ruta.

El gen *HOM3* ha servido de base para la clonación del alelo mutante *HOM3-R2* que determina una aspartato quinasa insensible a retroinhibición por treonina. La clonación se ha llevado a cabo mediante el método de rescate alélico basado en la reparación de "huecos" en el ADN. Una cepa de levaduras que contiene un alto número de copias de este alelo mutante, acumula unas 50 veces más treonina que la cepa silvestre, y aún más homoserina.

Por complementación se ha aislado el gen *THR1* de *S. cerevisiae*, que determina la homoserina quinasa. Esta enzima es la responsable de la transformación de homoserina en homoserina fosfato, primer paso de la ruta específica de la treonina. La amplificación de este gen en una cepa con fenotipo silvestre Hom3⁺ y dos cepas con fenotipo Hom3-R2 resulta en la acumulación de distintas cantidades de aminoácidos. Así, mientras que la amplificación no afecta a la acumulación en un fondo genético silvestre, sí que lo hace en cepas Hom3-R que, superproducen homoserina y treonina.

También se ha estudiado el efecto de varios aminoácidos de la ruta sobre la síntesis de las enzimas aspartato quinasa y homoserina quinasa, así como las consecuencias sobre la producción de los mismos. Estos estudios preliminares han consistido, principalmente, en cultivar a una cepa portadora de un plásmido multicopia que contiene *THRI* en presencia de homoserina, metionina y treonina. En esta cepa, la síntesis de la actividad aspartato quinasa parece reprimirse por treonina y metionina (90%), y en menor grado por homoserina (30%). La síntesis de la homoserina quinasa parece reprimirse también por treonina (45%) y por metionina (30%), mientras que se induce por homoserina al doble. En consecuencia, la producción de treonina se ve afectada, disminuyendo cuando las estas enzimas están reprimidas, y aumentando unas 10 veces cuando las células de levaduras se cultivan en presencia de homoserina.

INDICE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCCION..... | 1 |
| PRODUCCION DE AMINOACIDOS POR MICROORGANISMOS..... | 2 |
| METABOLISMO DE TREONINA..... | 4 |
| Ruta común para treonina y metionina..... | 5 |
| Ruta específica de biosíntesis de treonina..... | 7 |
| Ruta de síntesis de isoleucina y valina. Catabolismo de treonina..... | 8 |
| REGULACION DE LA SINTESIS DE TREONINA EN <i>S. cerevisiae</i> | 9 |
| Regulación de la biosíntesis de isoleucina y valina en <i>S. cerevisiae</i> | 10 |
| MUTANTES SUPERPRODUCTORES DE TREONINA..... | 11 |
| CLONACION DE GENES EN LEVADURAS..... | 13 |
| OBJETIVO DE ESTA TESIS..... | 14 |
| | |
| MATERIALES..... | 15 |
| | |
| MICROORGANISMOS..... | 15 |
| 1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 15 |
| 2. Estirpes de <i>Escherichia coli</i> | 16 |
| PLASMIDOS..... | 16 |
| PRODUCTOS QUIMICOS..... | 17 |
| TAMPONES Y SOLUCIONES..... | 18 |
| 1. Tampones utilizados para la purificación de enzimas..... | 18 |
| 1.1. Tampón A..... | 18 |
| 1.2. Tampón AT..... | 18 |
| 1.3. Tampón B..... | 19 |
| 1.4. Tampón BT..... | 19 |
| 1.5. Tampón Fosfato..... | 19 |
| 2. Tampones utilizados para los ensayos enzimáticos..... | 19 |
| 2.1. Tampón Hepes..... | 19 |
| 2.2. Solución PEP..... | 19 |
| 3. Soluciones utilizadas para la cuantificación de aminoácidos..... | 20 |
| 3.1. Solvente A..... | 20 |
| 3.2. Solvente B..... | 20 |
| 3.3. Mezcla derivatizante..... | 20 |
| 4. Soluciones utilizadas para la transformación..... | 20 |

| | |
|---|----|
| De bacterias | |
| 4.1. Solución RF1..... | 20 |
| 4.2. Solución RF2..... | 20 |
| De levaduras | |
| 4.3. Solución SE..... | 21 |
| 4.4. Solución TCS..... | 21 |
| 4.5. Solución SOS..... | 21 |
| 4.6. Solución PEG..... | 21 |
| 4.7. Solución LTE..... | 21 |
| 4.8. Solución LPEG..... | 21 |
| 5. Soluciones utilizadas para la extracción de ADN..... | 22 |
| Para bacterias | |
| 5.1. Solución I..... | 22 |
| 5.2. Solución II..... | 22 |
| 5.3. Solución III..... | 22 |
| Para levaduras | |
| 5.4. Solución SDE..... | 22 |
| 5.5. Solución TED..... | 22 |
| 5.6. Solución AK..... | 22 |
| 6. Tampones utilizados para la manipulación <i>in vitro</i> de ADN..... | 23 |
| 6.1. Tampón Tris-HCl | 23 |
| 6.2. Tampón TE..... | 23 |
| 6.3. Tampón TAE (50x)..... | 23 |
| 6.4. Tampón TBE (5x)..... | 23 |
| 6.5. Tampón de carga..... | 23 |
| 6.6. Tampón de fosfatasa alcalina (10x)..... | 23 |
| 6.7. Tampón Taq (10x)..... | 23 |
| 6.8. Tampón Klenow (10x)..... | 24 |
| MEDIOS DE CULTIVO..... | 24 |
| 1. Medios líquidos para levaduras..... | 24 |
| 1.1. Medio mínimo (SD)..... | 24 |
| 1.2. Medio mínimo completo (SC)..... | 24 |
| 1.3. Medio mínimo con prolina como fuente de nitrógeno (SDP)..... | 24 |
| 1.4. Medio nutritivo (YEPD)..... | 24 |
| 2. Medios sólidos para levaduras..... | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 2.1. Medio con hidroxinorvalina..... | 25 |
| 2.2. Medio estabilizado osmóticamente..... | 25 |
| 2.3. Medio de preesporulación..... | 25 |
| 2.4. Medio de esporulación..... | 25 |
| 2.5. Medio de micromanipulación..... | 25 |
| 3. Medios líquidos para bacterias..... | 26 |
| 3.1. Medio nutritivo LB..... | 26 |
| 3.2. Medio SOB..... | 26 |
| 3.3. Medio SOC..... | 26 |
| 4. Medios sólidos para bacterias..... | 26 |
| METODOS..... | 27 |
| ESTIMACION DE LA BIOMASA..... | 27 |
| 1. Determinación del número de células..... | 27 |
| 1.1. Células totales..... | 27 |
| 1.2. Células viables..... | 27 |
| 2. Determinación del peso de las células..... | 27 |
| METODOS BIOQUIMICOS..... | 28 |
| 1. Medida de las actividades aspartato quinasa y homoserina quinasa..... | 28 |
| 1.1. Purificación parcial de las enzimas..... | 28 |
| 1.2. Ensayo de la actividad homoserina quinasa..... | 29 |
| 1.3. Ensayo de la actividad aspartato quinasa..... | 29 |
| 2. Determinación de aminoácidos..... | 30 |
| 2.1. Cuantificación de aminoácidos por HPLC..... | 30 |
| 2.2. Cuantificación de proteínas totales..... | 30 |
| 2.3. Determinación de la excreción de treonina mediante prueba de alimentación cruzada..... | 31 |
| METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR..... | 31 |
| 1. Transformación de <i>E. coli</i> | 31 |
| 1.1. Método del cloruro de calcio..... | 31 |
| 1.2. Método del cloruro de rubidio..... | 32 |
| 2. Transformación de <i>S. cerevisiae</i> | 32 |
| 2.1. Transformación de protoplastos..... | 32 |
| 2.2. Transformación de células enteras..... | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 3. Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> | 34 |
| 3.1. "Minipreparaciones" de ADN..... | 34 |
| 3.2. Preparaciones estándar de ADN..... | 35 |
| 4. Extracción de ADN total de <i>S. cerevisiae</i> | 35 |
| 5. Purificación y concentración de ADN..... | 35 |
| 5.1. Microcolumnas Elutip-D..... | 35 |
| 5.2. Columnas de Sephadex..... | 36 |
| 5.3. Concentración mediante centrifugación..... | 36 |
| 6. Cuantificación de ADN..... | 36 |
| 6.1. Por espectrofotometría..... | 36 |
| 6.2. Por tinción con bromuro de etidio..... | 36 |
| 7. Manipulación enzimática del ADN..... | 36 |
| 8. Electroforesis de ADN en gel de agarosa..... | 37 |
| 8.1. Análisis de fragmentos de restricción..... | 37 |
| 8.2. Revelado de los geles..... | 37 |
| 9. Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa..... | 37 |
| 9.1. Electroelución..... | 37 |
| 9.2. Método "GeneClean"..... | 38 |
| 10. Amplificación <i>in vitro</i> de ADN mediante polimerización en cadena..... | 38 |
| METODOS GENETICOS..... | 39 |
| 1. Obtención de diploides..... | 39 |
| 2. Esporulación..... | 40 |
| 3. Disección de ascas y análisis meiótico..... | 40 |
| 4. Determinación del sexo..... | 41 |
| RESULTADOS..... | 42 |
| AMPLIFICACION DEL GEN <i>HOM3</i> | 42 |
| OBTENCION DE CEPAS CON <i>HOM3</i> AMPLIFICADO..... | 42 |
| 1. Construcción de una cepa transformable Hom3 ⁻ | 43 |
| 2. Transformación y selección de los transformantes..... | 43 |
| CARACTERIZACION DE LAS CEPAS CON <i>HOM3</i> AMPLIFICADO..... | 44 |
| 1. Medida de la actividad aspartato quinasa..... | 44 |
| 2. Acumulación y excreción de treonina..... | 44 |
| AMPLIFICACION DEL ALELO MUTANTE <i>HOM3-R2</i> | 46 |

| | |
|--|----|
| AMPLIFICACION <i>IN VITRO</i> DE UN FRAGMENTO GENOMICO QUE CONTIENE AL ALELO <i>HOM3-R2</i> | 47 |
| 1. Obtención del fragmento amplificado..... | 47 |
| 2. Clonación del fragmento amplificado..... | 48 |
| RECATE DEL ALELO <i>HOM3-R2</i> | 49 |
| 1. Construcción de las cepas transformables Hom3-R2..... | 50 |
| 2. Subclonación del gen <i>HOM3</i> en el vector YRp17..... | 50 |
| 3. Deleción de un fragmento interno de <i>HOM3</i> | 51 |
| 4. Transformación y selección de los transformantes..... | 51 |
| 5. Caracterización de los transformantes..... | 51 |
| 5.1. Transformantes que mantienen el plásmido de forma autónoma...52 | |
| 5.2. Transformantes que contienen el plásmido integrado..... | 52 |
| 6. Caracterización de las cepas con <i>HOM3-R2</i> amplificado..... | 53 |
| 6.1. Inhibición por treonina de la aspartato quinasa..... | 53 |
| 6.2. Acumulación y excreción de treonina..... | 53 |
| 6.3. Resistencia a hidroxinorvalina..... | 53 |
| AMPLIFICACION DEL GEN <i>THR1</i> | 55 |
| AISLAMIENTO DEL GEN <i>THR1</i> | 55 |
| 1. Construcción de una cepa transformable Thr1 ⁻ | 55 |
| 2. Transformación y selección de los transformantes..... | 56 |
| 3. Pérdida concomitante de marcadores y plásmidos..... | 56 |
| 4. Caracterización de los plásmidos..... | 56 |
| ANALISIS GENETICO DEL GEN <i>THR1</i> CLONADO..... | 57 |
| 1. Subclonación en un plásmido integrativo..... | 57 |
| 2. Integración en el <i>locus THR1</i> en el genomio..... | 58 |
| 3. Análisis de ligamiento entre los marcadores <i>URA3</i> y <i>THR1</i> | 58 |
| CARACTERIZACION DE LAS CEPAS CON <i>THR1</i> AMPLIFICADO..... | 59 |
| 1. Medida de la actividad homoserina quinasa..... | 59 |
| 2. Acumulación y excreción de treonina..... | 60 |
| 3. Influencia de distintos aminoácidos de la ruta en la acumulación de treonina..... | 60 |
| AMPLIFICACION DEL GEN <i>THR1</i> EN CEPAS HOM3-R2..... | 61 |
| 1. Transformación y selección de los transformantes..... | 62 |
| 2. Caracterización de los transformantes..... | 62 |

| | |
|---|-----------|
| DISCUSION..... | 63 |
| CLONACION DE GENES Y OBTENCION DE CEPAS CON GENES AMPLIFICADOS..... | 63 |
| AMPLIFICACION DEL ALELO <i>HOM3</i> | 63 |
| AMPLIFICACION DEL ALELO <i>HOM3-R2</i> | 64 |
| Clonación mediante polimerización en cadena..... | 65 |
| Rescate del alelo <i>HOM3-R2</i> del genomio..... | 68 |
| AISLAMIENTO Y AMPLIFICACION DEL GEN <i>THR1</i> | 72 |
| PRODUCCION DE AMINOACIDOS POR CEPAS QUE CONTIENEN ALELOS AMPLIFICADOS..... | 73 |
| CONCLUSIONES..... | 80 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 81 |
| AGRADECIMIENTOS..... | 92 |

INTRODUCCION

La Biotecnología puede definirse como la utilización deliberada y controlada de agentes biológicos simples (células vivas o muertas, o sus componentes) para fabricar productos técnicamente útiles. Aunque la palabra "Biotecnología" es nueva, abarca una serie de actividades que tienen una historia muy larga. Durante miles de años se ha estado haciendo pan, cerveza, vino y vinagre, conservando alimentos y convirtiendo la leche en yogur y queso, o la soja en "shoyu" y "miso". La diferencia es que ahora se comprende mucho mejor cómo ocurren estos procesos y esto, unido al desarrollo de nuevas tecnologías, permite manipularlos de forma muy eficiente. Es más, a medida que se ha ido avanzando en este conocimiento ha sido posible aplicar los mismos principios a la obtención de otros productos, como antibióticos, aminoácidos o, incluso, biomasa de los propios microorganismos que llevan a cabo estos procesos (Präve *et al.*, 1987).

La Biotecnología moderna puede decirse que nació durante la Primera Guerra Mundial, con la utilización de microorganismos para obtener ciertos productos, como el butanol y la acetona, para fabricar explosivos y caucho. Posteriormente, en la Segunda Guerra Mundial, se desarrolló la producción de penicilina, punto de partida de la industria de los antibióticos. En los años 50 y 60, cuando el precio del petróleo subía, se comenzaron a utilizar masivamente microorganismos para producir alcohol combustible y otras sustancias, a partir de azúcar o almidón. El desarrollo de la Ingeniería Genética Molecular en los años 70, tras los descubrimientos del ADN y los anticuerpos monoclonales, proporcionó los elementos básicos para la llamada "revolución bioindustrial" en la que estamos sumergidos actualmente.

Las verdaderas "estrellas" de la Biotecnología son los microorganismos debido, principalmente, a su versatilidad. Algunos son capaces de vivir en aguas termales, o congelados en el hielo, pueden alimentarse de una enorme variedad de materias primas y transformar madera, plásticos, petróleo e incluso rocas. Su capacidad de proliferación en los medios en los que se cultiva es tan grande que, aparte de transformar el sustrato con eficiencia y celeridad, se producen grandes cantidades de biomasa microbiana. Esta biomasa constituye una fuente de proteínas que podría sustituir, al menos en parte, a las fuentes de proteínas convencionales (vegetales, carne y pescado). La producción industrial de microorganismos para ser utilizados como alimento comenzó en Alemania durante la Primera Guerra Mundial. Los científicos produjeron grandes cantidades de levadura de cerveza (15000 toneladas por año) para añadirles a sopas y salchichas y suplementar así la escasa

comida (Olsen y Allermann, 1987). En el Reino Unido, la levadura de cerveza es elemento habitual de la dieta desde hace mucho tiempo, de modo que el excedente de levaduras se vende para elaborar alimentos humanos o como pienso para los animales.

Ya desde los principios de la Biotecnología, desde que los antiguos sumerios y babilonios elaboraron cerveza por primera vez, en el año 6000 a.C., un género particular de levaduras, *Saccharomyces*, ha jugado un papel preponderante en la explotación de los hongos con fines industriales. Este anaerobio facultativo es capaz de convertir azúcar en piruvato y con cada molécula de piruvato producir una de etanol y otra de dióxido de carbono. Esta simple transformación es la base de tres de nuestras mayores industrias, la cerevecera, la vinícola y la panadera, todas ellas conservadas técnicamente durante milenios.

Los procesos tradicionales han seleccionado cepas muy eficientes en fermentación que, sin embargo, aún son susceptibles de mejora por otros métodos. Esta mejora puede traducirse en una mayor adaptación al medio, en un aumento de la productividad o en la adquisición de una propiedad que las capacite para llevar a cabo un proceso nuevo. La obtención de cepas más eficientes se ha hecho hasta ahora utilizando técnicas genéticas y microbiológicas (mutagénesis, fusión de protoplastos, cultivos continuos, etc.). El problema estriba en que, a veces, la manipulación del genomio de estos organismos lleva, en efecto, a la adquisición de la propiedad que se desea, pero también a la destrucción de combinaciones genéticas favorables. Las técnicas de Ingeniería Genética Molecular permiten minimizar estas modificaciones no deseadas de modo que, una vez identificado el factor genético del que depende una propiedad, éste puede simplemente introducirse en la cepa en cuestión para que se exprese.

PRODUCCION DE AMINOACIDOS POR MICROORGANISMOS

En los países en vías de desarrollo, la dieta está basada en harinas de origen vegetal sobre todo de maíz, arroz y trigo, siendo en muchos casos ésta la principal fuente de proteínas. Estos productos son deficitarios en aminoácidos esenciales como lisina, triptófano, treonina y metionina. Como consecuencia, una gran proporción de la población infantil de estos países está malnutrida y, con frecuencia, se presentan síndromes de deficiencias como el "kwashiorkor" o el "marasmus" (Kobayashi *et al.*, 1990). La producción de aminoácidos es, por tanto, importante

desde un punto de vista nutricional, ya que éstos pueden añadirse a las harinas como suplemento alimenticio o, simplemente, como potenciadores del sabor. También son utilizados en alimentación animal por razones similares a las arriba expuestas, en medicina como ingredientes de infusiones para tratamientos post-operatorios o para suplir deficiencias en pacientes con alteraciones metabólicas, en cosmética, etc. (Yoshida *et al.*, 1990). Así, la demanda mundial de aminoácidos está creciendo y paralelamente, lo hacen las industrias, mayoritariamente japonesas, que los fabrican. A modo indicativo sirvan los datos de producción mundial de estas moléculas en el año 1989, recogidos por Crueger y Crueger (1989). Según estos autores, en ese año se produjeron 370000 toneladas de L-glutámico, utilizado principalmente como potenciador del sabor; 4000 de L-aspártico, 3000 de L-fenilalanina y 6000 de glicina, utilizadas como sustancias edulcorantes; 70000 de D,L-metionina y L-lisina, utilizadas como aditivos alimentarios. La demanda de triptófano y de treonina es también muy alta por ser normalmente deficitarios en la dieta. Sin embargo, por el momento, esta demanda no puede ser satisfecha dado que la producción de estos aminoácidos es escasa (200 y 160 toneladas, respectivamente), principalmente debido al bajo rendimiento de los procesos de fabricación (Crueger y Crueger, 1989).

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. 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 son 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 el 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 o, 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, no se suele utilizar biomasa de bacterias en alimentación, 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, además, pueden obtenerse en grandes cantidades como subproducto de industrias dedicadas a la fabricación de cerveza, o directamente, cultivándolas en metanol o melazas de caña o remolacha, productos de desecho de las industrias azucareras (Spencer y Spencer, 1983). De hecho, la levadura de panadería constituye alrededor del 5% del volumen de pan. Lamentablemente, las levaduras son relativamente pobres en aminoácidos esenciales, por lo que resulta interesante la modificación genética de cepas con el fin de aumentar su contenido en estos aminoácidos. Estas cepas serían la base para obtener biomasa enriquecida en aminoácidos esenciales en la dieta.

Dado que, como ya se ha mencionado, 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.

METABOLISMO DE TREONINA

S. cerevisiae es capaz de sintetizar todos los aminoácidos constituyentes de las proteínas. Los que derivan de una molécula común se dice que pertenecen a la misma familia. Así, pueden establecerse seis familias. La treonina, protagonista de esta Tesis, pertenece a la familia del aspartato, formada, además, por asparagina, metionina e isoleucina. La isoleucina se considera también de la familia del piruvato

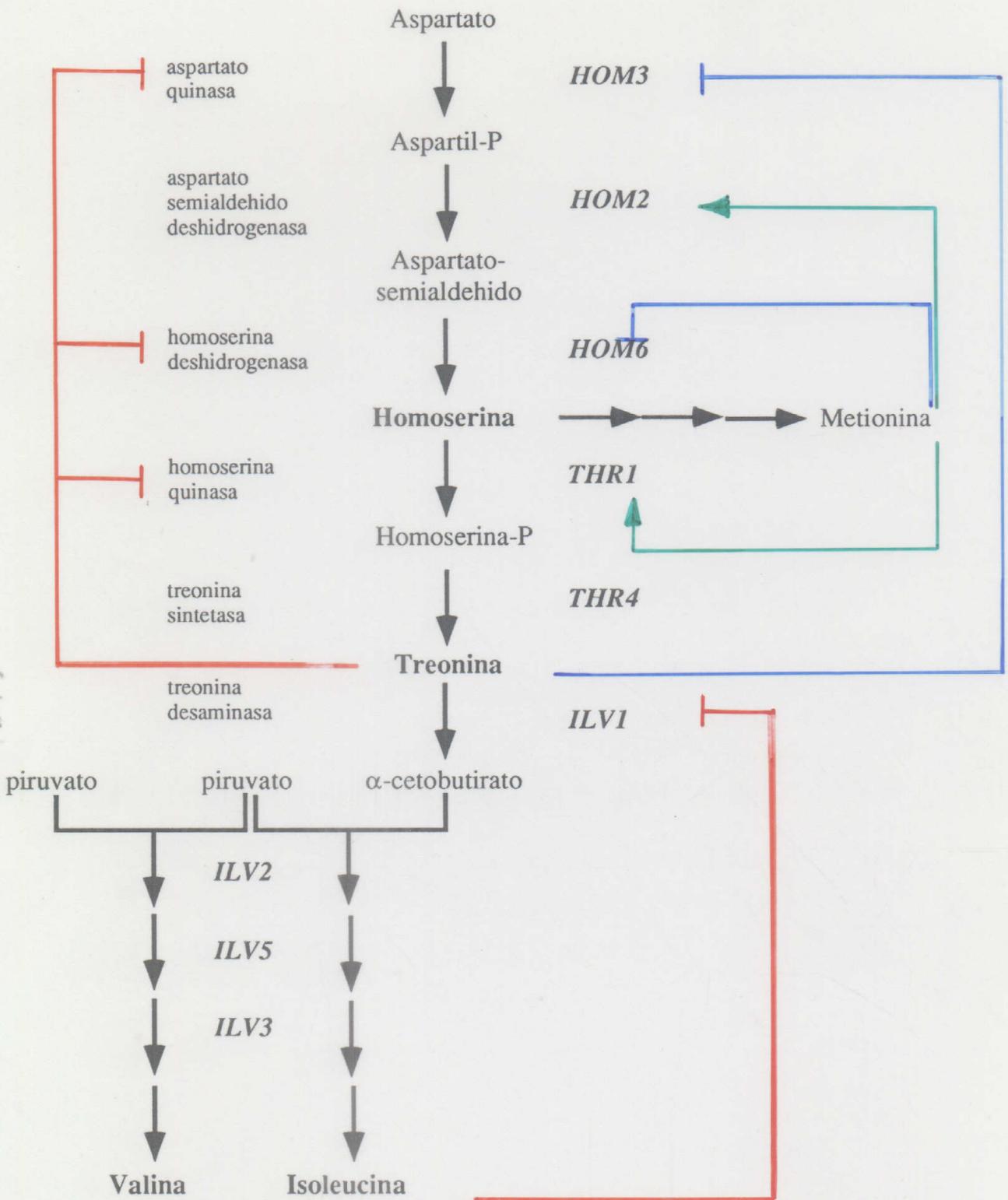


Figura 1. Ruta de biosíntesis y degradación de treonina en *S. cerevisiae*. Regulación propuesta en Jones y Fink, 1982 y Ramos *et al.*, 1991.

—| INHIBICIÓN —| REPRESIÓN —▶ INDUCCIÓN

pues parte de su esqueleto carbonado se sintetiza a partir de este compuesto. Además, su ruta biosintética comparte cuatro enzimas con la de la valina (Figura 1).

En plantas verdes, en *Phycomycetes* pertenecientes al orden *Hyphochytriales*, familia *Saprolegniaceae*, y en procariotas, la lisina también forma parte de la familia del aspartato sintetizándose por la vía del diaminopimelato. En *Phycomycetes* pertenecientes a los ordenes *Chytridiales* y *Blastocladales*, familia *Mucoraceae*, y en levaduras la lisina se sintetiza vía α -amino adipato, ruta biosintética que comienza en α -cetoglutarato. El hecho de que en procariotas no exista la vía sugiere que haya podido desarrollarse después de la aparición de los eucariotas (Bhattacharjee, 1983).

La biosíntesis de treonina en procariotas y su regulación ha sido objeto de numerosos estudios a nivel enzimático, genético y molecular debido al gran interés que tiene la producción biológica de este aminoácido (Yoshida *et al.*, 1990). En comparación, los estudios de esta ruta en levaduras, realizados mayoritariamente durante los años 1963 a 1973 por el grupo de de Robichon-Szulmajster, son relativamente incompletos. En la actualidad hay varios grupos trabajando en ella, si bien el número de publicaciones que han aparecido al respecto es reducido (Mannhaupt *et al.*, 1990a; 1990b; Aas y Rognes, 1990; Mountain *et al.*, 1990). No obstante, ya se conoce la mayoría de las enzimas que intervienen en ella, los genes que las determinan y, en una medida desigual, cómo ocurre su regulación (Mountain *et al.*, 1990; Thomas y Surdin-Kerjan, 1989; Ramos *et al.*, 1991). A continuación se describe cada una de las actividades que forman parte de esta ruta de biosíntesis tanto en procariotas, fundamentalmente en *E. coli*, como en *S. cerevisiae*.

Ruta común para treonina y metionina

La biosíntesis de treonina (Figura 1) parte del aspartato del cual, mediante tres pasos, se sintetiza homoserina. A partir de este punto la ruta se ramifica dirigiéndose, por un lado, hacia la síntesis de treonina e isoleucina y, por el otro, hacia la síntesis de metionina.

El primer paso de esta ruta, catalizado por la aspartato quinasa (EC 2.7.2.4), consiste en la activación del aspartato con ATP dando lugar al aspartil-fosfato. En *E. coli* se han identificado tres aspartato quinasa, denominadas I, II y III, que difieren en su sensibilidad a inhibición por treonina, lisina y metionina: la aspartato quinasa I se inhibe por treonina, la III por lisina, mientras que la II no se inhibe por ninguno de

estos aminoácidos (Stadtman *et al.*, 1961; Truffa-Bachi y Cohen, 1966; Patte *et al.*, 1967). Se han clonado y secuenciado los genes de *E. coli* que determinan la aspartato quinasa I (*thrA*) y aspartato quinasa II (*metL*) (Cossart *et al.*, 1979; Katinka *et al.*, 1980; Zakin *et al.*, 1983), así como el gen de la aspartato quinasa II de *Bacillus subtilis* (Chen *et al.*, 1987).

En levaduras, se ha descrito una sola aspartato quinasa (de Robichon-Szulmajster *et al.*, 1966; Ramos *et al.*, 1991) 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 aspartato quinasa, deducida de la de nucleótidos del gen *HOM3*, resulta ser homóloga a la de las tres aspartato quinasa de *E. coli*. Resultados de de Robichon-Szulmajster y Corrivaux (1963, 1964) indican que la aspartato quinasa de levaduras, al igual que la número I de *E. coli*, es inhibida alostéricamente por treonina ($K_i=3\text{mM}$), y también se inhibe por homoserina ($K_i=15\text{mM}$) y lisina ($K_i=15\text{mM}$) pero no por metionina. Por el contrario, otros autores (Stadtman *et al.*, 1961; Ramos *et al.*, 1991) no han observado la inhibición por lisina.

La aspartato semialdehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.11) cataliza el segundo paso de esta ruta consistente en la reducción del aspartil-fosfato a aspartato-semialdehído. Esta enzima está determinada en *E. coli* por el gen *asd* y en *S. cerevisiae* por el *HOM2*. En ninguno de los dos organismos la actividad aspartato semialdehído deshidrogenasa se inhibe por producto final. El gen *asd* ha sido clonado y secuenciado (Haziza *et al.*, 1982), al igual ha ocurrido con el gen *HOM2* de levaduras (Thomas y Surdin-Kerjan, 1989). En este caso, no existe similitud ni entre las secuencias de nucleótidos de los genes, ni entre las secuencias polipeptídicas de las enzimas de ambos organismos.

La homoserina deshidrogenasa (EC 1.1.1.3) cataliza la reducción del aspartato-semialdehído dando lugar a homoserina. En *E. coli* se han detectado dos actividades homoserina deshidrogenasa diferentes denominadas I y II. Las actividades aspartato quinasa I y homoserina deshidrogenasa I dependen de una misma proteína determinada por el gen *thrA* y ambas son inhibidas alostéricamente por treonina. Se han descrito mutaciones simples que afectan a la inhibición de ambas actividades (Cohen *et al.*, 1965a y b). De forma similar, el gen *metL* determina tanto la aspartato quinasa II, como la homoserina deshidrogenasa II cuyas actividades no son inhibidas por metionina, treonina, isoleucina o lisina (Cohen y Saint-Girons, 1987).

Tanto en levaduras como en *Brevibacterium lactofermentum*, existe una única actividad homoserina deshidrogenasa, determinada, respectivamente, por los genes *HOM6* y *thrA*. En ambos casos, esta actividad se inhibe por treonina. El gen *thrA* de *B. lactofermentum* ha sido clonado en un fragmento que contiene, además, el gen *thrB* que determina la actividad homoserina quinasa (Mateos *et al.*, 1987a; 1987b). El gen *HOM6* de *S. cerevisiae* ha sido clonado a partir de una genoteca del mismo organismo por complementación de la mutación *hom6* (Kim y Lea, 1986).

Ruta específica de biosíntesis de treonina

Consiste únicamente en dos pasos sucesivos catalizados por la homoserina quinasa y la treonina sintetasa, respectivamente.

En procariotas la actividad homoserina quinasa (EC 2.7.1.39) está determinada por el gen *thrB*; en levaduras, por el *THR1*. La actividad homoserina quinasa de *E. coli* se inhibe por treonina ($K_i=0.6\text{mM}$; Burr *et al.*, 1976) y, de forma competitiva, por el sustrato homoserina ($K_i=2\text{mM}$; Shames y Wedler, 1984). El gen *thrB* de *E.coli*, *Brevibacterium lactofermentum* y de la cianobacteria *Calotrix* ha sido clonado y secuenciado encontrándose mayor homología entre cianobacterias y bacilos que entre estos dos y el gen de enterobacterias (Cossart *et al.*, 1981; Mateos *et al.*, 1987a; Parsot y Mazel, 1987).

La actividad homoserina quinasa de levaduras, determinada por el gen *THR1*, parece inhibirse por treonina ($K_i=14\text{mM}$; Ramos *et al.*, 1991) y por el sustrato ($K_i=2\text{mM}$; 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 sintetasa y deshidratasa. El gen de levaduras contiene, además, regiones que no están presentes en los correspondientes bacterianos y que podrían tener significado evolutivo (Mannhaupt *et al.*, 1990a).

La treonina sintetasa (EC 4.2.99.2), última enzima de esta ruta, cataliza la conversión de homoserina-fosfato en treonina. Existen muy pocos estudios sobre esta actividad, determinada en procariotas por el gen *thrC* y, en levaduras, por el gen *THR4* (de Robichon-Szulmajster *et al.*, 1966; Ramos, 1990). La treonina sintetasa de *B. subtilis* cataliza, además, una reacción secundaria en la cual la homoserina-

fosfato es transformada en α -cetobutirato, precursor de la biosíntesis de la isoleucina (Schildkraut y Greer, 1973).

Los genes *thrC* de *E.coli* y *B. lactofermentum*, y el gen *THR4* de levaduras han sido clonados y secuenciados (Parsot *et al.*, 1983; Malumbres *et al.*, 1988; Mannhaupt *et al.*, 1990b). El gen de levaduras parece tener bastante homología con sus correspondientes en bacterias, sin embargo, difiere de otros genes relacionados con el metabolismo de treonina: *ILVI* (Kielland-Brandt *et al.*, 1984), *THR1* (Mannhaupt *et al.*, 1990a) y *CHAI* (Bojko *et al.*, 1989).

Ruta de síntesis de isoleucina y valina. Catabolismo de treonina

La biosíntesis de isoleucina en *S. cerevisiae* está catalizada por cinco enzimas (Kakar y Wagner, 1964; Jones y Fink, 1982) (Figura 1). La primera de ellas es la treonina deaminasa (EC 4.2.1.16) que convierte treonina en α -cetobutirato y que depende del gen *ILVI*. Las cuatro restantes, son compartidas con la ruta de la valina y catalizan los pasos desde α -cetobutirato a isoleucina y de piruvato a valina. El precursor inmediato de la valina, el α -cetoisovalerato, sirve de punto de partida para la síntesis de leucina (Satyanarayana *et al.*, 1968). Mutaciones en *ILVI* dan lugar a auxotrofia de isoleucina, mientras que mutaciones en los siguientes tres genes de la ruta, *ILV2*, *ILV5* e *ILV3*, hacen que la célula requiera simultáneamente isoleucina y valina (Kakar y Wagner, 1964). El último paso, de transaminación, no tiene gen asignado, probablemente porque pueda ser llevado a cabo alternativamente por varias enzimas. Los cuatro genes mencionados han sido clonados; *ILVI*, *ILV2* e *ILV5* han sido también secuenciados (Petersen *et al.*, 1983; Polaina, 1984; Kielland-Brandt *et al.*, 1984; Petersen y Holmberg, 1986; Falco *et al.*, 1985).

Además de la treonina deaminasa anabólica (*ILVI*), en *S. cerevisiae* existe una L-ser (L-thr) deaminasa catabólica (EC 4.2.1.13 ó 4.2.1.16) que capacita a las células de levaduras para crecer en medio con serina o treonina como únicas fuentes de nitrógeno (Ramos y Wiame, 1982). *CHAI* es el gen que determina esa actividad enzimática, que requiere piridoxal fosfato como cofactor. El producto de *CHAI* convierte serina en piruvato y amonio, y, aunque con menor afinidad, toma treonina y la convierte en α -cetobutirato y amonio. También se ha descrito la existencia de una sola deaminasa para L-serina y L-treonina en células de hígado de rata y otros mamíferos (Suda y Nakagawa, 1971). Sin embargo, se han caracterizado dos

deaminasas específicas de serina y treonina, respectivamente, en especies bacterianas del género *Clostridium* y en *E. coli* (Petersen *et al.*, 1988). El gen *tdc* de la treonina deaminasa de *E. coli* ha sido clonado (Goss y Datta, 1985).

También ha sido clonado el gen *CHAI* de *S. cerevisiae* (Petersen *et al.*, 1988). La transcripción de este gen se induce por serina y treonina. En presencia de uno de estos inductores, la deaminasa catabólica es capaz de sustituir a la anabólica (producto de *ILVI*) obteniéndose α -cetobutirato a partir de treonina, el primer paso de síntesis de isoleucina.

REGULACION DE LA SINTESIS DE TREONINA EN *S. cerevisiae*

En levaduras, la biosíntesis de aminoácidos se regula mediante dos tipos de controles: el general y los específicos de cada ruta. El **control general** actúa simultáneamente sobre diversos puntos de muchas de las rutas (Hinnebush, 1988). Este control hace que, en condiciones de "hambre" de un aminoácido, se induzca la expresión de los genes sometidos a él de forma que, en conjunto, aumenta la producción de aminoácidos por la célula. Este control depende de un número relativamente alto de genes reguladores positivos y negativos que actúan en cascada, siendo el producto del gen *GCN4* el que interacciona finalmente con secuencias reguladoras situadas delante de los genes sometidos a este control (Hinnebush, 1988).

Los **controles específicos** son los que operan sobre una determinada ruta como respuesta a la concentración de ciertos productos intermediarios y/o finales. El control específico se produce tanto a nivel de expresión de los genes, como de actividad enzimática, siendo este último el que parece controlar más fuertemente el flujo de precursores a través de una ruta biosintética (Jones y Fink, 1982).

Como se indicó anteriormente, los estudios sobre la regulación de la ruta de biosíntesis de la treonina se deben fundamentalmente al trabajo realizado por el grupo de de Robichon-Szulmajster durante los años 1963 a 1973, anterior por tanto, al descubrimiento de la regulación por control general (Schürch *et al.*, 1974). Los resultados de estos trabajos se resumen en la Figura 1.

Según de Robichon-Szulmajster *et al.*, (1965), el nivel de actividad aspartato quinasa disminuye de 4 a 7 veces cuando las células se cultivan en presencia de treonina u homoserina. Si se considera a este fenómeno como una represión, la borrelidina, un inhibidor de la treonil ARN_t sintetasa, desreprime esta actividad

(Nass y Hasenbank, 1970). Estos hechos sugieren la existencia de regulación específica mediada por treonina, presumiblemente a través del treonil-ARN_t. La síntesis de homoserina deshidrogenasa disminuye 2 veces cuando las células se cultivan en presencia de metionina. La treonina, sin embargo, no altera la síntesis de esta enzima (de Robichon-Szulmajster y Corrivaux, 1964). De forma recíproca, el nivel de actividad homoserina deshidrogenasa en una cepa auxótrofa para la metionina es mayor cuando ésta se somete a "hambre" para este aminoácido (Cherest *et al.*, 1971; de Robichon-Szulmajster *et al.*, 1973). Estos hechos sugieren la existencia de un mecanismo de regulación específica mediado por metionina sobre la síntesis de esta enzima. La aspartato semialdehído deshidrogenasa no parece reprimirse por los productos finales (de Robichon-Szulmajster *et al.*, 1973).

Cuando una cepa auxótrofa para la metionina se somete a "hambre" de la misma, aumenta el nivel de las actividades aspartato quinasa y aspartato semialdehído deshidrogenasa (Cherest *et al.*, 1971). Este hecho sugiere la existencia de regulación por control general sobre la síntesis de estas enzimas.

Por lo demás, los datos disponibles no son suficientes para proponer hipótesis acerca del mecanismo que regula la síntesis de las enzimas pertenecientes a la ruta específica de biosíntesis de treonina.

Resumiendo los datos acerca de la regulación a nivel de actividades las enzimas de esta ruta biosintética, tres de ellas están sujetas a retroinhibición por treonina (aspartato quinasa, homoserina deshidrogenasa y homoserina quinasa). La metionina regula también la ruta común inhibiendo la actividad homoserina deshidrogenasa.

Regulación de la biosíntesis de isoleucina y valina en *S. cerevisiae*

El gen de la treonina deaminasa de *S. cerevisiae* (*ILVI*) ha sido calificado de "multifuncional", ya que su producto parece realizar dos funciones: por un lado, catalizar el primer paso de síntesis de isoleucina convirtiendo la treonina en α -acetobutirato, y, por otro, regular la síntesis de las enzimas comunes de la ruta de isoleucina y valina. El mecanismo propuesto es el de unión de un Leu-ARN_t al extremo carboxilo de la enzima (Bollon, 1975; Bollon, 1974). Como consecuencia, los niveles enzimáticos de las cuatro enzimas comunes disminuyen cuando las células se cultivan en presencia de los aminoácidos de la ruta: leucina, isoleucina y valina.

Otros autores, sin embargo, no han encontrado esta regulación del producto de *ILVI* sobre las enzimas AHA reductasa (*ILV5*) y la transaminasa de los aminoácidos de cadena ramificada (Holmberg y Petersen, 1988). Según estos mismos autores, el gen *ILV5* está sujeto a regulación por control general, aunque no encuentran desrepresión de la AHA reductasa cuando se cultivan las células en presencia de isoleucina, leucina y valina, pero no triptófano. Ello sugiere que la síntesis de esta enzima, y la de la transaminasa, está sujeta a regulación por ambos mecanismos: control general y control específico de la ruta.

Lo mismo parece ocurrir con los genes *ILV2* (Falco *et al.*, 1985; Arndt y Fink, 1986) e *ILV3* (Bussey y Umbarger, 1969). El gen *ILVI* posee varias secuencias consenso de unión de la proteína *gcn4* en la zona 5' adyacente al promotor (Kielland-Brandt *et al.*, 1984) y parece estar sujeto a regulación por control general (Holmberg y Petersen, 1988). La treonina deaminasa presenta inhibición por isoleucina (Jones y Fink, 1982).

La treonina deaminasa catabólica de *S. cerevisiae*, producto del gen *CHAI*, es capaz de sustituir a la anabólica. La transcripción de *CHAI* se induce cuando las células se cultivan en serina o treonina como únicas fuentes de nitrógeno, mientras que no se detecta transcripción en presencia de amonio. Se han aislado mutantes (*sill*) que suprimen la mutación *ilv1* y presentan una inducción parcial de *CHAI* (Petersen *et al.*, 1988). Esto podría explicarse por un aumento en la concentración interna de los hidroxiaminoácidos.

MUTANTES SUPERPRODUCTORES DE TREONINA

La organización estructural y los mecanismos de regulación de la síntesis de aminoácidos son diferentes en microorganismos procarióticos y eucarióticos, aunque ambos tipos celulares comparten características comunes tales como retroinhibición por aminoácidos relacionados y competencia por los sustratos o precursores en los primeros pasos de la ruta y en los pasos de ramificación de las mismas.

La búsqueda de mutantes desregulados, para la superproducción de aminoácidos se realiza, frecuentemente, mediante el aislamiento de resistentes a análogos tóxicos. La hidroxinorvalina (AHV) se diferencia de la treonina en la presencia de un carbono más en la molécula. Se han obtenido mutaciones que confieren resistencia a AHV en *E. coli*, *Brevibacterium flavum*, *Proteus retgerii* y *Serratia marcescens* entre los procariotas (Enei *et al.*, 1989), y algunas estirpes de

Candida (Tsukada y Sugimori, 1971) y *S. cerevisiae* (Ramos y Calderón, enviado) entre los eucariotas. Todos estos mutantes se han caracterizado como superproductores de treonina. Ramos y Calderón (enviado) han descrito que las cepas de levaduras resistentes a hidroxinorvalina acumulan entre 249 y 497 μ moles de treonina por gramo de peso seco.

La borrelidina es un antibiótico macrólido que inhibe la síntesis de proteínas tanto en bacterias como en eucariotas mediante la inhibición de la actividad treonil ARN_t sintetasa. El efecto inhibitor de este antibiótico puede revertirse mediante treonina u homoserina (Poralla, 1975). Se han obtenido mutaciones de resistencia a borrelidina tanto en microorganismos (*E. coli* y *S. cerevisiae* entre otros), como en células de mamíferos. En levaduras se ha descrito un tipo de mutantes resistentes a borrelidina (mutantes *BOR*) que superproducen treonina (100-262 μ moles por g de peso seco) y homoserina (Nass y Poralla, 1976; Seibold *et al.*, 1981).

Otra forma de obtener mutantes desregulados se basa en la reversión de mutaciones en genes cuyos productos están sujetos a regulación. Se espera que algunos de los revertientes haya recuperado la actividad pero que la enzima correspondiente tenga una configuración irregular que la haga insensible a ciertas moléculas reguladoras. Esta estrategia ha sido utilizada para superproducir treonina en *Saccharomycopsis lipolytica* (Gaillardin y Heslot, 1979) y en *S. cerevisiae* (143-302 μ moles por g de peso seco; Delgado *et al.*, 1982).

Una alternativa a la de mutagénesis y selección de mutantes la constituye la multiplicación de genes estructurales de la ruta de síntesis de aminoácidos, lo que puede llevarse a cabo fácilmente clonando dichos genes en plásmidos multicopia. El aumento de dosis génica por este medio ha permitido, p. ej., mejorar la producción de triptófano en *S. cerevisiae* (Niederberger *et al.*, 1984; Prasad *et al.*, 1987). En el caso de la treonina, se ha mejorado la producción de este aminoácido en *E. coli* mediante la amplificación del operón de treonina en un plásmido multicopia (hasta $6.8 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$; Mizukami *et al.*, 1986). Los genes de la homoserina deshidrogenasa y la homoserina quinasa de *Brevibacterium lactofermentum* también se han clonado en plásmidos multicopia. La producción de treonina aumenta de $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (Morinaga *et al.*, 1987) a $33 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (Nakamori *et al.*, 1987) cuando ambos genes van en el mismo plásmido, en comparación a cuando se amplifica solamente el gen de la homoserina deshidrogenasa. Sin embargo, no existen datos en la literatura de producción de este aminoácido mediante amplificación de genes en levaduras.

CLONACION DE GENES EN LEVADURAS

Los primeros aislamientos de genes de levaduras se llevaron a cabo mediante complementación de mutaciones de *E. coli* que conferían auxotrofia, por plásmidos procarióticos que portaban fragmentos del genomio de *S. cerevisiae* (Ratzkin y Carbon, 1977; Struhl *et al.*, 1976). Sin embargo, este procedimiento es muy limitado ya que depende de la correcta expresión de genes eucarióticos en bacterias y del funcionamiento adecuado de los productos génicos correspondientes, circunstancias que se dan sólo raramente. Lo cierto es que sirvió, para clonar genes que pueden ser utilizados como marcadores seleccionables en levaduras y que han permitido el desarrollo de sistemas de transformación en estos organismos. Así pues, actualmente, la clonación puede llevarse a cabo directamente en levaduras.

Prácticamente todos los vectores para clonar en levaduras son anfibios que pueden multiplicarse tanto en *E. coli*, como en levaduras; suelen contener parte del vector pBR322 de *E. coli* y un marcador seleccionable en levaduras. Algunos de ellos son capaces de mantenerse autónomos porque contienen, además, un origen de replicación de levadura. Así, los YRp contienen una secuencia *ARS*, origen de replicación cromosómico (Williamson, 1985), y mantienen 20-80 copias por célula (Struhl *et al.*, 1979; Stinchcomb *et al.*, 1979; Kingsman *et al.*, 1979). También multicopia son los vectores YEp que se replican gracias a una secuencia *ORI* procedente del círculo de 2 μ (ej.: Beggs, 1978; Struhl *et al.*, 1979; Broach *et al.*, 1979). Estos dos tipos de vectores transforman con una eficiencia alta pero, si no hay presión selectiva, la célula suele perderlos con una frecuencia aproximada del 10%. La introducción de una secuencia centromérica *CEN* en un plásmido YRp lo estabiliza mitóticamente pero reduce su número de copias a 1 ó 2 por célula (Rose *et al.*, 1987). Estos vectores, denominados YCp, son muy útiles para clonar genes cuya sobre-expresión puede ser lesiva para la célula.

Los vectores YIp no contienen orígenes de replicación, transforman con baja frecuencia y deben mantenerse integrándose inmediatamente después de su entrada en la célula, en un *locus* cromosómico. Sin embargo, de todos los "instrumentos" moleculares de que dispone el genético de levaduras el más singular es, quizá, la capacidad de integrar un gen por recombinación homóloga en la región cromosómica correspondiente. De hecho, en *S. cerevisiae*, al contrario de lo que ocurre en otros organismos, la frecuencia de integración por recombinación homóloga es 10 veces superior a la que tiene lugar por recombinación ilegítima (Hinnen *et al.*, 1978), lo que

podría deberse a la gran eficiencia de sus sistemas de recombinación mitótica. Además, la integración puede "dirigirse" a un *locus* determinado cortando la secuencia correspondiente del plásmido con una enzima de restricción que generará extremos que son altamente recombinogénicos (Orr-Weaver *et al.*, 1981). Esto permite una serie de sofisticadas manipulaciones genéticas tales como el rescate alélico (Orr-Weaver *et al.*, 1983; Orr-Weaver y Szostak, 1983), la sustitución alélica y la disyunción génica, algunas de las cuales han sido utilizadas en esta Tesis.

OBJETIVO DE ESTA TESIS

El objetivo de este trabajo es, esencialmente, la obtención de cepas de levaduras superproductoras de treonina. Para alcanzarlo se ha seguido la estrategia de aumentar la dosis génica de algunos genes estructurales de la ruta de síntesis de este aminoácido que están sujetos a regulación. Concretamente, se han amplificado los genes *HOM3* y *THR1*.

En primer lugar, se han clonado y caracterizado los genes. También se ha clonado el alelo mutante *HOM3-R2* responsable de una aspartato quinasa insensible a retroinhibición por treonina. Posteriormente, se ha estudiado la cantidad de treonina y de otros aminoácidos que acumulan células con distintos fondos genéticos, que contienen un alto número de copias de los alelos silvestres *HOM3*, *THR1*, o del alelo mutante *HOM3-R2*. De esta forma podía establecerse una estrategia para obtener una cepa que produzca el máximo de treonina posible.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

MICROORGANISMOS

1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

En las Tablas I y II se relacionan las cepas utilizadas en esta Tesis y su procedencia. Como abreviatura de *Saccharomyces cerevisiae* se utiliza "*S. cerevisiae*" (van der Walt, 1984). En la nomenclatura se siguen las recomendaciones elaboradas en la "IV International Conference on Yeast Genetics" y recogidas en el Yeast Genetics Supplement (Microbial Genetics Bulletin 31, 1969).

Las designaciones genéticas que son relevantes para esta Tesis son:

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

- *HOM* designa genes comunes a las rutas biosintéticas de los aminoácidos treonina y metionina. Una cepa portadora de una mutación *hom* requiere simultáneamente ambos aminoácidos o bien homoserina, intermediario común a ambas rutas de biosíntesis. El alelo mutante *HOM3-R2* confiere resistencia a hidroxinorvalina.

- *ILV* son genes comunes a las rutas biosintéticas de los aminoácidos isoleucina y valina. Con excepción de las cepas portadoras de una mutación *ilv1*, las cuales requieren únicamente isoleucina, el resto de las mutaciones *ilv* producen auxotrofia para estos dos aminoácidos.

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

- *CAN1* es el gen estructural de la permeasa de la L-arginina (permeasa I). Los mutantes en este gen son resistentes a canavanina, un análogo tóxico de la arginina.

Tabla I. Cepas no originales de levaduras utilizadas en esta Tesis.

| CEPA | GENOTIPO | ORIGEN |
|-----------|---|--------|
| AJ483 | <i>MATa leu2-3,112 his4-417 can1</i> | AJ |
| AN33 | <i>MATα thr1 arg1 gal2 SUC2 mal</i> | YGSC |
| DBY746 | <i>MATα leu2-3,112 his3-Δ1 ura3-52 trp1-289_a</i> | YGSC |
| DBY747 | <i>MATa leu2-3,112 his3-Δ1 ura3-52 trp1-289_a gal can1</i> | YGSC |
| D160-2C | <i>MATα ilv1 ura3 hom3 his1 arg6 trp2 adel met1 gal2</i> | YGSC |
| F4 | <i>MATa thr4</i> | LCC |
| MMY1 | <i>MATα ura3-52 Cyh^R</i> | RB |
| MMY2 | <i>MATa ura3-52 Cyh^R</i> | RB |
| S288C | <i>MATα SUC2 mal mel gal2 CUP1</i> | YGSC |
| YAHV2-26D | <i>MATa HOM3-R2</i> | CR |

- **AJ:** Antonio Jiménez, Centro de Biología Molecular, Madrid
- **YGSC:** Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, California, EE.UU.
- **LCC:** La Cruz del Campo, S.A., Sevilla.
- **RB:** Richard Bailey, Solar Energy Research Institute, Golden Co., EE.UU.
- **CR:** Cayo Ramos, Departamento de Genética y Biotecnia de la Universidad de Sevilla.

Tabla II. Cepas originales de levaduras utilizadas en esta Tesis.

| CEPA | GENOTIPO | ORIGEN |
|-----------|--|--------------------|
| TMR1-4 | <i>MATa leu2-3,112 his4-417 thr1</i> [pMR1-4] | XMR9-9A [pMR1-4] |
| TMR1-41C | <i>MATα leu2-3,112 his3-Δ1 ura3-52 HOM3-R2</i> [pMR1-4] | XMR27-1C [pMR1-4] |
| TMR1-45B | <i>MATa leu2-3,112 trp1-289_a ura3-52 HOM3-R2</i> [pMR1-4] | XMR27-5B [pMR1-4] |
| TMR3-1 | <i>MATa leu2-3,112 his1 hom3 ura3 adel met1</i> [P1-AK4] | XMR14-30B [P1-AK4] |
| TMR3-R2 | <i>MATa leu2-3,112 his1 hom3 ura3 adel met1</i> [pMR3-R2] | XMR14-30B[pMR3-R2] |
| TMR10 | <i>MATa leu2-3,112 his3-Δ1 y/o his4-417 ura3-52</i> <i>thr1::pMR10</i> | XMR24-3A::pMR10 |
| TMR27-5B | <i>MATa leu2-3,112 trp1-289_a ura3-52</i> <i>HOM3-R2::[pMR3-R2]</i> | XMR27-5B::pMR3-R2 |
| XMR9-9A | <i>MATα leu2-3,112 his4-417 thr1</i> | XMR7-4D X AJ483 |
| XMR11-1A | <i>MATα leu2-3,112 his4-417 thr4 adel trp1</i> | XMR8-5D X AJ483 |
| XMR14-30B | <i>MATa leu2-3,112 his1 hom3 ura3 adel met1</i> | XMR12-13D X AJ483 |
| XMR24-3A | <i>MATa leu2-3,112 his3-Δ1 y/o his4-417 ura3-52 thr1</i> | XMR9-9A X DBY747 |
| XMR27-1C | <i>MATα leu2-3,112 his3-Δ1 ura3-52 HOM3-R2</i> | XMR26-15C X DBY746 |
| XMR27-5B | <i>MATa leu2-3,112 trp1-289_a ura3-52 HOM3-R2</i> | XMR26-15C X DBY746 |

[], mantienen un plásmido de forma autónoma.

::, mantienen un plásmido integrado.

A X B, producto meiótico del cruce de las cepas A y B.

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

- *a* y α son alelos del gen *MAT* que determina el sexo.

- Los subíndices *a*, *o* y *u* indican que la mutación del alelo correspondiente es un fin de mensaje de tipo ámbar, ocre u ópalo, respectivamente.

- La delta mayúscula (Δ) indica que la mutación del alelo correspondiente es una delección.

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

Los símbolos que aparecen como superíndices en los fenotipos son: + para los fenotipos silvestres; - para los mutantes; R y S, resistencia y sensibilidad a un inhibidor, respectivamente.

2. Estirpes de *Escherichia coli*

En la Tabla III se relacionan las estirpes de *E. coli* utilizadas en esta Tesis y su procedencia. En la nomenclatura se siguen las recomendaciones recogidas en Demerec *et al.* (1966).

Las designaciones genéticas que son relevantes para esta Tesis son:

- *Tc*^R y *Ap*^R se refieren a genes que confieren resistencia a tetraciclina y a ampicilina, respectivamente.

PLASMIDOS

Como vectores de clonación se utilizaron los siguientes plásmidos: **YIp5** (Struhl *et al.*, 1979), **YRp17** (Stinchcomb *et al.*, 1979), **YCp50** (Rose *et al.*, 1987), **YEpl3** (Broach *et al.*, 1979) e **YEp24** (Botstein *et al.*, 1979).

En las Figuras 2, 3 y 4 se representan los mapas de restricción de estos vectores. En la Figura 2 se incluye también el plásmido P1-AK4 constituido por el vector YEp24 en el que se ha clonado el gen *HOM3* de *S. cerevisiae* (Rafalski y Falco, 1988).

Tabla III. Estirpes de *E. coli* utilizadas en esta Tesis.

| ESTIRPE | GENOTIPO | ORIGEN |
|---------|---|--------|
| HB101 | <i>F⁻ hsdS20 (rB⁻ mB⁻) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20(Sm)^r xyl-5 mtl-1 supE44 λ⁻</i> | DGS |
| DH5 α | <i>F⁻ endA1⁻ hsdR17 (rK⁻ mK⁺) supE44 thi-1 gyrA96 recA1 [Φ80cl lacZΔM15] λ⁻</i> | GIA |

- DGS, Departamento de Genética y Biotecnia, Universidad de Sevilla.

- GIA, Instituto de Genética, Universidad de Copenhague, Dinamarca.

Tabla IV. Plásmidos originales de esta Tesis.

| PLASMIDO | VECTOR | GENOTIPO | ORIGEN |
|----------|--------|--------------------------|-------------|
| pMR1-1 | YEp13 | <i>LEU2 THR1</i> | ver Fig. 12 |
| pMR1-4 | YEp13 | <i>LEU2 THR1</i> | ver Fig. 12 |
| pMR10 | YIp5 | <i>URA3 THR1</i> | ver Fig. 13 |
| pMR30 | YRp17 | <i>TRP1 URA3 HOM3</i> | ver Fig. 9 |
| pMR301 | YRP17 | <i>TRP1 URA3 hom3Δ1</i> | ver Fig. 10 |
| pMR3-R2 | YRp17 | <i>TRP1 URA3 HOM3-R2</i> | ver Fig. 7 |

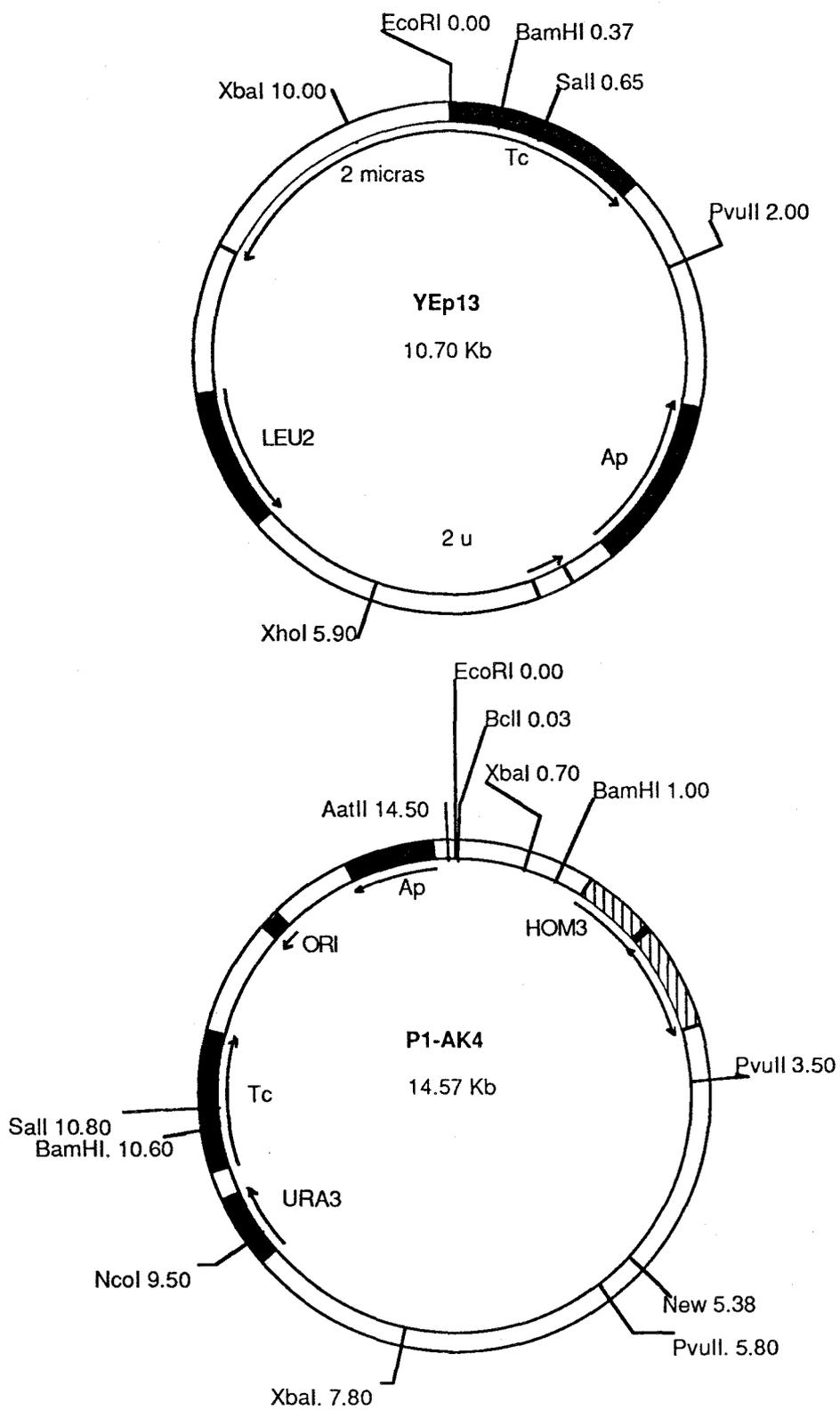


Figura 2: Mapa de restricción de los plásmidos YEp13 y P1-AK4

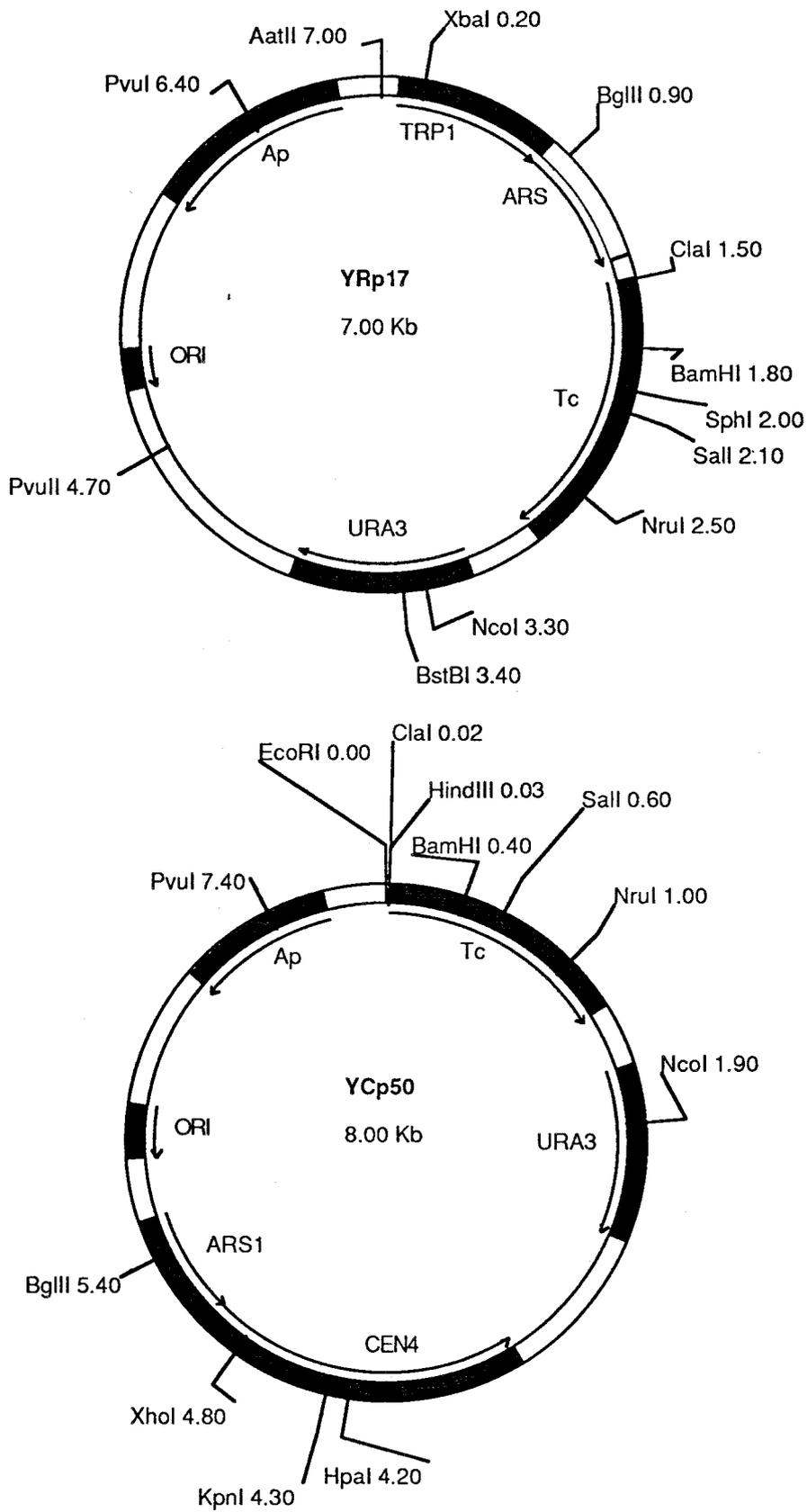


Figura 3: Mapa de restricción de los plásmidos YRp17 e YCp50

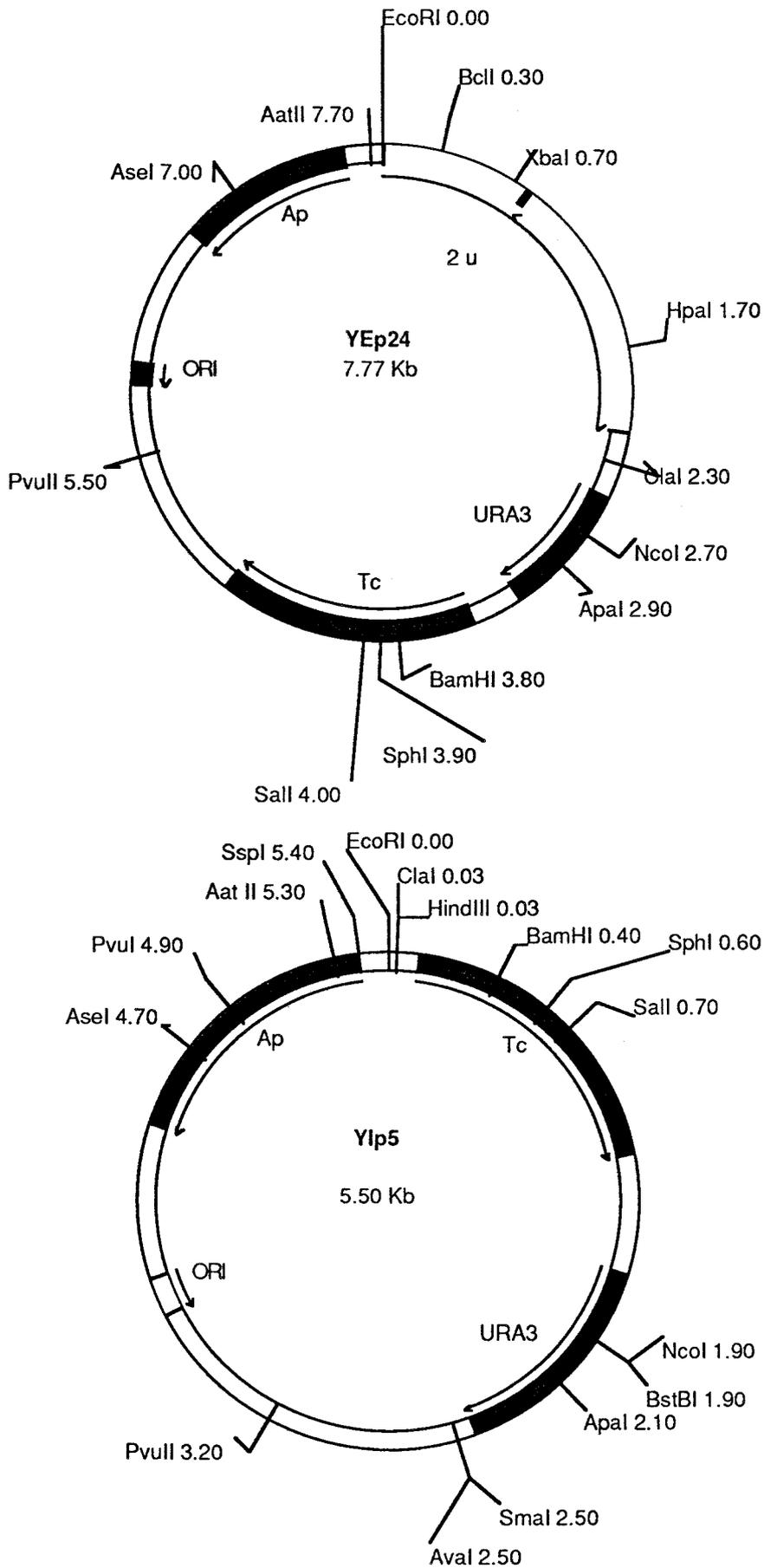


Figura 4: Mapa de restricción de los plásmidos YEp24 e YIp5.

En la Tabla IV se relacionan los plásmidos originales de esta Tesis, el genotipo más relevante que presentan y su procedencia.

PRODUCTOS QUIMICOS

La relación de productos químicos más relevantes utilizados en esta Tesis es la siguiente:

- La Helicasa (de jugo gástrico de *Helix pomatia*) fue suministrada por L'Industrie Biologique Française, Clichy, Francia; la zimoliasa fue de Boehringer Mannheim GmbH Biochemica, Mannheim, Alemania.

- La hidroxinorvalina (α -amino- β -hidroxivalerato) fue cedida por Degussa A.B.M., Alemania.

- Los aminoácidos fueron suministrados por Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EE.UU; excepto la D,L-homoserina que fue de Janssen Chimica, Bélgica, y la L-homoserina de Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza.

- La lactato deshidrogenasa/piruvato quinasa de músculo de conejo (PK/LDH) y el polietilenglicol (PEG) fueron de Sigma.

- Los productos de Biología Molecular fueron, en su mayor parte suministrados por Boehringer Mannheim, excepto la albúmina sérica bovina (BSA) y el bromuro de etidio (EtBr) que fueron de Sigma.

- Los reactivos de "Geneclean" fueron suministrados por AMS, Biotecnología España S.A., Madrid.

- La polimerasa de *Thermus aquaticus* (polimerasa Taq) fue de Perkin Elmer Cetus, Emeryville, California, EE.UU.

Los productos utilizados en los medios de cultivo fueron los siguientes:

- "Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulphate" (YNB), Bacto-peptona y Bacto-triptona, suministrados por Difco Laboratories, Detroit, MI, EE.UU.

- Glucosa y sulfato amónico fueron de Panreac, PRS Montplet y Esteban, S.A., Barcelona, España.

- Extracto de levaduras, de Adsa-Micro, Barcelona, España.

- Clouro sódico, de Probus, S.A., Badalona, Barcelona, España.

- Agar de Adsa-Micro o Analema U.S.L., Vigo, España.

Los demás productos químicos proceden de las casas comerciales habituales: Merck, Darmstadt, Alemania; Fluka Chemie AG., Buchs, Suiza y Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EE.UU.

TAMPONES Y SOLUCIONES

1. Tampones utilizados para la purificación de enzimas

1.1. Tampón A

Se prepara a partir del tampón Fosfato 40mM; además contiene KCl, 0.1M; MgCl₂.6H₂O, 5mM; EDTA, 2mM y DTE, 1mM.

1.2. Tampón AT

Se prepara a partir del tampón A al que se añade L-treonina hasta una concentración final de 1mM (Spencer y Wedler, 1984).

1.3. Tampón B

Se prepara a partir del tampón Fosfato 20mM; los componentes y las concentraciones son los mismos que en el tampón A.

1.4. Tampón BT

Se prepara a partir del tampón B al que se añade L-treonina hasta una concentración final de 1mM (Spencer y Wedler, 1984)

1.5. Tampón Fosfato

Preparado según Gomori (1955).

- Solución a: fosfato monopotásico, 40mM.

- Solución b: fosfato dipotásico, 40mM.

Las soluciones a y b se mezclan en proporciones adecuadas para obtener un pH de 7.2 (aproximadamente 2 partes de b por cada 1 de a).

El tampón Fosfato 20mM se prepara a partir del 40mM diluyéndolo a la mitad con agua destilada.

2. **Tampones utilizados para los ensayos enzimáticos**

2.1. Tampón Hepes

Consiste en una solución de ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil]-etanosulfónico (sal disódica) a la concentración deseada y ajustada al pH requerido con HCl 1M (Ramos *et al.*, 1991).

2.2. Solución PEP

Fosfoenolpiruvato (PEP), 40mM; MgSO₄·7H₂O, 0.3M y KCl, 1.8M (Ramos *et al.*, 1991).

3. Soluciones utilizadas para la cuantificación de aminoácidos

3.1. Solvente A

Contiene fosfato sódico, 0.4M pH 7.2 y tetrahidrofurano, 5% (v/v) (Martínez-Force y Benítez, 1991).

3.2. Solvente B

Contiene fosfato sódico, 0.4M pH 7.2 y acetonitrilo, 55% (v/v) (Martínez-Force y Benítez, 1991).

3.3. Mezcla derivatizante

- Borato sódico, 0.4M pH 10.
- Ftaldialdehído (54 mg · ml⁻¹) en metanol.

Se mezclan 9/10 partes de borato sódico por cada 1/10 parte de ftaldialdehído. A cada 5ml de esta mezcla se le añade 0.2ml de β-mercaptoetanol (Martínez-Force y Benítez, 1991).

4. Soluciones utilizadas para la transformación

De bacterias

4.1. Solución RF1

Contiene cloruro de rubidio, 100mM; MnCl, 50mM; acetato potásico, 30mM; CaCl₂, 10mM y glicerol al 15%, a pH 5.8 (Hanahan, 1985).

4.2. Solución RF2

Contiene MOPS, 10mM; cloruro de rubidio, 10mM; CaCl₂, 75mM y glicerol al 15%, a pH 6.8 (Hanahan, 1985).

De levaduras

4.3. Solución SE

Contiene Sorbitol, 1M y EDTA, 25mM, a pH 8.0 (Hinnen *et al.*, 1978).

4.4. Solución TCS

Contiene Sorbitol, 1M; Tris.HCl, 10mM (pH 7.5) y CaCl₂, 10mM (Hinnen *et al.*, 1978).

4.5. Solución SOS

Contiene Sorbitol, 1M; medio YEPD, 67%; Tris.HCl, 10mM (pH 7.5) y CaCl₂, 10mM (Hinnen *et al.*, 1978).

4.6. Solución PEG

Contiene PEG 4000 al 20% en Tris.HCl, 10mM (pH 7.5) y CaCl₂, 10mM (Hinnen *et al.*, 1978).

4.7. Solución LTE

Contiene acetato de litio, 0.1M en Tris.HCl 10mM (pH 8.0) y EDTA 1mM pH 8.0 (TE) (Ito *et al.*, 1983).

4.8. Solución LPEG

Contiene polietilengicol 4000 al 40% en acetato de litio 0.1M y TE (Ito *et al.*, 1983).

5. Soluciones utilizadas para la extracción de ADN

Para bacterias

5.1. Solución I

Contiene 50mM de glucosa, 25mM de Tris-HCl (pH 8.0) y 10mM de EDTA pH 8.0 (Maniatis *et al.*, 1982).

5.2. Solución II

Contiene 0.2N de NaOH y 1% de SDS (Maniatis *et al.*, 1982).

5.3. Solución III

Consiste en una solución 3M de acetato sódico (pH 4.8) a la que se ajusta el pH con ácido acético glacial (Maniatis *et al.*, 1982).

Para levaduras

5.4. Solución SED

Contiene 0.9M de Sorbitol y 0.1M de EDTA pH 7.5 (Davis *et al.*, 1980).

5.5. Solución TED

Contiene 50mM de Tris.HCl (pH7.4) y 20mM de EDTA (Davis *et al.*, 1980).

5.6. Solución AK

Consiste en una solución 5M de acetato potásico (pH 4.8) a la que se ajusta el pH con ácido acético glacial (Davis *et al.*, 1980).

6. Tampones utilizados para la manipulación *in vitro* de ADN

6.1. Tampón Tris.HCl

Consiste en una solución 1M de tris(hidroximetil)-aminometano ajustada al pH requerido con HCl 1M (Gomori, 1955).

6.2. Tampón TE

Consiste en una solución 10mM de Tris.HCl (pH 8.0) y 1mM de EDTA pH 8.0 (Maniatis *et al.*, 1982).

6.3. Tampón TAE (50x)

Contiene Tris base, 242 g; ácido acético glacial, 57.1ml y EDTA (pH 8.0), 0.5M en un volumen final de 1 l (Maniatis *et al.*, 1982).

6.4. Tampón TBE (5x)

Contiene Tris base, 54 g; ácido bórico, 27.5 g y EDTA (pH 8.0), 0.05M en un volumen final de 1 l (Maniatis *et al.*, 1982).

6.5. Tampón de carga (5x)

Constituido por Ficoll, 15% y azul de bromofenol, 0.25% (p/v) (Maniatis *et al.*, 1982).

6.6. Tampón de fosfatasa alcalina (10x)

Constituido por Tris.HCl (pH 9.0), 0.5M; MgCl₂, 10mM; ZnCl₂, 1mM y espermidina, 10mM (Maniatis *et al.*, 1982).

6.7. Tampón Taq (10x)

Contiene Tris.HCl (pH 8.8), 0.67M; MgCl₂, 0.067M; NH₃SO₄, 0.166M y β-mercaptoetanol, 0.1M.

6.8. Tampón Klenow (10x)

Contiene Tris·HCl (pH 7.5), 0.5M; MgSO₄, 0.1M; ditioneitol, 1mM y albúmina sérica bovina (BSA), 500 µg · ml⁻¹ (Maniatis *et al.*, 1982).

MEDIOS DE CULTIVO

1. Medios líquidos para levaduras

1.1. Medio mínimo (SD)

Contiene "YNB", 0.17%; glucosa, 2% y sulfato amónico, 0.5%.

Los suplementos requeridos por cada cepa se añaden después de esterilizar el medio a las concentraciones finales indicadas en Sherman *et al.* (1979). Para ello se preparan soluciones concentradas de cada suplemento que se esterilizan por filtración o autoclave según las indicaciones de los mismos autores.

1.2. Medio mínimo completo (SC)

La composición es idéntica al medio SD, al que se añade todos los aminoácidos y bases a las concentraciones finales indicadas en Sherman *et al.* (1986).

1.3. Medio mínimo con prolina como fuente de nitrógeno (SDP)

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

1.4. Medio nutritivo (YEPD)

Constituido por extracto de levadura, 0.5%; peptona, 1% y glucosa, 2%. Este medio es una modificación del descrito por Sherman *et al.* (1979).

2. Medios sólidos para levaduras

Se preparan según se describe en el apartado anterior pero añadiendo 2% de agar (Adsa-Micro, para los medios mínimos, de micromanipulación y esporulación; Analema, para los nutritivos).

2.1. Medio con hidroxinorvalina

Al medio SDP sólido con los requerimientos apropiados para cada cepa se añade, después de autoclavarlo, hidroxinorvalina a una concentración final de 10mM (1.33 mg · ml⁻¹) (Ramos y Calderon, enviado).

2.2. Medio estabilizado osmóticamente

Al medio SD sólido con los requerimientos apropiados para cada cepa se añade sorbitol hasta una concentración final de 1M.

2.3. Medio de preesporulación

Contiene extracto de levadura, 0.8%; peptona, 0.3%; glucosa, 10% y agar, 2% (Sherman *et al.*, 1979).

2.4. Medio de esporulación

Constituido por extracto de levadura, 0.1%; acetato potásico, 1%; glucosa 0.05% y agar, 2% (Sherman *et al.*, 1979).

2.5. Medio de micromanipulación

La composición es idéntica a la del medio nutritivo YEPD sólido, excepto que el agar es de Adsa-Micro.

3. Medios líquidos para bacterias

3.1. Medio nutritivo LB

Constituido por extracto de levadura, 0.5%; Bacto-triptona, 1% y NaCl, 1% (Maniatis *et al.*, 1982). Cuando era necesario, se añadía ampicilina ($50-100\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) o tetraciclina ($12 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) a partir de soluciones concentradas, según se describe en Maniatis *et al.* (1982).

3.2. Medio SOB

Constituido por extracto de levadura, 0.5%; Bacto-triptona, 1% ; NaCl, 10mM; KCl, 2.5mM; MgCl₂, 10mM y MgSO₄, 10mM (Maniatis *et al.*, 1982).

3.3. Medio SOC

Es idéntico al medio SOB al que se le añade glucosa 20mM (Maniatis *et al.*, 1982).

4. Medios sólidos para bacterias

Se preparan según se describe en el apartado anterior pero añadiendo 2% de agar Adsa-Micro. Cuando es necesario, después de esterilizar el medio LB con agar se añade ampicilina ($50-100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) o tetraciclina ($12.5-25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

METODOS

ESTIMACION DE BIOMASA

1. Determinación del número de células

1.1. Células totales

La concentración de células de una suspensión se estimaba contándolas en un microscopio óptico, con una cámara de Thoma (Brand, Alemania).

1.2. Células viables

Se define como célula viable aquella capaz de formar colonia en medio YEPD sólido. El número de células viables de un cultivo o una suspensión se determinaba sembrando una muestra del mismo en cajas que contenían medio YEPD sólido. Se realizaban las diluciones adecuadas para obtener entre 100 y 200 colonias por caja. Tras incubar durante 2-3 días a 30°C, se contaba el número de colonias aparecidas. Para cada determinación se sembraron 2-3 cajas de Petri y se calculó el valor medio.

2. Determinación del peso de las células

Una muestra de 20 ml de cultivo se filtraba a través de un filtro Millipore de 0.45 μm de diámetro de poro. El filtro con la biomasa retenida se secaba en una estufa a 105°C durante 10 minutos (previamente se había comprobado que tiempos de secado más prolongados no conllevaban una disminución significativa en el peso). Se tomó como peso seco de las células la diferencia entre el peso del filtro y el peso del filtro con la biomasa tras el secado. Se estimó que el peso húmedo de las células era, aproximadamente, cuatro veces el peso seco.

METODOS BIOQUIMICOS

1. Medida de las actividades aspartato quinasa y homoserina quinasa

En los siguientes apartados se describen brevemente los métodos seguidos para purificar y ensayar la homoserina quinasa y la aspartato quinasa. Estos métodos están descritos en extenso en Ramos (1990) y Ramos *et al.* (1991).

La purificación parcial de ambas enzimas se realizó obteniendo en primer lugar un extracto crudo de las células y sometiénolo a tres precipitaciones sucesivas, la primera con sulfato de protamina y las otras dos con sulfato amónico. El ensayo de ambas actividades enzimáticas se realizó cuantificando la liberación de ADP mediante el sistema piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa.

1.1. Purificación parcial de las enzimas

Se realizaba a partir de un cultivo de la cepa en cuestión, en medio mínimo SD con los requerimientos adecuados. Cuando éste alcanzaba una densidad óptica medida a 660 nm (D.O.660nm) entre 0.5 y 0.7, se recogían las células por centrifugación, se lavaban 2 veces en tampón AT y se rompían en un homogenizador Braun MSK (Melsungen, Alemania). Los residuos celulares se eliminaban del extracto mediante 2 centrifugaciones consecutivas a 4°C, la primera de 20 minutos a 8000 x g y la segunda de 2 horas a 105000 x g.

Al extracto crudo se añadía sulfato de protamina y, tras mantener el extracto en agitación suave a 4°C durante 30 minutos, se eliminaba el precipitado (ácidos nucleicos y proteínas asociadas a los mismos) mediante centrifugación. Al sobrenadante así obtenido se le añadía sulfato amónico hasta un 30% de saturación y se mantenía en agitación suave a 4°C durante 30 minutos, transcurridos los cuales, se eliminaba el precipitado por centrifugación. Para la segunda precipitación, se añadía sulfato amónico hasta un 45% de saturación. El precipitado, obtenido tras agitar y centrifugar en las condiciones utilizadas anteriormente, se resuspendía en tampón BT y se dializaba en frío dos veces, durante 12 horas cada vez, frente al mismo tampón.



1.2. Ensayo de la actividad homoserina quinasa

La actividad homoserina quinasa se ensayó cuantificando la liberación de ADP mediante el sistema acoplado piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa (PK/LDH) (Spencer y Wedler, 1984). La liberación de ADP se seguía midiendo la D.O._{340nm} en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 (Kyoto, Japón). La cubeta del espectrofotómetro contenía: tampón Hepes, 0.1 M; PEP, 4.5 mM; NADH, 0.3 mM; ATP, 5mM; KCl, 194 mM; MgSO₄.7H₂O, 30 mM; PK/LDH, 700 y 1000 unidades por ml, respectivamente. Tras mantener la mezcla en un baño a 30°C durante 2 minutos se desencadenaba la reacción añadiendo L-homoserina a una concentración final de 1mM. Cada medida se realizó en presencia y ausencia del aminoácido; la diferencia da la actividad dependiente de sustrato.

La actividad homoserina quinasa de un extracto se define como los mmoles de ATP transformados en ADP por minuto y ml.

Las unidades de actividad se calculan según la ecuación

$$\frac{(A-B) \times V_t}{E \times l \times V_e}$$

donde

A=-Δ D.O._{340nm} por minuto en presencia de L-homoserina

B=-Δ D.O._{340nm} por minuto en ausencia de L-homoserina

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)

El decremento de D.O._{340nm} por minuto se calculaba utilizando solamente el tiempo durante el cual el descenso de absorbancia se mantiene lineal que era siempre menor a 10 minutos.

1.3. Ensayo de la actividad aspartato quinasa

La actividad aspartato quinasa se midió de la misma forma que la actividad homoserina quinasa excepto que la reacción se desencadenaba mediante la adición

de L-aspartato 20 mM. Además en este ensayo se utilizaba una concentración final de ATP de 10 mM.

2. Determinación de aminoácidos

2.1. Cuantificación de aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El método se halla descrito en extenso en Martínez-Force y Benítez (1991) y, esencialmente, consiste en lo siguiente:

Un cultivo de la cepa en cuestión en medio nutritivo YEPD o medio mínimo SD con los requerimientos adecuados, se incubaba a 30°C hasta alcanzar una D.O._{660nm} entre 0.5 y 0.7. Las células se recogían por centrifugación. El sobrenadante servía para determinar la cantidad de aminoácidos en el medio de cultivo. Las células se lavaban, se concentraban 20 veces en agua estéril y se hervían durante 15 minutos. Los restos celulares se eliminaban por centrifugación y el sobrenadante se utilizaba para determinar la cantidad interna de aminoácidos.

Para la cuantificación se utilizó un cromatógrafo Waters equipado con una columna NovapackTM C18 de fase reversa (18 x 100 mm) y un inyector manual. El control del sistema, la integración de datos y su almacenamiento se realizaba utilizando el programa "Baseline 810" en un ordenador IBM AT.

La separación de aminoácidos se llevaba a cabo con los solventes A y B descritos en el apartado 3 de Materiales y gradiente escalonado, con un flujo de 2 ml por minuto. Cada ensayo duraba un total de 23 minutos. A 25 µl de una muestra de aminoácidos se añadía 75 µl de mezcla derivatizante (apartado 3 de Materiales) y se mantenía durante 2 minutos a temperatura ambiente antes de inyectar en el cromatógrafo. El grado de derivatización se estimaba ensayando dos patrones de una solución de aminoácidos (Sigma) en HCl 0.1 N a dos concentraciones diferentes.

2.2. Cuantificación de proteínas totales

La cantidad de proteína total de una solución se determinaba según el método descrito por Lowry *et al.* (1951).

2.3. Determinación de la excreción de treonina mediante prueba de alimentación cruzada

Esta prueba consiste en determinar la capacidad de una cepa de *S. cerevisiae* para alimentar un césped de otra cepa auxótrofa para treonina a la que se denomina cepa indicadora (Delgado *et al.*,1982; Ramos, 1990). En este trabajo se ha utilizado la cepa F4 como cepa indicadora.

A partir de un cultivo estacionario en YEPD de la cepa F4 se sembraba, tras centrifugar y lavar las células 2 veces en agua destilada estéril, un césped de aproximadamente 10^6 células sobre cajas de medio mínimo (SD) con los requerimientos necesarios, excepto treonina. Una vez que las cajas estaban bien secas, se sembraban sobre ellas mediante palillos de dientes estériles, las colonias a probar. Las cajas se incubaban durante 7 días a 30°C, transcurridos los cuales las cepas excretoras presentaban un halo de crecimiento del césped alrededor de la colonia sembrada.

METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

1. Transformación de *E. coli*

1.1. Método del cloruro de calcio

Este método, descrito en Maniatis *et al.* (1982), se utilizaba con la estirpe HB101. Básicamente se trata de mantener en frío y en presencia de una solución de CaCl_2 100 mM, una suspensión de bacterias recogidas en fase exponencial de crecimiento (D.O. 550_{nm} 0.5). A 200 μl de estas células competentes se les añadía 10-40 ng de ADN (disueltos en el menor volumen posible en TE) y se mantenían en hielo al menos 30 minutos, transcurridos los cuales se sometían a un choque térmico de 2 minutos a 42°C. La suspensión de células presuntamente transformadas se incubaba en medio LB a 37°C durante 1 hora antes de sembrarlas en cajas de medio selectivo, LB con ampicilina ($100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

En todos los experimentos se llevaba un control al que no se añadía ADN y otro al que se añadía un plásmido de frecuencia de transformación conocida.

1.2. Método del cloruro de rubidio

Cuando se utilizaba la estirpe DH5 α se siguió el método de transformación descrito por Hanahan (1985). El método consiste, esencialmente, en tratar células procedentes de un cultivo en medio SOB que había alcanzado una D.O._{450nm} de 0.5, sucesivamente con las soluciones RF1 y RF2 de cloruro de rubidio, ambas a 4°C. Las células competentes se congelaban en nitrógeno líquido y se conservaban a -80°C. Para la transformación, a 200 μ l de células competentes descongeladas a temperatura ambiente, se añadía 10-40 ng de ADN en un volumen máximo de 20 μ l y se mantenían en hielo al menos 40 minutos. Seguidamente, se sometían a un choque térmico de 90 segundos a 42°C. Al igual que en el método anterior, se incubaba en medio nutritivo SOC a 37°C antes de sembrar en medio selectivo (LB con ampicilina 100 μ g \cdot ml⁻¹). En paralelo se llevaban los mismos controles descritos anteriormente.

2. Transformación de *S. cerevisiae*

Para transformar levaduras se utilizaron dos métodos diferentes; transformación de protoplastos y de células intactas. En ambos casos, los transformantes se seleccionaron, en primer lugar, por el marcador que poseía el vector y, posteriormente, por el fenotipo del gen que deseábamos aislar.

2.1. Transformación de protoplastos

Este método está basado en el descrito por Hinnen *et al.* (1978) y Beggs (1978), con las siguientes modificaciones:

Células de un cultivo en medio nutritivo YEPD que habían alcanzado una D.O._{660nm} de 0.15 a 0.3, se recogían, lavaban y concentraban 20 veces en la solución SE. La suspensión de células se trataba con β -mercaptoetanol (4 μ l \cdot ml⁻¹) y Helicasa (4 mg \cdot ml⁻¹) durante aproximadamente 1 hora a 30°C con el fin de eliminar, al menos parcialmente, la pared celular. Los protoplastos se recogían, se lavaban con Sorbitol 1M y se concentraban 5 veces en la solución TCS.

Para la transformación se mezclaban 100 μ l de la suspensión de protoplastos con 1-5 μ g de ADN (en un volumen máximo de 10 μ l) y 5 μ l de ADN de esperma de salmón (5 μ g \cdot ml⁻¹) y se mantenía 10-15 minutos a temperatura ambiente. A la suspensión de células transformadas se añadían 0.9 ml de la solución de PEG y se

mantenían 20-30 minutos a temperatura ambiente. Las células se recogían mediante centrifugación, se resuspendían en solución SOS y se incubaban a 30°C durante 1 hora transcurrida la cual, se sembraban en cajas de medio estabilizado osmóticamente con los requerimientos adecuados para seleccionar sólo el marcador del vector. La siembra en cajas se realizaba inoculando previamente un tubo con 7 ml del mismo medio fundido, por cada caja a sembrar. Tras 6 ó 7 días de incubación a 30°C, las colonias transformantes aparecidas en las cajas de medio selectivo se transferían mediante palillos de dientes estériles a cajas de medio mínimo (SD) con los requerimientos adecuados para seleccionar un fenotipo determinado. Estas cajas se incubaban a 30°C durante 2 días.

Controles

En cada experimento se llevaban los siguientes controles:

- Control de células viables iniciales: previo al tratamiento enzimático con Helicasa se extraía una muestra, se diluía en agua bidestilada estéril y se sembraba en cajas de YEPD con el fin de determinar el número de células viables iniciales.

- Control de transformación: en paralelo con el proceso de transformación antes descrito, se llevaba un control al que no se añadía ADN y otro al que se añadía un plásmido de frecuencia de transformación conocida.

- Control de regeneración de protoplastos: tras el tratamiento enzimático para la formación de protoplastos y tras la transformación de los mismos, se extraían muestras de la suspensión, se diluían en Sorbitol 1M y se sembraban en cajas de medio estabilizado osmóticamente y con los suplementos requeridos, mediante el método del agar fundido. De esta forma se estimaba el número de protoplastos capaces de multiplicarse.

- Control de células intactas: a la vez que para el control de regeneración de protoplastos, se extraían muestras de la suspensión, se diluían en agua bidestilada estéril para lisar los protoplastos y se sembraban en cajas de medio estabilizado osmóticamente y con los suplementos requeridos, mediante el método del agar fundido. De esta forma se determinaba la proporción de células intactas respecto de protoplastos.

2.2. Transformación de células enteras

El método que se siguió fue esencialmente el descrito por Ito *et al.* (1983), basado en el tratamiento de las células con cationes alcalinos.

Células de un cultivo en medio nutritivo YEPD que había alcanzado una D.O._{600nm} de 1, se recogían, lavaban y concentraban 100 veces en la solución LTE. La suspensión se incubaba a 30°C al menos 1 hora. Para la transformación, se mezclaban 100 µl de la suspensión de células, 8 µl de ADN de esperma de salmón (5 µg · ml⁻¹) y 1-3 µg de ADN (volumen máximo de 10 µl). A esta mezcla se añadía 0.7 ml de la solución de LPEG y se incubaba a 30°C durante 1 hora, transcurrida la cual se sometían a un choque térmico de 5 minutos a 42°C. Las células transformadas se lavaban con TE y se sembraban en cajas de medio mínimo completo (SC) sin los requerimientos adecuados para seleccionar el marcador del plásmido. Tras 4-5 días de incubación a 30°C, aparecían colonias transformantes que eran sometidas, a continuación, a la segunda selección descrita anteriormente. Como controles se llevaban, en todo el proceso, una muestra a la que no se añadía ADN, y otra a la que se añadía un plásmido de frecuencia de transformación conocida.

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

3.1. "Minipreparaciones" de ADN

Cuando se requería sólo una pequeña cantidad de ADN se llevó a cabo una extracción por lisis alcalina según describen Birnboim y Doly (1979) pero sin adición de lisozima, partiendo de 1.5 ml a 10 ml de cultivo en medio LB con ampicilina (50 µg · ml⁻¹). Generalmente y con el fin de eliminar el ARN de las preparaciones, se sometían éstas a un tratamiento con ARNasa (Maniatis *et al.*, 1982). El ADN se sometía a una segunda precipitación con etanol y, una vez seco, se resuspendía en 50 µl de TE. Entre 2 y 3 µl de esta suspensión son suficientes para un análisis de restricción.

3.2. Preparaciones estándar de ADN

Cuando hacía falta aislar grandes cantidades de plásmido se seguía el mismo método que se describe en el apartado anterior salvo que se partía de 500 ml de cultivo en medio nutritivo LB con ampicilina ($50\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

A la extracción de ADN seguía una purificación en gradiente de cloruro de cesio-bromuro de etidio, según se describe en Maniatis *et al.* (1982). El bromuro de etidio se eliminaba de la solución tratando ésta con isopropanol saturado con TE y CsCl. Con el fin de eliminar el cloruro de cesio, las muestras se dializaban, tres veces frente a TE durante 20-30 minutos cada una, a 4°C.

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

Este método se utilizaba normalmente para transferir plásmidos de levaduras a bacterias. El método es el descrito por Davis *et al.*, 1980. La extracción se llevaba a cabo partiendo de 10 ó 40 ml (según la cantidad de ADN que se precisara) de un cultivo en fase estacionaria en medio mínimo (SD) con los requerimientos adecuados. Generalmente dicha extracción era seguida de un tratamiento ARNasa (Maniatis *et al.*, 1982) para eliminar el ARN de las preparaciones, sometiéndose posteriormente a una segunda precipitación con etanol al 96 %.

El ADN obtenido por este método no es de una pureza adecuada para el análisis de restricción pero transforma eficientemente.

5. Purificación y concentración de ADN

5.1. Microcolumnas Elutip-D

Este es un método rápido de purificación y concentración de ADN con el que se pueden recuperar fragmentos desde 50 pb a 50 kb.

Las microcolumnas de celulosa DEAE, Elutip-D, y los filtros de $0.45\mu\text{m}$ de diámetro de poro eran suministrados por Schleicher & Schuell (Dassel, Alemania), y se utilizaban según se detalla en el manual de instrucciones.

5.2. Columnas de Sephadex

Se seguía el método descrito por Maniatis *et al.* (1982) que consiste, básicamente, en hacer pasar una solución de ADN a través de una columna de Sephadex G50 a un flujo aproximado de 0.5 ml por minuto, recogándose entre 12 y 15 fracciones de 0.5 ml para su posterior análisis. Las muestras se concentraban mediante precipitación con etanol al 96%.

5.3. Concentración mediante centrifugación

Este método se basa en una filtración y centrifugación simultáneas utilizando tubos Centricon-30, suministrados por Amicon Division (W.R. Grace & Co., Danvers, MA, USA). Se seguían exactamente las instrucciones del suministrador.

6. Cuantificación de ADN

6.1. Por espectrofotometría

Según está descrito (Maniatis *et al.*,1982), una suspensión de $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de ADN bicatenario alcanza una D.O._{260nm} de 1. La concentración de una muestra determinada de ADN se estimó midiendo su D.O._{260nm} y hallando la relación con la mencionada anteriormente.

6.2. Por tinción con bromuro de etidio

La cantidad de ADN de una preparación también puede determinarse en muestras sometidas a electroforesis en gel de agarosa punto de fusión medio y teñidas con bromuro de etidio (EtBr; Maniatis *et al.*,1982). En estos casos, el ADN se cuantificaba comparando la fluorescencia emitida por el EtBr intercalado en la molécula con patrones de ADN del fago λ .

7. Manipulación enzimática del ADN

Las digestiones del ADN con endonucleasas de restricción se realizaban siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Maniatis *et al.* (1982), y las

recomendaciones de la firma que suministra las enzimas en cuanto a tampones y condiciones de incubación.

8. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

8.1. Análisis de los fragmentos de restricción

La resolución de fragmentos de restricción se llevaba a cabo en geles de agarosa del 0.6-1%, según el tamaño de los fragmentos (Maniatis *et al.*,1982) en tampón TAE, salvo que se indique otra cosa. Los geles se sumergían en el mismo tampón contenido en cubetas horizontales de electroforesis y se sometían a un voltaje de aproximadamente $5V \cdot cm^{-1}$ de longitud del gel. Excepto que se especifique otra cosa, en los geles se incluía como patrón de tamaño, ADN del fago λ digerido con *HindIII* (para fragmentos mayores 2 kb) o con *HindIII* y *EcoRI* (para fragmentos de hasta 2 kb).

8.2. Revelado de los geles

Los geles de agarosa se teñían sumergiéndolos 15 minutos en tampón de electroforesis con $1\mu g \cdot ml^{-1}$ de EtBr. Los geles se fotografiaban con una cámara Polaroid MP4 con película tipo 665, un filtro Kodak Wratten 22A y una iluminación inferior de luz ultravioleta de 300 nm procedente de un transiluminador Fotodyne 3-3002 (New Berlin, WI, USA).

9. Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Para aislar fragmentos de restricción separados en los geles de agarosa se seguían dos métodos.

9.1. Electroelución

Se utilizaba cuando los fragmentos de ADN eran mayores de 2 kb. El método, descrito en Maniatis *et al.* (1982) se basa en la elución mediante aplicación de corriente eléctrica, de moléculas de ADN de un gel de agarosa estándar, al mismo

tampón de electroforesis (TBE). El ADN recuperado en el tampón se precipitaba con 10% (v/v) de acetato sódico 3M pH 4.8 y etanol al 96%.

9.2. Método "Geneclean"

Se utilizaba cuando se trataba de purificar fragmentos de ADN menores de 2kb. El método se basa en la elución de fragmentos de ADN mediante fusión de la agarosa y adsorción del ADN a una matriz inerte. A continuación, el ADN se recupera de la matriz por elución en un tampón de baja concentración salina, como se detalla en el manual de instrucciones de "Geneclean". La electroforesis de ADN se realizaba en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% en tampón TAE. El ADN recuperado se precipitaba con etanol al 96 % para concentrarlo.

10. Amplificación *in vitro* de ADN mediante polimerización en cadena

Para llevar a cabo la amplificación del alelo *HOM3-R2* mediante PCR se disponía de las moléculas cebadoras, 1246 y 1247 (Figura 5A) suministradas por el Dr. M. Kielland-Brandt, Carlsberg Laboratory, Copenhagen (Dinamarca). Estas moléculas poseen una secuencia de nucleótidos complementaria a zonas adyacentes del gen *HOM3* de *S. cerevisiae* (Rafalski y Falco, 1988) y contienen, además, dianas para las enzimas *BamHI* y *Sall*. Se esperaba que estos oligonucleótidos sirvieran para multiplicar un fragmento de 1.9 kb que contiene dicho gen (Figura 5B).

Las suspensiones de oligonucleótidos en una solución 1N de hidróxido amónico se sometían a vacío durante 16 horas para eliminar el solvente; a continuación, se suspendían en agua estéril y se purificaban mediante una columna de Sephadex G50 (apartado 5.2). Las fracciones recogidas se analizaban mediante electroforesis en un minigel de agarosa al 0.8% en TAE con el fin de determinar cuáles de ellas contenían los oligonucleótidos. La cuantificación del ADN de estas fracciones se realizaba por espectrofotometría.

Como molde para la PCR se utilizó ADN total extraído de la cepa de levaduras YAHV2-26D.

En un tubo tipo Eppendorf de 0.5 ml se preparaba la mezcla de reacción, que contenía: aproximadamente 10ng (1 μ l) de la solución de ADN molde; oligonucleótidos 1246 y 1247, 1 μ M; deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 1 μ M; y 2 U de la polimerasa Taq, en tampón Taq (1X) un volumen final de 50 μ l. Para evitar la

A



B

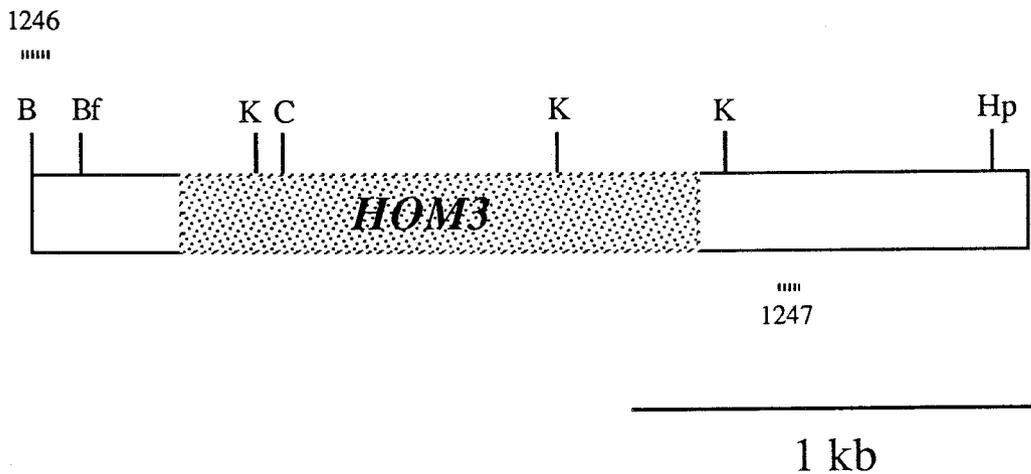


Figura 5 : Moléculas de ADN utilizadas para la amplificación *in vitro* de *HOM3-R2*
A. Cebadores, 1246 y 1247. B. Mapa de restricción de un fragmento de 2.5 kb contenido en pMR30 (ver Figura 9). " " " " cebadores,  ORF de *HOM3* (B, *BamHI*; Bf, *BfrI*; C, *ClaI*; Hp, *HpaI* y K, *KpnI*).

evaporación se añadía una fina capa (dos gotas) de aceite mineral. Como control, se preparaba en paralelo una mezcla de reacción a la que no se le añadía ADN molde.

Las mezclas se sometían a 30 ciclos con períodos de 1 minuto a 94°C para disociar las moléculas de ADN, 1 minuto a 55°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. Era preciso un primer ciclo donde el tiempo de disociación del ADN se ampliaba a 5 minutos ya que las moléculas del ADN molde que se obtienen tienen un tamaño medio de aproximadamente 20 kb.

Los fragmentos de ADN resultantes de la PCR se cuantificaban mediante electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión Nu SieveR GTG (FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA) al 2% en TBE. Como patrón de tamaño se utilizaba ADN del fago λ digerido con la endonucleasa de restricción *BstEII*. Estos fragmentos se concentraban mediante centrifugación en tubos Centricon-30, se recogían en unos 40 μ l de agua destilada y se trataban con polimerasa Klenow para rellenar los extremos (Maniatis *et al.*, 1982). A continuación se digerían con las enzimas *BamHI* y *Sall* y los fragmentos de interés se purificaban mediante microcolumnas Elutip-D. Estos fragmentos se ligaban a un vector al que previamente se había cortado con las mismas enzimas de restricción, sometido a electroforesis y extraído del gel mediante electroelución. Los plásmidos recombinantes se seleccionaban transformando células competentes de *E. coli* DH5 α con las mezclas de ligación.

METODOS GENETICOS

1. Obtención de diploides

Se tomaban con sendos palillos de dientes cantidades equivalentes de biomasa de cada uno de los conjugantes y se mezclaban sobre una caja del mismo medio con la ayuda de una gota de agua destilada estéril. La mezcla conjugante se incubaba a 30°C durante 3 a 4 horas. Normalmente se comprobaba que el proceso había tenido lugar observando al microscopio la aparición de cigotos.

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

Cuando los dos parentales poseían auxotroffas complementarias, la mezcla conjugante se replicaba mediante terciopelo a una caja con medio selectivo en el que sólo podía crecer el diploide formado.

Cuando los diploides no eran seleccionables fenotípicamente, éstos se separaban de la mezcla conjugante mediante un micromanipulador (Lawrence Precision Machines, Hayward, CA, EE.UU.) fijado a un microscopio invertido Nikon MS(Zurich, Suiza) y dotado de una microaguja de cristal. La separación se hacía sobre una caja de medio para micromanipulación. El carácter diploide de las células aisladas se comprobaba por su capacidad de esporular en las condiciones apropiadas.

2. Esporulación

Biomasa de los diploides que se deseaban esporular, se transfería con un palillo estéril a una caja de medio de preesporulación, incubándose durante 24 horas a 30°C. La biomasa obtenida se transfería, mediante réplica en terciopelo, a una caja con medio de esporulación que se incubaba durante al menos 4 días a 22°C.

3. Disección de ascas y análisis meiótico

La segregación de los caracteres se estudió mediante análisis de tétradas (Sherman y Lawrence, 1974). Para digerir las paredes de las ascas, éstas se trataban con helicasa (Johnston y Mortimer, 1959). Una pequeña cantidad de biomasa esporulada se suspendía en una gota de una solución 5 mg · ml⁻¹ de helicasa sobre un trozo de papel de parafina colocado dentro de una caja de Petri vacía y estéril; se incubaba a temperatura ambiente durante aproximadamente 30-40 minutos. Posteriormente, una porción de esta gota se extendía con un asa sobre una caja de medio para micromanipulación. Las esporas de cada asca se separaban mediante micromanipulación. Se incubaban a 30°C durante 48 horas y, una vez germinadas, se sembraban en los medios apropiados para determinar su fenotipo. En el análisis genético de las tétradas aparecían ditipos parentales (DP), ditipos recombinantes (DR) y tetratipos (T).

4. Determinación del sexo

Para determinar el sexo de una cepa determinada se cruzaban por las cepas indicadoras MMY1 (α) y MMY2 (a). La observación de cigotos al microscopio, después de incubar la mezcla conjugante durante 3-4 horas a 30°C, indicaba que la cepa en cuestión es de sexo contrario a aquella por la que se cruzó.

RESULTADOS

AMPLIFICACION DEL GEN *HOM3*

La aspartato quinasa de *S. cerevisiae* es la responsable de catalizar el primer paso en la ruta común de síntesis de treonina y metionina. Esta enzima parece ser clave en la regulación de la ruta como demuestra el que se hayan aislado mutantes que por el hecho de tener una aspartato quinasa desregulada, acumulan hasta 20 veces más treonina que la cepa silvestre (Seibold *et al.*, 1981; Ramos y Calderón, enviado).

El gen *HOM3* que determina la aspartato quinasa (Jones y Fink, 1982), ha sido aislado y caracterizado a partir de una genoteca genómica de *S. cerevisiae* (Rafalski y Falco, 1988). Sería plausible que una cepa que contenga el gen *HOM3* en un alto número de copias presente mucha actividad aspartato quinasa y, en consecuencia, superproduzca treonina. Con el fin de probar esta hipótesis, se llevó a cabo la siguiente serie de experimentos.

OBTENCION DE CEPAS CON *HOM3* AMPLIFICADO

Se disponía del plásmido multicopia P1-AK4 (Figura 2) constituido por el vector YEp24 en el que había sido subclonado un fragmento de ADN de 6.8 kb del inserto original que contenía el gen *HOM3* (Rafalski y Falco, 1988). Por tanto, sólo había que introducirlo por transformación en una cepa que tuviese los marcadores apropiados.

Como método de transformación, se eligió el de protoplastos por ser, en nuestras manos, el más eficiente. Sin embargo, este método sólo es factible si la cepa, además es "transformable". La transformabilidad de una cepa se basa en su capacidad de formar protoplastos y en la de que éstos tomen ADN y regeneren células completas. Se desconoce cuántos y cuáles son los factores genéticos que determinan esta capacidad (Johnston *et al.*, 1981). En consecuencia, la obtención de cepas transformables suele hacerse mediante repetidos cruzamientos con cepas previamente definidas como transformables, de modo que sean lo más isogénicas posible con ellas.

1. Construcción de una cepa transformable Hom3⁻

Se deseaba obtener una cepa que fuera transformable y que tuviera, además, fenotipo Hom3⁻ (marcador que se deseaba complementar) Ura3⁻ (marcador de YEp24). Para ello, se llevaron a cabo los cruzamientos que se describen en la Figura 6. Como base se utilizó la cepa transformable AJ483. En todos los casos, los diploides se seleccionaron por complementación, sembrando la mezcla conjugante en medio donde no podían crecer las cepas parentales. Los productos meióticos derivados de éstos diploides se separaron mediante micromanipulación. En el último cruzamiento, se probó la transformabilidad de varios haploides que presentaban el fenotipo apropiado. Al final del proceso, se seleccionó la cepa XMR14-30B como óptima para los siguientes estudios.

2. Transformación y selección de los transformantes

Mediante el método de los protoplastos, se transformó la cepa XMR14-30B con el plásmido P1-AK4. La selección de los transformantes se realizó sembrando en medio mínimo (SD) estabilizado osmóticamente con los requerimientos de la cepa, excepto uracilo. Las colonias transformantes se transfirieron mediante réplica a medio mínimo (SD) que contenía todos los requerimientos de la cepa, sin homoserina resultando que, como era de esperar, todas las colonias Ura⁺ eran, además, Hom⁺. Para estudios posteriores se eligió una de ellas a la que denominó TMR3-1.

Para corroborar que el fenotipo Hom⁺ dependía de la presencia en la célula de un plásmido, se permitió que la cepa TMR3-1 perdiera el plásmido y se comprobó si dicha pérdida llevaba asociada la desaparición del fenotipo Ura⁺ Hom⁺. El método se basa en el hecho de que células que contienen un plásmido, cultivadas en medio no selectivo que no exija la presencia del mismo para crecer, lo pierden al cabo de algunas generaciones (1% por generación en el caso de los basados en el círculo de 2 μ ; Armstrong *et al.*, 1989). Así, se sembró la cepa TMR3-1 en cajas de medio nutritivo (YEPD) para obtener colonias aisladas. Las cajas se incubaron a 30°C durante 48h transcurridas las cuales, se replicaron a cajas de medio mínimo (SD) con todos los requerimientos de la cepa, con todos excepto treonina o con todos excepto uracilo.

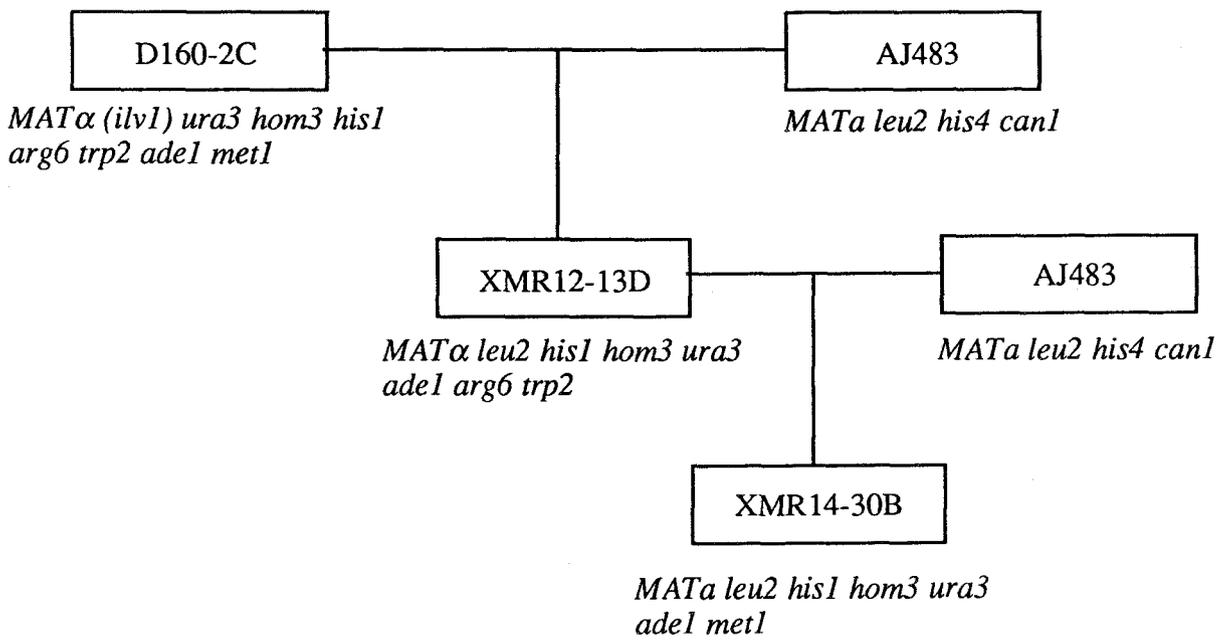


Figura 6: Construcción de cepas transformables Hom3⁻.

En todos los casos resultó que las colonias Ura⁻, es decir, que habían perdido el plásmido, eran, además, Thr⁻; lo que confirma que TMR3-1 contiene el plásmido P1-AK4 con el alelo silvestre *HOM3*.

CARACTERIZACION DE LAS CEPAS CON *HOM3* AMPLIFICADO

1. Medida de la actividad aspartato quinasa

Con el fin de purificar y ensayar las enzimas aspartato quinasa y homoserina quinasa, se cultivó la cepa TMR3-1, portadora del gen *HOM3*, en medio mínimo (SD) con los requerimientos de la cepa. Como control se midieron ambas actividades enzimáticas en la cepa original sin transformar y en S288C, silvestre para esos marcadores, cultivados en medio mínimo (SD) conteniendo los requerimientos de la primera cepa.

Los resultados se muestran en la Tabla V. De ellos se deduce que, efectivamente, la cepa portadora del plásmido multicopia P1-AK4 presenta una actividad aspartato quinasa alrededor de 10 veces la de la cepa silvestre. La actividad homoserina quinasa de las tres cepas es, sin embargo, similar.

2. Acumulación y excreción de treonina

Para comprobar si el transformante TMR3-1 superproducía treonina, se midió mediante HPLC, la cantidad de éste y otros aminoácidos acumulada intracelularmente y excretada al medio. Como control se utilizó la cepa silvestre S288C. Ambas cepas se cultivaron en medio mínimo (SD) conteniendo los requerimientos de TMR3-1.

Los resultados se muestran en la Tabla VI (esta Tabla contiene, además, resultados de otros experimentos que se describirán más adelante). De ellos se deduce que la cepa transformante, TMR3-1, acumula alrededor de 10 veces la cantidad de treonina de la cepa silvestre S288C, es decir, que la presencia del alelo silvestre *HOM3* en alto número de copias se traduce en superproducción de treonina.

Se comprobó también si el transformante TMR3-1 era capaz de excretar treonina al medio de cultivo mediante la prueba de alimentación cruzada descrita en Métodos. Como controles se utilizaron las cepas MMY1 (silvestre) y AHV2-26D

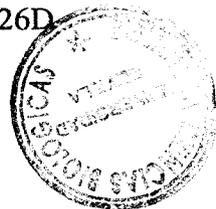


Tabla V. Actividades específicas aspartato quinasa (AK) y homoserina quinasa (HSK) de la cepa XMR14-30B, la misma cepa con el gen *HOM3* en alto número de copias (TMR3-1) y la cepa silvestre S288C, cultivadas en medio mínimo (SD) con distintos aminoácidos.

| CEPA | aas en el medio de cultivo | ACTIVIDAD (mU · mg ⁻¹ prot. · ml ⁻¹) | |
|---------------------------|-------------------------------|---|-----|
| | | AK | HSK |
| XMR14-30B | Ade Leu His Met Thr Ura | 4 | 49 |
| TMR3-1 [<i>HOM3</i>] | Ade Leu His Met | 1127 | 92 |
| S288C | Ade Leu His Met | 120 | 75 |

Tabla VI. Concentración interna ($\mu\text{moles} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína) y externa (mM) de aminoácidos en la cepa silvestre S288C y en cepas conteniendo distintos alelos en alto número de copias. Todas ellas se cultivaron en medio mínimo (SD) con Ade, Leu, His y Met.

| CEPA | ALELO AMPLIFICADO | Aminoácido | CONCENTRACION | |
|---------|----------------------|------------|---------------|---------|
| | | | Interna | Externa |
| TMR3-1 | <i>[HOM3]</i> | Hom | 0.18 | nd |
| | | Thr | 0.56 | nd |
| | | Met | 0.01 | nd |
| | | Ile | 0.02 | nd |
| TMR3-R2 | <i>[HOM3-R2]</i> | Hom | 17.24 | 0.18 |
| | | Thr | 2.76 | 0.02 |
| | | Met | 0.02 | 0.13 |
| | | Ile | 0.05 | nd |
| TMR1-4 | <i>[THR1]</i> | Hom | 0.42 | nd |
| | | Thr | 0.02 | nd |
| | | Met | nd | nd |
| | | Ile | 0.004 | nd |
| | | | | |
| S288C | - | Hom | nd | nd |
| | | Thr | 0.05 | nd |
| | | Met | nd | nd |
| | | Ile | nd | nd |

(nd = no detectable; < 0.001)

(excretora de treonina). Tras 7 días de incubación a 30°C, no se encontraron "halos de excrección".

AMPLIFICACION DEL ALELO MUTANTE *HOM3-R*

La hidroxinorvalina es un análogo tóxico de la treonina. En nuestro laboratorio se han obtenido cepas de *S. cerevisiae* resistentes a este análogo, algunas de las cuales acumulan internamente treonina e incluso la excretan al medio de cultivo (Ramos, 1990). Todas las cepas analizadas que presentaban este fenotipo poseían una asparto quinasa insensible a la inhibición que la treonina y la hidroxinorvalina ejercen sobre la enzima silvestre. La acumulación de treonina por parte de estas cepas es de 15-30 veces superior a la del silvestre, y la excreción es 3 veces mayor. Ramos (1990) ha caracterizado bioquímica- y genéticamente tres de estos mutantes y ha denominado *HOM3-R1*, *HOM3-R2* y *HOM3-R5*, respectivamente, a los alelos responsables de este fenotipo.

El aislamiento de uno de los alelos *HOM3-R* tendría, entre otras, las siguientes utilidades:

- Determinar cuál es la diferencia, a nivel molecular entre el alelo mutante y el silvestre, lo que ayudaría a comprender el funcionamiento de la enzima correspondiente.
- Estudiar el efecto de la presencia en la célula de un número alto de copias de este alelo, sobre la producción de treonina; presumiblemente, la producción de treonina sería mayor que la del mutante original.

En esta Tesis se planteó la clonación de un alelo *HOM3-R* utilizando para ello la cepa mutante YAHV2-26D (*HOM3-R2*) y el plásmido P1-AK4 que contiene el alelo silvestre *HOM3* (Figura 2; Rafalski y Falco, 1988). La cepa YAHV2-26D se eligió por ser una de los mejores productoras de treonina y estar su aspartato quinasa bien caracterizada (Ramos, 1990). Con el fin de asegurar el éxito del proyecto, se siguieron de forma paralela, las siguientes estrategias :

1. Amplificación *in vitro* del alelo *HOM3-R2* mediante PCR.
2. Rescate del alelo *HOM3-R2*, utilizando el método de reparación de huecos en el ADN.

AMPLIFICACION *IN VITRO* DE UN FRAGMENTO GENOMICO QUE CONTIENE AL ALELO *HOM3-R2*

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método mediante el cual se pueden producir *in vitro* grandes cantidades de fragmentos específicos de ADN, a partir de cantidades mínimas de un ADN molde (Saiki, 1989). La técnica de la PCR está basada en la amplificación enzimática de un fragmento de ADN a partir de dos oligonucleótidos que sirven como cebadores de la polimerización y que son complementarios de sendas secuencias flanqueantes del mismo. Repetidos ciclos de disociación del ADN molde, hibridación de los cebadores con sus secuencias complementarias y síntesis de ADN por la polimerasa, producen una acumulación exponencial del fragmento en pocas horas. El método puede utilizarse también con ADN genómico, amplificando solamente la secuencia comprendida entre los cebadores. La utilización de la ADN polimerasa termoestable aislada de la bacteria *Thermus aquaticus* (polimerasa Taq) hace posible que no haya que añadir unidades nuevas de la enzima en cada ciclo (Saiki, 1989).

Entre las múltiples aplicaciones que tiene el método está la clonación de secuencias únicas de un genoma. En este caso, el objetivo es amplificar el fragmento de ADN genómico correspondiente al alelo *HOM3-R2* para clonarlo posteriormente.

1. Obtención del fragmento amplificado

Utilizando la secuencia de nucleótidos del gen *HOM3* publicada por Rafalski y Falco (1988), se sintetizaron los oligonucleótidos flanqueantes que se describen en Métodos y en la Figura 5A. Se esperaba que se amplificara un fragmento de 1.9 kb (Figura 5B). Los cebadores contienen, respectivamente, en sus extremos las dianas para las endonucleasas de restricción *BamHI* y *Sall*, que servirían para su posterior clonación. Los oligonucleótidos se purificaron mediante columnas de Sephadex G50, recogiendo, en ambos casos, las fracciones 3 a 7. De ellas, para experimentos posteriores se utilizó la fracción nº 4 por ser la de mayor concentración de ADN (15 µM, en el caso del cebador 1246 y 21 µM en el caso del cebador 1247).

El ADN molde se aisló y purificó a partir de la cepa mutante YAHV18-26D, obteniéndose de 3 a 5 µg de ADN total. Los fragmentos de ADN genómico que se obtienen por este método poseen un tamaño medio de alrededor de 20 kb.

La reacción de amplificación se llevó a cabo según se describe en Métodos, partiendo de alrededor de 10 ng de ADN genómico, y generó entre 30 y 60 µg de un fragmento de 1.9 kb de tamaño, según se comprobó mediante electroforesis. Según la misma, los productos de 1.9 kb eran mayoritarios y parecían no estar contaminados con otras moléculas más pequeñas. A continuación el fragmento de ADN amplificado se concentró y purificó mediante centrifugación en tubos Centricon-30.

2. Clonación del fragmento amplificado

Los productos de la amplificación se incubaron con polimerasa de Klenow con el fin de asegurarse de que poseían extremos romos, y se purificaron mediante microcolumnas Elutip-D. Las moléculas resultantes fueron sometidas a digestión con *Bam*HI y *Sal*I, nuevamente purificadas mediante microcolumnas (Elutip-D) y, a continuación, ligadas al vector YIp5 (Figura 4). El vector había sido previamente digerido también con *Bam*HI y *Sal*I, sometido a electroforesis y purificado por electroelución la banda de 5 kb. Esta mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α, seleccionando las colonias resistentes a ampicilina. Como control, en un experimento similar y paralelo, se transformó con YIp5 cortado con las mismas enzimas. El número de colonias aparecidas en el experimento control fue, según se esperaba, al menos 10 veces inferior al obtenido con la mezcla de ligación.

A partir de algunos de los transformantes aparecidos, se realizaron "minipreparaciones" de ADN que se digirieron con las enzimas *Bam*HI y *Sal*I y se sometieron a electroforesis. Los resultados de esta electroforesis indicaban que los plásmidos de todos los transformantes daban lugar a una banda de ADN lineal de, aproximadamente, 5 kb correspondiente al vector YIp5 sin inserto. Esto implicaba que no se había clonado el fragmento que se deseaba y que los plásmidos conservaban al menos una de las dianas para las enzimas antes citadas, siendo así que los extremos generados por *Bam*HI y *Sal*I son incompatibles. La razón de obtener 10 veces menos transformantes con el vector religado podría estar en la presencia de los hexanucleótidos de los extremos del producto de PCR en la mezcla

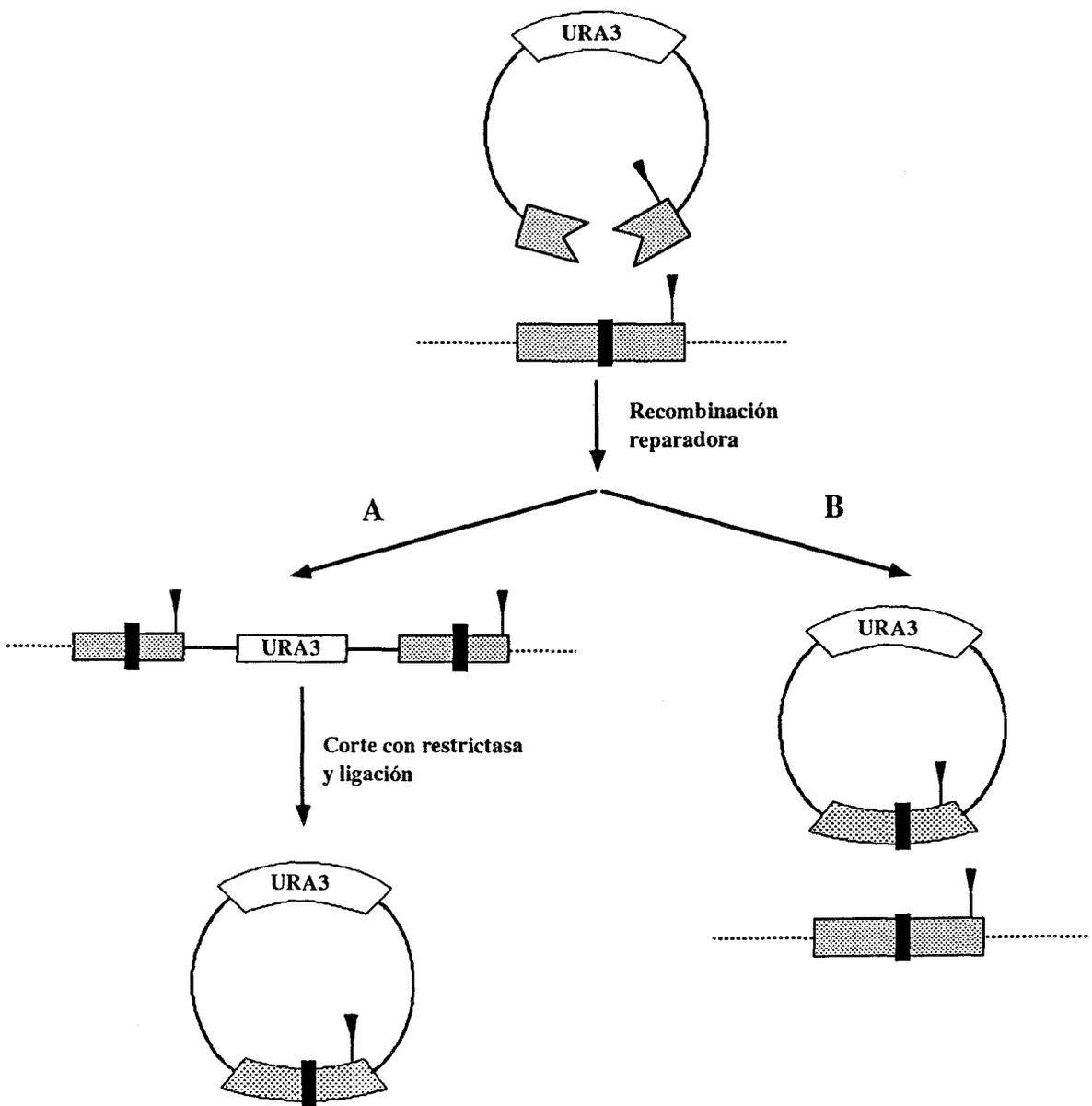


Figura 7: Rescate del alelo *HOM3-R2* por el método de reparación de "huecos" en el ADN. **A.** Reparación más integración en el genomio. **B.** Reparación simple del "huevo". ■ mutación presente en el alelo *HOM3-R2*; ∇, restrictasa.

de ligación; si estos hexanucleótidos no se hubiesen eliminado totalmente por el método de purificación (microcolumnas Elutip-D), podrían unirse al vector en vez del fragmento de 1.9 kb.

Otra posible explicación podría ser que el plásmido recombinante haya sufrido una reorganización que elimine el inserto. Esto sería plausible si el alelo que se desea clonar se expresara y resultara lesivo para el hospedador bacteriano de modo que, en la población, tendrían ventaja las células que hayan eliminado ese fragmento del plásmido. Este problema podría ser solventado clonando el producto de la PCR en un vector que no permitiese su expresión en *E. coli*.

RESCATE DEL ALELO *HOM3-R2*

Para llevar a cabo el rescate del alelo *HOM3-R2* del genomio, se eligió el método descrito por Orr-Weaver y Szostak (1983) basado en la reparación de "huecos" del ADN (Figura 7). Este método requiere, en primer lugar, eliminar mediante digestión con restrictasas, un fragmento interno de un gen clonado en un plásmido. A continuación, se transforma con este plásmido una cepa que lleva en su genomio el alelo que se desea clonar. La interacción de ambas moléculas, cromosoma y plásmido, resultará en la reparación del hueco, utilizando como molde la copia completa del cromosoma. Si el plásmido es de replicación autónoma, su recuperación supondrá la del alelo mutante. Con alta frecuencia, sin embargo, la reparación por recombinación lleva a la integración del plásmido en el genomio. En este caso, es preciso el rescate del plásmido del genomio lo que puede realizarse extrayendo ADN de la cepa, cortándolo con una restrictasa adecuada y ligando los extremos generados.

Para el rescate de alelo *HOM3-R2* se realizaron las siguientes operaciones:

- construcción de cepas transformables,
- construcción de un plásmido replicativo que lleve un *HOM3* con una deleción interna,
- transformación con el plásmido de las cepas construídas, y
- rescate del plásmido, presumiblemente con el alelo mutante, a partir de los transformantes.

Como vector se eligió un YRp porque un YE_p, al estar basado en el círculo de 2 μ , podría recombinar con los círculos presentes en la cepa y causar reorganizaciones no deseadas.

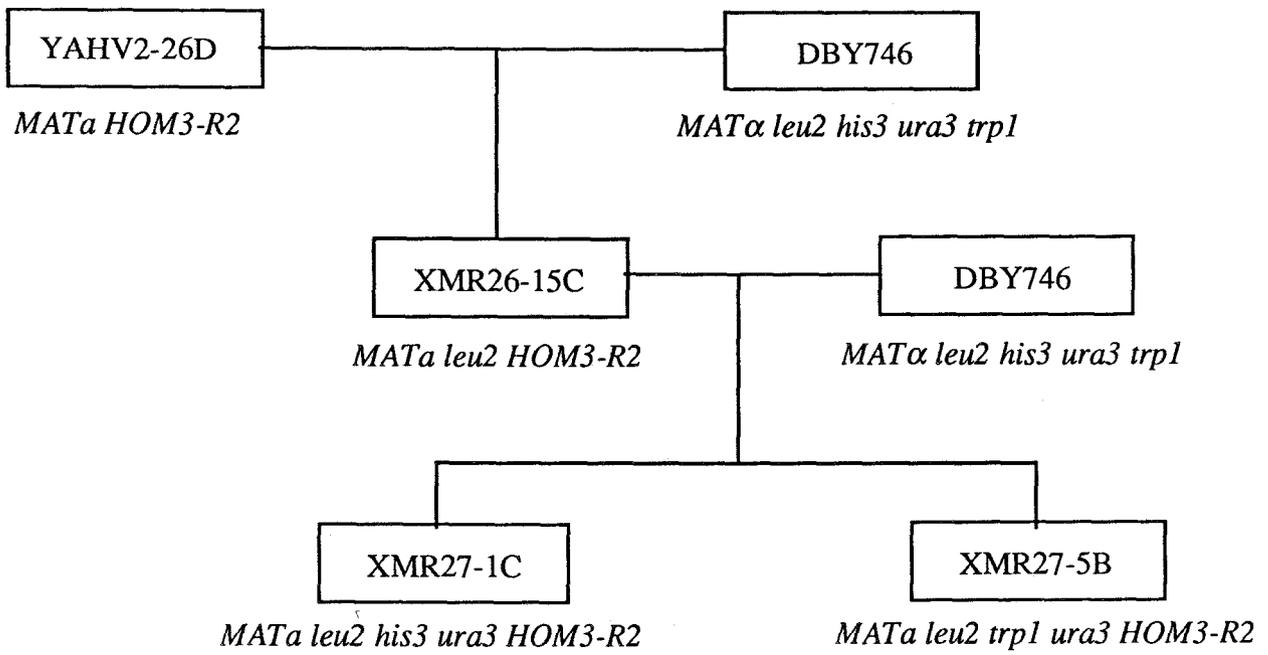


Figura 8: Construcción de cepas transformables Hom3-R2.

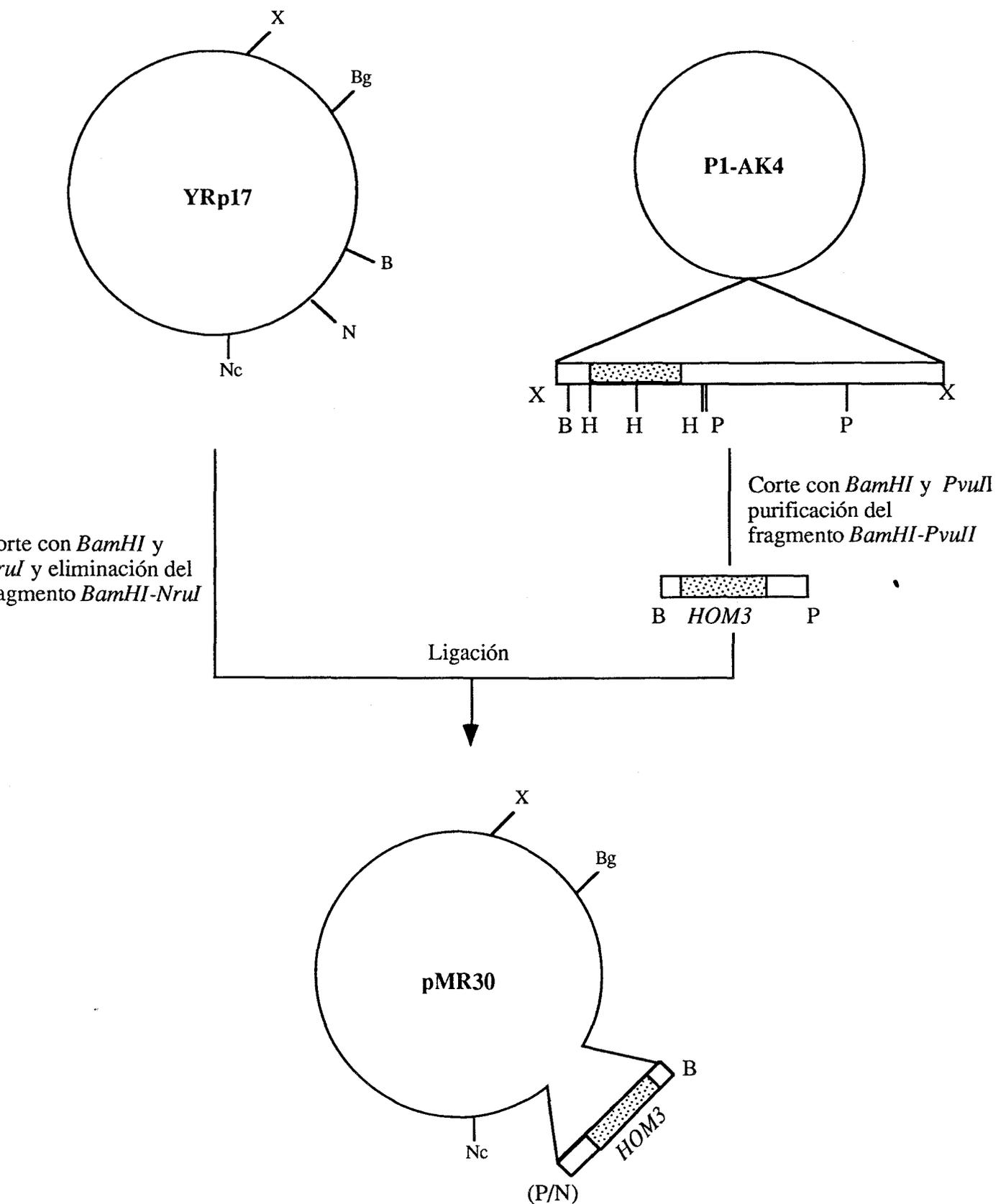


Figura 9: Obtención del plásmido pMR30 [YRp17-*HOM3*]. E, *EcoR* I; B, *Bam*H I; H, *Hind* III; X, *Xba* I; Bg, *Bgl* II; P, *Pvu* II; N, *Nru* I y Nc, *Nco* I.

1. Construcción de las cepas transformables

Con el fin de obtener cepas transformables que contengan el alelo *HOM3-R2*, se realizó la serie de cruzamientos que se describen en la Figura 8. Como cepa transformable de base se utilizó la DBY746. Los diploides se seleccionaron por micromanipulación en el primer cruzamiento y por complementación en el resto, sembrando la mezcla conjugante en medio mínimo (SD) con leucina.

Las cepas XMR27-1C y XMR27-5B se eligieron por su alta frecuencia de transformación (aproximadamente 1000 transformantes $\text{Ura}^+ \cdot \mu\text{g}^{-1}$ del vector YCp50), además de por tener los marcadores apropiados.

2. Subclonación del gen *HOM3* en el vector YRp17

El proceso se resume en la Figura 9. Para ello, se cortó el vector YRp17 (Figura 3) con las enzimas *BamHI* y *NruI* (ésta última genera extremos romos), se sometió a electroforesis y, a partir del gel, se purificó mediante electroelución el fragmento de 4.4 kb. Por otro lado, se digirió el plásmido P1-AK4 (Figura 2) con las enzimas *BamHI* y *PvuII* (ésta última también genera extremos romos). Los 4 fragmentos resultantes de la digestión se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa a partir del cual se purificó mediante electroelución el fragmento de 2.5 kb *BamHI-PvuII* que contenía el gen *HOM3*. Los dos fragmentos purificados de 2.5 y 4.4 kb, respectivamente, se unieron mezclándolos e incubándolos con ligasa de T4. La ligación tiene lugar mediante unión de extremos cohesivos compatibles (*BamHI-BamHI*), por un lado, y extremos romos (*PvuII-NruI*) por el otro.

Con la mezcla de ligación, se transformó *E. coli* DH5 α . Los transformantes se seleccionaron por su resistencia a ampicilina. Mediante "minipreparaciones" de ADN plasmídico realizadas a partir de los transformantes y análisis de restricción de los mismos, se comprobó que todos los plásmidos analizados contenían el inserto esperado. Se eligió uno de ellos al que se denominó pMR30 (Figura 9). Este plásmido contiene un gen *HOM3* funcional según se deduce del hecho de que introducido en la cepa XMR14-30B, es capaz de complementar la mutación *hom3* presente en esta cepa.

3. Delección de un fragmento interno de *HOM3*

La endonucleasa *KpnI* corta al plásmido pMR30 sólo en el inserto de *HOM3*, teniendo este fragmento tres dianas para esta enzima (Figura 10). Así pues, con el fin de generar una delección interna lo más amplia posible, se cortó el plásmido pMR30 con *KpnI*, se diluyó hasta una concentración de $1\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, aproximadamente, y se incubó con ligasa de T4. Con esta suspensión se transformó *E. coli* DH5 α seleccionándose transformantes resistentes a ampicilina. Se realizaron "minipreparaciones" de ADN a partir de los transformantes y mediante análisis de restricción de los plásmidos, se comprobó que todos ellos tenían solamente una diana para *KpnI*, lo que implicaba que habían perdido los dos fragmentos internos. A este nuevo alelo se le denominó *hom3- Δ 1* y el plásmido que lo porta, pMR301 (Figura 10). Este plásmido, como era de esperar, no complementa la mutación *hom3* presente en la cepa XMR14-30B, según se pudo comprobar transformándola con el mismo.

4. Transformación y selección de los transformantes

Células enteras de las cepas XMR27-1C y XMR27-5B se transformaron mediante el método del acetato de litio, con el plásmido pMR301, seleccionándose los transformantes en medio mínimo completo (SC) sin uracilo que es el marcador del plásmido. Previamente y con el fin de inducir la recombinación entre el *locus HOM3* y su homólogo en el plásmido, se había cortado este último simultáneamente con *KpnI* y *BfrI*. Se obtuvieron 450 transformantes Ura⁺ de la cepa XMR27-1C y 150 de la XMR27-5B, seleccionándose 40 de cada una para estudios posteriores.

5. Caracterización de los transformantes

En primer lugar, se indujo la pérdida del plásmido sembrando los transformantes en medio no selectivo (YEPD) para comprobar que el fenotipo Ura⁺ era debido a la presencia de un plásmido. Como se esperaba (Orr-Weaver *et al.*, 1983), el 50% de los transformantes perdían el marcador, lo que indica que en el 50% de los casos el plásmido se ha reparado y permanece autónomo y en el otro 50%, se ha integrado.

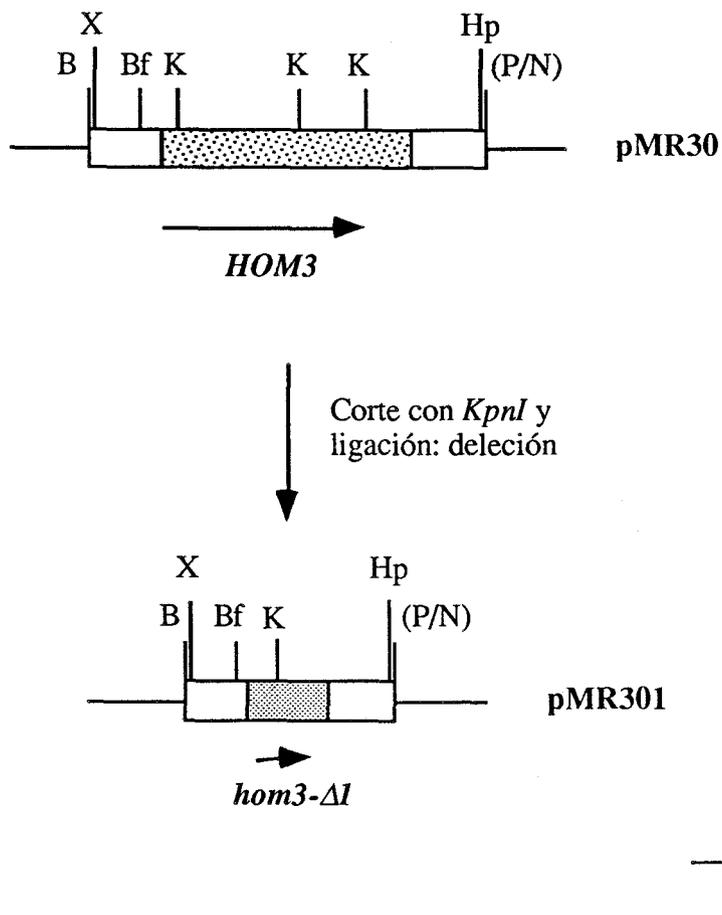


Figura 10: Obtención del alelo *Hom3-Δ1*. B, *BamH I*; P, *Pvu II*; N, *Nru I*; X, *Xba I*; K, *Kpn I* y Bf, *Bfr I*. Inserto y YRp17. ORF de *HOM3*

5.1. Transformantes que mantienen el plásmido de forma autónoma

Se seleccionaron 6 transformantes de cada cepa de los que mantenían el plásmido autónomamente; se les extrajo ADN total y, con él, se transformó *E. coli* DH5 α . Sólo se obtuvieron clones bacterianos resistentes a ampicilina en dos casos, ambos procedentes de la cepa XMR27-5B. Tras analizar los plásmidos que portaban mediante análisis de restricción, se comprobó que tenían un tamaño similar a pMR301 y el mismo mapa de restricción. Estos plásmidos no complementaban la mutación *hom3* de la cepa XMR14-30B, lo que sugiere que la delección no había sido reparada.

5.2. Transformantes que contienen el plásmido integrado

Se seleccionaron dos transformantes de la cepa XMR27-5B que contenían el plásmido integrado en el genomio. Se extrajo su ADN genómico y se digirió con la endonucleasa *BfrI* o bien con la *HpaI*, las cuales cortan cerca de los extremos 5' y 3' de la zona codificante del gen *HOM3*, respectivamente (ver Figuras 9 y 10). A la preparación de ADN se le añadió ligasa de T4 y se utilizó para transformar *E. coli* DH5 α obteniéndose 3 clones bacterianos resistentes a ampicilina; dos de ellos procedían de uno de los XMR27-5B transformados y el tercero, del otro. Se realizó el análisis de restricción de los plásmidos que portaban, encontrándose que sólo uno de ellos presentaba el tamaño y patrón de bandas esperado al cortar con las enzimas *Clal* y *KpnI*. Este plásmido era, además, el único que contenía un alelo *HOM3* funcional como demostraba el hecho de que complementaba la mutación *hom3* de la cepa XMR14-30B. A este plásmido se le denominó pMR3-R2, y TMR3-R2 a la cepa XMR14-30B transformada con él.

El segundo plásmido parecía contener un inserto de tamaño doble al anterior; y el tercero, no se cortó con las enzimas anteriormente citadas. Ninguno de estos plásmidos fue capaz de complementar la mutación *hom3* de la cepa XMR14-30B.

CARACTERIZACION DE LA CEPA CON *HOM3* AMPLIFICADO

1. Inhibición por treonina de la aspartato quinasa

Con el fin de comprobar que el alelo *HOM3* funcional presente en la cepa TMR3-R2 era, efectivamente, el *HOM3-R2*, se purificó y caracterizó su aspartato quinasa según se describe en Métodos. Los resultados (Tabla VII) muestran que la aspartato quinasa de la cepa TMR3-R2 es prácticamente insensible a treonina. El control, constituido por la misma cepa transformada con el plásmido P1-AK4, es decir, con el alelo silvestre, presenta una aspartato quinasa cuya actividad se inhibe en un 95% por treonina. La actividad homoserina quinasa de la cepa TMR3-R2 presenta una inhibición por treonina de alrededor de un 20-40 %. Estos datos son consistentes con los descritos por Ramos (1990) para la cepa mutante original de lo que se deduce que, efectivamente, se ha clonado el alelo *HOM3-R2*.

2. Acumulación y excreción de treonina

Mediante HPLC, se determinó la cantidad interna de treonina y otros aminoácidos de la ruta acumulada y excretada por la cepa TMR3-R2. La Tabla VI resume los resultados obtenidos. La cepa que contiene el alelo mutante en alto número de copias acumula 5 veces más treonina que la que porta un alto número de copias del alelo silvestre y unas 50 veces más que lo que acumula una cepa silvestre.

3. Resistencia a hidroxinorvalina

El alelo *HOM3-R2* de *Saccharomyces cerevisiae* confiere resistencia a hidroxinorvalina (Ramos, 1990). Este fenotipo se ve enmascarado cuando se añaden al medio de cultivo aminoácidos de la ruta de la treonina u otros aminoácidos que compiten con la hidroxinorvalina por permeasas para entrar en la célula, p. ej. leucina (Martín-Rendón *et al.*, en preparación).

La cepa TMR3-R2 portadora del plásmido pMR3-R2 posee varios marcadores de auxotrofía, entre ellos *MET1* y *LEU2* siendo, por tanto, imposible determinar si es o no resistente a hidroxinorvalina. Dado que dicha resistencia es un carácter dominante, se estimó que podría determinarse este fenotipo construyendo una cepa

Tabla VII. Actividades específicas aspartato quinasa (AK) y homoserina quinasa (HSK) en presencia de treonina de cepas que contienen los alelos *HOM3* y *HOM3-R2* en alto número de copias, cultivadas en medio mínimo (SD) que contenía Leu, Ade, His y Met. Ambas cepas provienen de la XMR14-30B.

| CEPA | Thr | ACTIVIDAD (mU · mg ⁻¹ prot. · ml ⁻¹) | | ACTIVIDAD RESIDUAL | |
|-------------------------------|-----|--|-----|-----------------------|-----|
| | | AK | HSK | AK | HSK |
| TMR3-1 [<i>HOM3</i>] | - | 608 | 32 | 1 | 1 |
| | + | 31 | no | 0.05 | no |
| | | | | | |
| TMR3-R2 [<i>HOM3-R2</i>] | - | 13 | 11 | 1 | 1 |
| | + | 13.7 | 6.9 | 1 | 0.4 |

(no = no determinado)

diploide heterocigótica y protótrofa a partir de la haploide transformante. Para ello se cruzaron las cepas TMR3-R2 y MMY1 y, mediante micromanipulación, se seleccionó la cepa diploide XMR35. Esta cepa se sembró en cajas de medio SDP que contenía 10mM, 5mM ó 1mM de hidroxinorvalina. Como control se inocularon las cepas YAHV2-26D y MMY1, resistente y sensible al análogo, respectivamente y el diploide al que se le había hecho perder el plásmido.

El diploide XMR35 resultó no ser resistente a hidroxinorvalina en ninguna de las condiciones ensayadas; la cepa silvestre era sensible y la AHV2-26D, resistente a las tres concentraciones.

AMPLIFICACION DEL GEN *THR1*

La homoserina quinasa de *S. cerevisiae*, producto del gen *THR1*, cataliza el primer paso en la ruta específica de síntesis de treonina. Esta enzima parece estar regulada tanto a nivel de actividad como de síntesis por producto final (Jones y Fink, 1982). Sería plausible que una cepa que contenga el gen *THR1* en un alto número de copias y que, en consecuencia, presente una alta actividad homoserina quinasa, superproduzca treonina. Con el fin de probar esta hipótesis, se llevó a cabo la siguiente serie de experimentos.

AISLAMIENTO DEL GEN *THR1*

Con esta serie de experimentos se pretendía clonar el gen *THR1* a partir de una genoteca genómica de *S. cerevisiae*, mediante complementación de una mutación *thr1*. Para ello se disponía de una genoteca construída por Nasmyth y Reed (1980) en el vector YEp13 (Figura 2). Esta genoteca se obtuvo insertando en el sitio *BamHI* de YEp13, fragmentos de 5 a 20 kb de ADN genómico de *S. cerevisiae* AB320 obtenidos por digestión parcial con la endonucleasa de restricción *Sau3A*.

Dado que para el aislamiento de un gen a partir de una genoteca genómica es preciso obtener un número alto de colonias transformantes y, por tanto, frecuencias de transformación relativamente altas, también en este caso se eligió el método de transformación de protoplastos. Para ello, fue preciso construir previamente una cepa transformable con fenotipo Thr1⁻ (marcador que se deseaba complementar) Leu2⁻ (marcador de YEp13).

1. Construcción de una cepa transformable Thr1⁻

En la Figura 11 se resume los cruzamientos que se realizaron con el fin de obtener una cepa que fuera Thr1⁻ Leu2⁻ transformable. Para ello, se procedió de manera similar a como se describe para la selección de cepas transformables Hom⁻ transformable. Como transformables, se utilizaron las cepas AJ483 y DBY747. Para la parte del trabajo que se describe a continuación se seleccionó la cepa XMR9-9A.

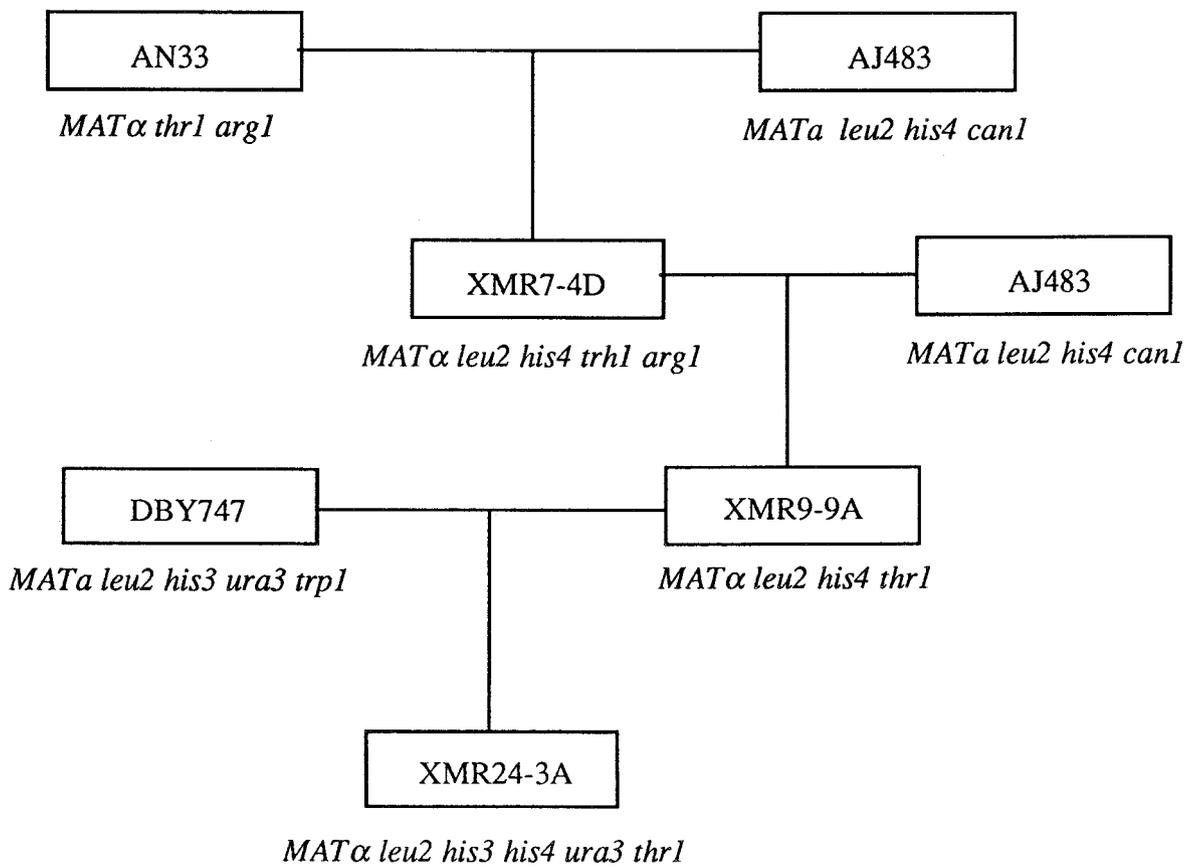


Figura 11 : Construcción de cepas transformables Thr1⁻.

2. Transformación y selección de transformantes

La cepa XMR9-9A se transformó con ADN de la genoteca anteriormente citada siguiendo el método de los protoplastos. La selección se realizó en dos pasos sucesivos: primero por crecimiento en medio mínimo (SD) con todos los requerimientos de la cepa excepto leucina, que es el marcador del vector, y, posteriormente, por crecimiento en medio mínimo con todos los requerimientos de la cepa excepto treonina.

La frecuencia de transformación con la genoteca fue de alrededor de 11000 transformantes $\text{Leu}^+ \cdot \mu\text{g}^{-1}$ de ADN; el 99% de los protoplastos resultaban ser viables. De 2000 colonias Leu^+ probadas, 4 resultaron ser también prototrofas para treonina. A estas cepas se les denominó TMR1-1 a TMR1-4.

3. Pérdida concomitante de marcadores y plásmidos

Con este experimento se trataba de corroborar que la prototrofia de treonina de los cuatro clones seleccionados se debía a la adquisición de un plásmido recombinante y no a la reversión espontánea de la mutación *thr1*. Para ello, se permitió que las cepas transformantes perdieran los plásmidos respectivos y se comprobó si dicha pérdida llevaba asociada la desaparición de la complementación de *thr1*. El experimento se llevó a cabo de forma similar a lo que se describe para el plásmido P1-AK4 (*HOM3*) excepto que se utilizaron cajas de medio mínimo (SD) con los requerimientos de la cepa menos leucina o menos treonina.

En todos los casos resultó que las colonias Leu^- , es decir, que habían perdido el plásmido, eran, además, Thr^- de lo que se deduce que los plásmidos recombinantes contienen un fragmento que complementa la mutación *thr1*; presumiblemente, el gen *THR1*. A éstos plásmidos se les denominó pMR1-1 a pMR1-4.

4. Caracterización de los plásmidos

Se procedió, en primer lugar, a determinar el tamaño de los plásmidos y a elaborar su mapa de restricción. Para ello, se extrajo ADN total de las cuatro cepas y con él se transformó *E. coli* DH5 α , seleccionando los transformantes por su resistencia a ampicilina. A continuación se realizaron "minipreparaciones" de ADN

de estos clones que se sometieron a digestiones simples y múltiples con diferentes enzimas de restricción. Los fragmentos resultantes se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% y se tiñeron con EtBr.

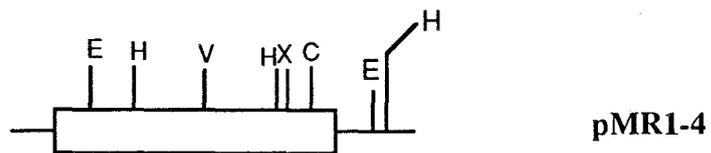
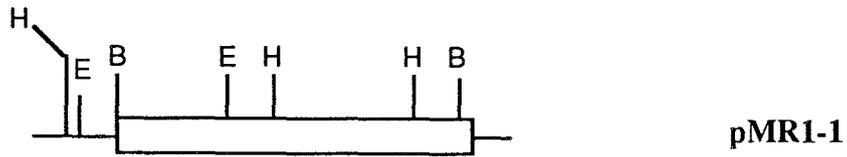
Los resultados mostraron que los insertos de los cuatro plásmidos aislados eran iguales dos a dos en tamaño: pMR1-1 y pMR1-2 tenían 4.5 kb mientras que pMR1-3 y pMR1-4 tenían 3.5 kb. La Figura 12 muestra que ambos tipos de plásmidos comparten una región común en la que podría estar contenido el gen *THR1*. A partir de aquí se decidió continuar el estudio con el plásmido pMR1-4 por tener el inserto pequeño.

ANALISIS GENETICO DEL GEN *THR1* CLONADO

Con este bloque de experimentos se trató de comprobar si el fragmento de ADN que complementa a la mutación *thr1* contiene, efectivamente el gen *THR1*. La estrategia seguida se basa en el hecho de que en levaduras, la integración de fragmentos de ADN en el genomio ocurre, mayoritariamente, por recombinación entre secuencias homólogas (Orr-Weaver *et al.*, 1981). Así, la integración del plásmido aislado en el *locus THR1* demostraría su homología con él, y, por tanto, su identidad. Con este fin, se subclonó el fragmento *HindIII* -*HindIII* en el vector integrativo YIp5 y el nuevo plásmido (pMR10) se introdujo en una cepa de levadura.

1. Subclonación en un plásmido integrativo

El proceso se detalla en la Figura 13. En primer lugar, se cortó el plásmido pMR1-4 con la endonucleasa de restricción *HindIII*. Esta digestión da lugar, entre otras, a una banda de 1.7 kb perteneciente al inserto procedente de la genoteca. Mediante el método "GeneClean" se aisló esta banda del gel de agarosa y se ligó al vector YIp5 previamente tratado con la misma enzima de restricción y con fosfatasa alcalina para evitar su recircularización. Se transformó la estirpe DH5 α de *E. coli* con la mezcla de ligación y se seleccionaron los transformates por su resistencia a ampicilina. A continuación se extrajo ADN plasmídico de estos clones bacterianos y se comprobó mediante análisis de restricción, que contenían el plásmido deseado. Al nuevo plásmido se le denominó pMR10.



1 kb

Figura 12: Mapa de restricción de los insertos que complementan *thr1* : pMR1-1 y pMR1-4 (Nótese que la orientación de los dos insertos es opuesta). E, *EcoRI*; H, *Hind III*; B, *BamHI*; C, *ClaI*; X, *Xba I* y V, *EcoRV* Inserto — YEp13

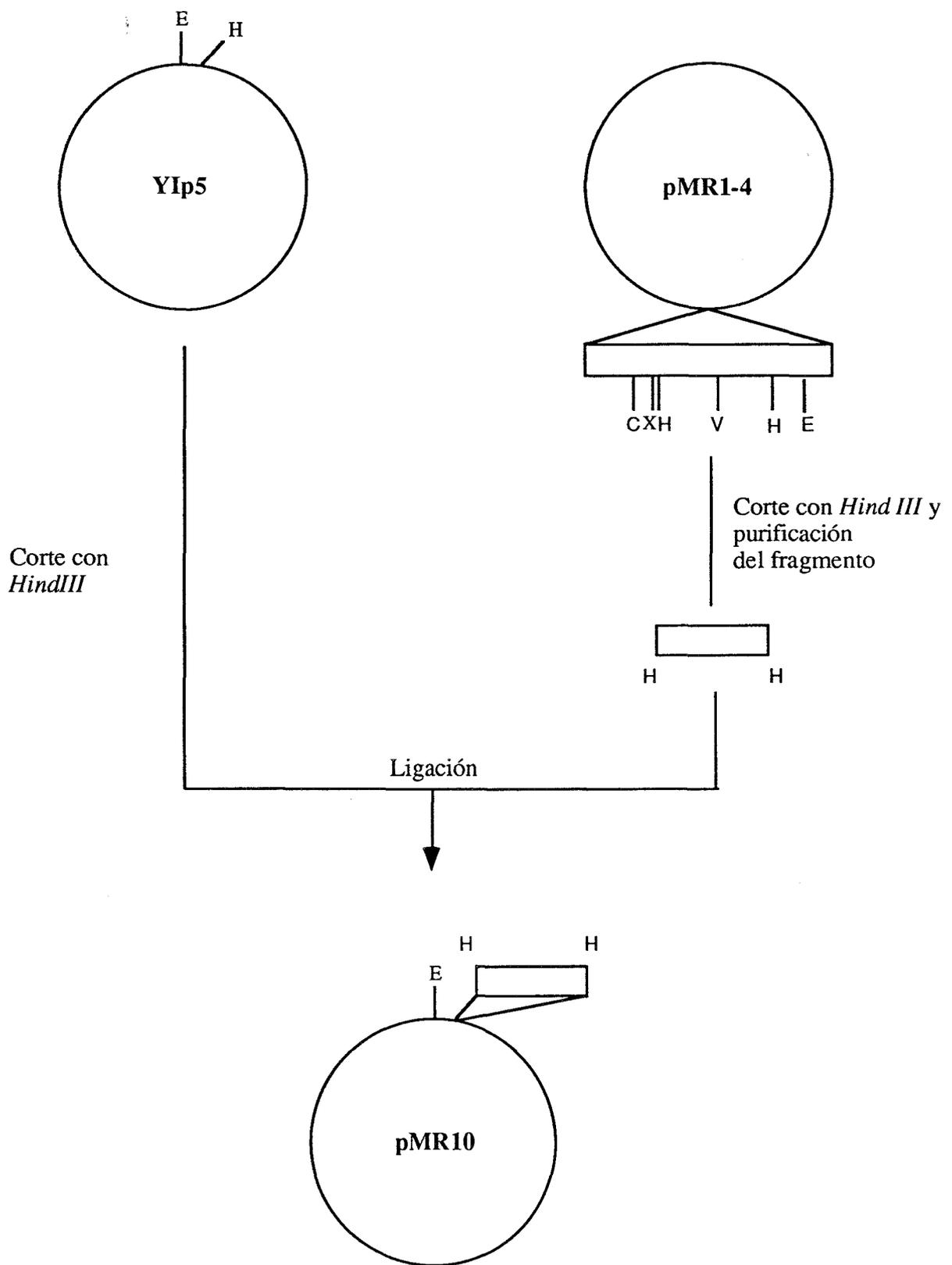


Figura 13: Obtención del plásmido pMR10 [YIp5-*THRI*]. E, *EcoRI*; H, *Hind III*; C, *Cla I*; X, *Xba I* y V, *EcoR V*.

2. Integración del gen *THR1* en el genomio

El vector YIp5 en el que se había construido el nuevo plásmido contiene el gen *URA3* como marcador seleccionable en levaduras. Se hacía, pues, necesario, obtener una cepa transformable con fenotipo *Ura3⁻ Thr1⁻*. Esto se llevó a cabo según se indica en la Figura 11, cruzando la cepa XMR9-9A (*Thr1⁻*) por la transformable DBY746. De entre los productos meióticos derivados del diploide, se seleccionó uno con el fenotipo deseado, al que se denominó XMR24-3A y que fue transformado con el plásmido pMR10.

La frecuencia de transformación con un plásmido integrativo de levaduras aumenta si éste se corta previamente con una enzima de restricción. Además y dado que los extremos de moléculas de ADN son altamente recombinogénicos, la integración ocurre preferentemente en *loci* homólogos al punto de corte (Hinnen *et al.*, 1978). Para dirigir la integración del plásmido pMR10 hacia el *locus THR1*, se probó si diversas enzimas como *AatII*, *BglIII*, *SacI*, *SphI* y *XhoI*, de las que se sabía que no cortaban al vector, tenían dianas en el inserto de 1.7 Kb. Como quiera que ninguna de ellas resultó apropiada para el fin que se perseguía, se decidió dirigir la integración mediante digestión parcial de pMR10 con *HindIII*. Se transformaron protoplastos de la cepa XMR24-3A con la mezcla de plásmidos cortados y se seleccionaron los transformantes *Ura⁺*. Los clones seleccionados resultaron ser también *Thr⁺* lo que indica que el fragmento *HindIII-HindIII* utilizado complementa la mutación *thr1*. Uno de ellos, al que se denominó TMR10 fue seleccionado para experimentos posteriores.

3. Análisis de ligamiento entre los marcadores *URA3* y *THR1*

Para comprobar si la integración había tenido lugar en el *locus THR1* del genomio, se llevó a cabo el análisis genético de la cepa transformante TMR10. Para ello, se cruzó con la cepa MMY1 y se realizó un análisis de las tétradas derivadas del diploide. Se esperaba:

- que el marcador *THR1* segregara 4+: 0-, ya que ambos parentales eran *Thr1⁺*;
- que el resto de los marcadores segregaran 2+:2-;

Tabla VIII. Análisis genético del cruzamiento XMR30.

TMR10 X **MMY1**
MAT α leu2 his3 ylo his4 thr1 ura3 *MAT α ura3 cyh^R*
[THR1 URA3]

XMR30

SEGREGACION

| MARCADORES | DP | DR | T |
|-----------------|----|----|----|
| <i>MAT- LEU</i> | 9 | 0 | 14 |
| <i>MAT- URA</i> | 5 | 3 | 15 |
| <i>LEU- URA</i> | 7 | 7 | 9 |
| <i>THR- URA</i> | 23 | 0 | 0 |

- que al analizar los marcadores *THR* y *URA*, sólo se encontraran "Ditipos Parentales", lo que indicaría que en esta cepa están ligados (*THR1* y *URA3* se encuentran normalmente en los cromosomas VIII y V, respectivamente) (Mortimer y Schild, 1980).

Los resultados del análisis de 23 tétradas completas mostraban que, efectivamente, los marcadores *MAT*, *LEU* y *URA* segregaban 2+:2-; el marcador *THR* segregaba 4+:0- y el marcador *HIS* segregaba 2+:2- en 11 tétradas, 3+:1- en 9 tétradas y 4+:0- en 3 tétradas, lo que hace pensar que en el cruzamiento intervienen más de un gen con dos alelos. La Tabla VIII recoge el análisis de ligamiento entre los marcadores estudiados. Estos resultados demuestran que la integración había tenido lugar en el *locus THR1*. De ello inferimos que, efectivamente, se ha clonado el gen *THR1*.

CARACTERIZACION DE LAS CEPAS CON *THR1* AMPLIFICADO

Con el fin de determinar el efecto que tiene en una célula la presencia de un alto número de copias del alelo *THR1*, se llevaron a cabo los siguientes análisis bioquímicos.

1. Medida de la actividad homoserina quinasa

Se trató de medir la actividad homoserina quinasa, producto del gen *THR1*, en extractos de la cepa TMR1-4, portadora del gen *THR1* en alto número de copias, y, como control, en la cepa sin transformar XMR9-9A y en la silvestre S288C. También como control, se midió la actividad aspartato quinasa. La purificación parcial y el ensayo de las enzimas se llevó a cabo a partir de células cultivadas en distintos medios, según se recoge en la Tabla IX:

-SD+Leu+His+Thr, por ser los requeridos por XMR9-9A

-SD+His, por ser el único requerimiento de TMR1-4

-SD+Ade+Leu+His, con el fin de comparar los resultados con los obtenidos con las cepas que portan los alelos *HOM3* y *HOM3-R2* en alto número de copias, descritas anteriormente.

De los resultados se concluye que, como era previsible, la cepa portadora del plásmido multicopia presenta una actividad homoserina quinasa alrededor de 20-40 veces mayor que la de la cepa silvestre. Como era de esperar, la actividad aspartato

quinasa de las cepas con y sin el plásmido son, similares y del mismo orden de magnitud que la de la cepa silvestre.

2. Acumulación y excreción de treonina

Dado que el paso catalizado por la homoserina quinasa constituye uno de los puntos de regulación de la ruta, se trató de determinar si la simple presencia en la célula de una mayor actividad homoserina quinasa redundaba en una mayor acumulación de treonina.

En primer lugar, se sometió al transformante TMR1-4 a la prueba de alimentación cruzada descrita en Métodos. Como controles se utilizaron las cepas MMY1 e YAHV2-26D, esta última superproductora y excretora de treonina (Ramos, 1990). Tras siete días de incubación a 30°C, no se encontraron "halos de excreción" alrededor de la cepa TMR1-4.

Para cuantificar este resultado, se midió mediante HPLC la cantidad de este aminoácido que acumula la cepa TMR1-4. Como control, se utilizó la cepa silvestre. Los resultados (Tabla VI) muestran que, al menos en las condiciones de cultivo utilizadas, la cepa transformante acumula aproximadamente la misma cantidad de treonina que la cepa silvestre.

3. Influencia de distintos aminoácidos de la ruta en la acumulación de treonina

Según se ha mencionado, algunos aminoácidos de la ruta de biosíntesis de la treonina inhiben ciertas enzimas de la misma. Sin embargo, la regulación de esta ruta se ejerce no sólo a nivel de actividad enzimática, sino también a nivel de síntesis de las enzimas (Jones y Fink, 1982). La falta de diferencia significativa en la acumulación de treonina por la cepa TMR1-4, respecto a la silvestre, podría deberse a que, efectivamente, se acumule pero que llegado un nivel, la propia treonina haga que se inhiba la actividad homoserina quinasa y/o se reprima la síntesis de esta enzima. Con el fin de probar esta hipótesis, se llevaron a cabo los siguientes experimentos. Adicionalmente, se estudió el efecto de esos mismos aminoácidos sobre la actividad aspartato quinasa.

Se utilizó la cepa TMR1-4, portadora del gen *THRI* en alto número de copias, cultivada en medio mínimo (SD) que contenía Ade, Leu e His, al que se añadía

Tabla IX. Actividades específicas aspartato quinasa (AK) y homoserina quinasa (HSK) de la cepa XMR9-9A, la misma cepa con el gen *THR1* en alto número de copias (TMR1-4) y la cepa silvestre S288C, cultivadas en medio mínimo (SD) con distintos aminoácidos.

| CEPA | aas en el medio de cultivo | ACTIVIDAD (mU · mg ⁻¹ prot. · ml ⁻¹) | |
|---------------------------|-------------------------------|---|------|
| | | AK | HSK |
| XMR9-9A | Leu His Thr | 243 | 0 |
| TMR1-4 [<i>THR1</i>] | His | 141 | 4510 |
| | Ade Leu His | 294 | 2200 |
| | | | |
| S288C | Ade Leu His | 114 | 75 |

treonina, homoserina o metionina a una concentración final de 2mM. Los extractos se prepararon como se describe anteriormente para la medida de las actividades enzimáticas. Paralelamente se obtuvieron muestras para determinar, mediante HPLC, la acumulación de aminoácidos .

Los resultados obtenidos (Tabla X) muestran que la actividad aspartato quinasa se reprime en un 90% por los productos finales, treonina y metionina. La homoserina también reprime la síntesis de esta enzima en un 30% aproximadamente. La homoserina quinasa se reprime en un 45% por treonina, y en un 30% por metionina. Por el contrario, su sustrato específico, la homoserina, la induce al doble. La Tabla X también muestra que la acumulación de aminoácidos es distinta en los distintos medios.

AMPLIFICACION DEL GEN *THRI* EN UNA CEPA *HOM3-R2*

Como ya se ha mencionado anteriormente, la cepa YAHV2-26D es portadora del alelo *HOM3-R2* y, como consecuencia, superproduce treonina. Según la prueba de alimentación cruzada, esta cepa presenta "halo" de excreción a los cuatro días de incubación a 30°C. En los cruzamientos diseñados para obtener cepas Hom3-R transformables (ver Figura 8), el carácter "excretor de treonina" segregaba siempre 2+:2-. Sin embargo, el tiempo que había que incubar cada cepa para observar el halo no era siempre el mismo. Así, las cepas XMR27-1C y XMR27-5B, ambas poseedoras del alelo *HOM3-R2* y utilizadas en los experimentos para rescatarlo, requerían 4 y 7 días de incubación, respectivamente.

Con el fin de determinar si estas cepas presentan también diferencias en la producción de treonina, se determinó, mediante HPLC, la cantidad de aminoácidos relacionados con la ruta de la treonina que éstas acumulan. Las células se cultivaron en medio mínimo (SD) con los requerimientos de ambas cepas (Leu, His, Trp y Ura).

La Tabla XI resume los resultados obtenidos y muestra que, efectivamente, acumulan distinta cantidad de treonina. Las cantidades acumuladas son congruentes con los tiempos de excreción. Sin embargo y sorprendentemente, las dos cepas parecen excretar la misma cantidad de treonina al medio de cultivo. Nótese que las cantidades de homoserina acumuladas también son distintas, pero que, en este caso, es la XMR27-5B la que más acumula.

Tabla X. Actividades específicas aspartato quinasa (AK) y homoserina quinasa (HSK) de la cepa transformante TMR1-4, cultivada en medio mínimo (SD) con Ade (0.16mM), Leu (0.3mM) e His (0.1mM), al que se añadía distintos aminoácidos (2mM); y concentración interna de aminoácidos en las mismas condiciones. Entre paréntesis se indica la proporción de actividad respecto de la encontrada en la misma cepa cultivada en medio mínimo (SD) con Ade, Leu e His.

| Aminoácido | ACTIVIDAD (mU · mg ⁻¹ prot. · ml ⁻¹) | | CONCENTRACION INTERNA (μmoles · mg ⁻¹ prot.) | | | |
|------------|--|----------------|--|------|------|------|
| | AK | HSK | Hom | Thr | Met | Ile |
| - | 294 (1) | 2200 (1) | 6.37 | 0.29 | 0.02 | 0.01 |
| Hom | 207 (0.71) | 4527 (2.1) | 1.55 | 5.37 | 0.03 | 0.09 |
| Thr | 27 (0.09) | 1217 (0.55) | 0.45 | 4.26 | 0.03 | 0.37 |
| Met | 32 (0.11) | 1540 (0.70) | 1.56 | 0.45 | 2.41 | 0.12 |

1. Transformación y selección de los transformantes

Según se mencionó anteriormente la amplificación del gen *THR1* no parece inducir la acumulación de treonina, al menos en un fondo genético *HOM3* silvestre. Sin embargo, sería posible pensar que, en un fondo genético en el que se elimine el principal responsable de la regulación de la ruta, la inhibición de la aspartato quinasa, la homoserina quinasa se erigiera como el principal control de la producción de teonina. El hecho de que la cepa XMR27-5B superproduzca homoserina iría a favor de esta hipótesis.

Con la siguiente serie de experimentos se trató de estudiar el efecto de un alto número de copias del gen de la homoserina quinasa en un fondo genético *Hom3-R2*. Dado que las cepas XMR27-1C y XMR27-5B superproducen treonina y homoserina respectivamente, se esperaba que esa diferencia pudiera ser debida en parte al gen *THR1*. Las cepas XMR27-1C y XMR27-5B, se transformaron con el plásmido pMR1-4 según el método del acetato de litio. Los transformantes se seleccionaron en medio mínimo completo (SC) sin leucina, que es el marcador del vector y se comprobó que la pérdida del fenotipo Leu^+ estaba asociada a la pérdida de dicho plásmido. A los transformantes se les denominó TMR1-41C y TMR1-45B, respectivamente.

2. Caracterización de los transformantes

Se midió mediante HPLC la cantidad de aminoácidos que acumulan y excretan las cepas transformantes TMR1-41C y TMR1-45B. Las células se cultivaron en medio mínimo (SD) con los requerimientos de las cepas (His, Trp y Ura). Como control, se utilizaron las cepas sin transformar, XMR27-1C y XMR27-5B respectivamente, cultivadas en el mismo medio al que se añadió, además, leucina.

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla XI. La cepa TMR1-41C presenta aproximadamente la misma cantidad de treonina que la cepa sin transformar, XMR27-1C, mientras que el transformante TMR1-45B produce 4 veces más treonina que XMR27-5B, probablemente a expensas de la homoserina que acumula la cepa sin transformar.



Tabla XI. Concentración interna ($\mu\text{moles} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína) y externa (mM) de aminoácidos de dos cepas Hom3-R2 (XMR27-1C y XMR27-5B) y sus respectivas derivadas (TMR1-41C y TMR1-45B) que contienen el gen *THR1* en alto número de copias, cultivadas en medio mínimo (SD) con His, Trp y Ura al que se añadía Leu en el caso de las cepas sin transformar.

| CEPA | Aminoácido | CONCENTRACION | |
|-----------------------------|------------|---------------|---------|
| | | Interna | Externa |
| XMR27-1C | Hom | 3.64 | 0.06 |
| | Thr | 4.13 | 0.06 |
| | Met | nd | nd |
| | Ile | 0.51 | nd |
| TMR1-41C [<i>THR1</i>] | Hom | 0.71 | 0.03 |
| | Thr | 2.50 | 0.05 |
| | Met | 0.04 | 0.001 |
| | Ile | 0.32 | nd |
| XMR27-5B | Hom | 15.4 | 0.09 |
| | Thr | 0.32 | 0.05 |
| | Met | 0.07 | 0.05 |
| | Ile | 0.31 | nd |
| TMR1-45B [<i>THR1</i>] | Hom | 1.00 | 0.32 |
| | Thr | 1.27 | nd |
| | Met | 0.31 | 0.01 |
| | Ile | 0.61 | nd |

(nd = no detectable; < 0.001)

DISCUSSION

El objetivo de esta Tesis ha sido la amplificación de algunos genes estructurales de la ruta de síntesis de treonina en *S. cerevisiae* que están sujetos a regulación, con el fin de estudiar si esta amplificación implica la superproducción de este aminoácido. Para ello ha sido preciso, en algunos casos, aislar previamente los alelos silvestres o mutantes de interés y, en todos los casos, construir cepas con distintos fondos genéticos que contuviesen un número alto de copias de dichos alelos. En este apartado de la Tesis se van a comentar en primer lugar los resultados obtenidos durante la clonación y la construcción de dichas cepas y, en segundo lugar, se comparará la producción de aminoácidos por las distintas construcciones, en distintas condiciones de cultivo.

CLONACION DE GENES Y OBTENCION DE CEPAS CON GENES AMPLIFICADOS

AMPLIFICACION DEL ALELO SILVESTRE *HOM3*

EL primer paso de la ruta común de síntesis de metionina y treonina está catalizado por la aspartato quinasa y es un paso clave en la regulación de esta ruta metabólica (Jones y Fink, 1982; Ramos *et al.*, 1991). El gen *HOM3*, que determina esta enzima, fue aislado a partir de una genoteca genómica de *S. cerevisiae* en el vector multicopia YEp24 por Rafalski y Falco (1988). Estos autores publicaron la secuencia nucleotídica del gen y la compararon con las tres aspartato quinetas de *E. coli*. La enzima de levaduras se parece a los tres isoenzimas bacterianos. Posteriormente, estos mismos autores han hecho pública una modificación a esta secuencia (Rafalski y Falco, 1990), que consiste en la inserción de un par GC en la posición 1536 de la región codificante de este gen, lo que extiende ésta unas 336pb, dando lugar, por tanto, a una proteína con 112 aminoácidos más. Todas las consideraciones que se hacen al comparar la aspartato quinasa de levaduras con las de *E. coli*, no podrían ser asumidas a partir de esta modificación .

Como se indica en Resultados, una cepa de levaduras con un alto número de copias del alelo silvestre *HOM3* (cepa TMR3-1), presenta una actividad específica aspartato quinasa alrededor de 10 veces la de la cepa silvestre y es capaz de producir unas 10 veces más treonina que dicha cepa (Tabla VI). Sin embargo, la cepa transformante, sometida a la prueba de alimentación cruzada de una mutante Thr⁻, no presentaba "halo de excreción".

En la literatura se ha descrito que la excreción de aminoácidos al medio es una consecuencia directa de la superproducción de los mismos. Según este criterio se han podido seleccionar mutantes de levaduras superproductores de treonina por su fenotipo "excretor" (Delgado *et al.*, 1982; Ramos y Calderón, enviado) demostrándose posteriormente que, en efecto, estos mutantes acumulaban internamente gran cantidad de este aminoácido. Así pues, excreción parece implicar superproducción, pero superproducción no necesariamente implica excreción.

Delgado *et al.* (1982) describieron la existencia de al menos dos genes, TEX1 y TEX2, implicados en la excreción de treonina, aunque sus productos aún no han sido identificados. La presencia de al menos uno de sus alelos mutantes, *tex1-1* ó *tex2-1*, en un fondo superproductor, permitirían la excreción. Según esta premisa, la cepa TMR3-1 no poseería ninguno de los alelos que confieren excreción. En los cruzamientos realizados en esta Tesis se ha podido comprobar que las cepas utilizadas son genéticamente heterogéneas en cuanto a los determinantes de la excreción, de modo que, en algunos casos, se generaban combinaciones alélicas que permitían o no la excreción. Otros autores han obtenido resultados similares (C. Ramos, comunicación personal). En consecuencia, y a pesar de que no se ha investigado más profundamente este fenómeno, siempre que se construía una cepa presuntamente superproductora, se probaba la excreción de treonina por la misma.

Adicionalmente, el fenotipo "no excretor" de la cepa TMR3-1 podría explicarse porque la cantidad de treonina que ésta produce no sea suficiente para alimentar a la cepa auxótrofa para este aminoácido utilizada como testigo.

AMPLIFICACION DEL ALELO MUTANTE *HOM3-R2*

HOM3-R2 es un alelo mutante que determina una aspartato quinasa insensible a inhibición por treonina (Ramos, 1990). Las cepas de levaduras portadoras de este alelo superproducen treonina, homoserina e isoleucina y son excretoras de treonina. En principio, estas cepas fueron aisladas, tras mutagénesis con nitrosoguanidina, por su capacidad de resistir a hidroxinorvalina, un análogo tóxico de la treonina. Estos mutantes son capaces de acumular unas 30 veces más treonina, y 15 veces más homoserina que una cepa silvestre (Ramos y Calderón, enviado). Así pues, desde el punto de vista de producción de treonina, es mucho más efectivo que las células de levaduras posean una copia de la aspartato quinasa desregulada, que un alto número de copias de la enzima silvestre. Quedaba por

demostrar si una cepa de levaduras con un alto número de copias del alelo mutante producía aún más treonina. Para ello, a lo largo de esta Tesis se planteó el aislamiento del alelo mutante *HOM3-R2*, su caracterización preliminar y su amplificación.

Clonación mediante polimerización en cadena

La polimerización en cadena es un método muy útil para la clonación *in vitro* de fragmentos de ADN. Con él se puede amplificar selectivamente una molécula de ADN molde varios millones de veces en pocas horas. Esta herramienta de trabajo está resultando ser muy útil tanto en Ciencia básica, como en campos aplicados como son la Medicina Legal o la Arqueología (White et al., 1989). Para la clonación del alelo mutante *HOM3-R2* parecía obvio seguir este método. Sin embargo, y pese a los esfuerzos realizados en este sentido, no ha sido posible llevar a cabo el aislamiento de dicho alelo mediante PCR.

Debido a las complejas interacciones que se pueden dar entre los componentes en la reacción de amplificación, especialmente el ADN molde y los cebadores, resulta imprescindible poner a punto las condiciones de la reacción para obtener los mejores resultados. En este sentido, el parámetro más importante a tener en cuenta es la elección de los cebadores apropiados, además de la temperatura y duración de los ciclos de disociación, hibridación de moléculas y síntesis de ADN que son críticos para obtener resultados satisfactorios.

En este caso, conocida la secuencia del alelo silvestre *HOM3* se pudo llevar a cabo la selección de cebadores específicos para la amplificación del alelo mutante. Aunque dicha selección es más bien una cuestión empírica, es conveniente tener en cuenta algunos consejos prácticos, como son que el contenido en pares GC sea aproximadamente del 50%, que la distribución de bases sea tal que se evite la formación de estructuras secundarias, y que no contengan secuencias complementarias, especialmente en los extremos 3' (Saiki, 1989). Los cebadores utilizados para la reacción de PCR en esta Tesis se sintetizaron utilizando la secuencia de nucleótidos de *HOM3* publicada por Rafalski y Falco (1988). El cebador 1246 posee la diana de restricción de *BamHI*, presente en la secuencia de *HOM3*, mientras que al cebador 1247 se le añadió el hexanucleótido correspondiente a la diana de restricción para la enzima *SalI* (Figura 5). El fragmento de ADN de *HOM3* flanqueado por los cebadores 1246 y 1247 tiene un

tamaño aproximado de 1.9 kb. Este fragmento debía contener la región codificante completa del gen de la aspartato quinasa. Como se cita anteriormente, se ha publicado una modificación a esta secuencia (Rafalski y Falco, 1990). Afortunadamente, esto no afecta a ninguna diana de restricción de las utilizadas para el rescate del alelo *HOM3-R2*, pero sí al diseño de los experimentos realizados para la amplificación *in vitro* de dicho alelo. La modificación supone que el fragmento flanqueado por los cebadores 1246 y 1247, ahora, no incluye la región codificante de *HOM3* completa y, por tanto, aunque se hubiese conseguido su clonación, el fragmento no contendría un alelo completo. No obstante, como se ha mencionado en Resultados, el método fracasó en un paso anterior. El hecho de poder digerir los fragmentos resultantes de la PCR con las enzimas *BamHI* y *Sall*, facilita su posterior clonación, ya que la mayoría de los vectores utilizados en levaduras tienen dianas únicas para *BamHI* (GGATCC) y *Sall* (GTCGAC) en el gen de resistencia a tetraciclina del fragmento de pBR322. En el diseño de los cebadores se añadieron dos pares GC terminales, que servirían de diana a las endonucleasas de restricción. No se puede descartar el que estas secuencias sean insuficientes para una correcta digestión.

La disociación del ADN se llevó a cabo a 94°C, durante 1 minuto. A continuación se permitía la complementación e hibridación de las moléculas de ADN, incubándose durante 1 minuto a 55°C. La especificidad de la reacción aumenta cuando la temperatura de hibridación es alta y el tiempo corto de modo que, por ejemplo, 1 minuto por cada kilobase resulta excesivo. De esta forma se evitan uniones inespecíficas que darían lugar a la amplificación de fragmentos distintos al que se desea (Saiki, 1989). En este caso parecía apropiado 1 minuto de reacción a la temperatura citada.

La síntesis de ADN se llevó a cabo a 72°C durante 6 minutos. Cuando los fragmentos que se desean sintetizar son menores de 150 pb, este paso puede suprimirse; sin embargo, sí es crítico cuando se trata de fragmentos mayores (Saiki, 1989). En experimentos preliminares se probaron ciclos de menos de 6 minutos, encontrándose que, en efecto, se amplificaban fragmentos de diversos tamaños, pero todos ellos menores de 1.9 kb.

En total, se realizaron 30 ciclos de los descritos pero fue necesario realizar un ciclo inicial, donde el tiempo de disociación de las moléculas de ADN era de 5 minutos. Sin este ciclo previo, no se detectaba amplificación distinta a la del testigo, que contenía sólo los cebadores. Una explicación posible podría ser que las

moléculas de ADN molde tuvieran un tamaño excesivo (alrededor de 20kb) para su disociación completa en el tiempo establecido, según el método de extracción de ADN utilizado.

Una vez obtenidos los productos de PCR, siguiendo la reacción descrita en Métodos, se procedió a su clonación. Sin embargo, no fue posible obtener plásmidos recombinantes que contuviesen como insertos dichos productos amplificados. Como se discute brevemente en Resultados, existen varias explicaciones que pueden ayudar a entender los resultados obtenidos. Una de ellas podría ser el diseño de los cebadores, como se cita anteriormente. Otra, el método de purificación de ADN que se utilizó tras la digestión. Los hexanucleótidos que se liberan al cortar los productos de PCR con las enzimas de restricción, podrían no haber sido eliminados, quedando presentes en la mezcla de ligación. Por tanto, se esperaría que en dicha mezcla, las moléculas contaminantes interfirieran con el inserto y se ligaran al vector. Así, los plásmidos recombinantes seleccionados podrían seguir manteniendo las dianas de restricción para *BamHI* y *Sall*, y se explicaría el alto número de transformantes bacterianos obtenidos con la mezcla de ligación, respecto del control con el vector autoligado.

Se menciona también la posibilidad de que dicho alelo mutante de levaduras se exprese en *E. coli* y sea lesivo para las células bacterianas. Se esperaría entonces que, en la población prevaleciesen las células transformantes que eliminan el inserto del plásmido. La superproducción de treonina provoca cierta morbilidad en las células de levaduras. De hecho, cuando se cultivan cepas superproductoras en medio mínimo (SD) con los requerimientos de la cepa, el cultivo se estaciona a una D.O._{660nm} aproximada de 0.5, que para una cepa silvestre implica estar aún en plena fase exponencial. Este efecto parece revertirse con la adición de valina al medio de cultivo (datos no mostrados). En resumen, las cepas de levaduras que superproducen treonina parecen requerir valina. Esto puede tener sentido si la acumulación de treonina produjera un exceso de α -cetobutirato, como producto de la reacción de la treonina deaminasa, y éste compitiera con el α -cetoisovalerato provocando "hambre" de valina en un momento dado de su crecimiento. El α -cetoisovalerato se convierte en valina por una transaminasa, además de constituir el punto de partida para la síntesis de leucina en levaduras (Jones y Fink, 1982). Está descrito que la transaminasa de los aminoácidos de cadena ramificada es capaz de utilizar *in vitro* el α -cetobutirato como sustrato en *Salmonella* (Van Dyk y LaRossa, 1988). Si el alelo mutante *HOM3-R2* se expresase en *E. coli* y produjera

acumulación de treonina, tal vez podría resultar "tóxico" para la propia célula mantener el plásmido. Esto podría explicar la dificultad de aislar los plásmidos recombinantes.

Rescate del alelo *HOM3-R2* del genomio

La clonación del alelo *HOM3-R2* de *S. cerevisiae* se ha llevado a cabo mediante el método de rescate basado en la reparación de huecos en el ADN usando un plásmido replicativo (Orr-Weaver y Szostak, 1983). Los plásmidos a los que se les ha creado una delección en una zona de homología con el cromosoma, son generalmente reparados por la maquinaria de recombinación homóloga de la levadura, tomando como molde la copia existente en el cromosoma (Orr-Weaver *et al.*, 1981). La ventaja de utilizar un plásmido replicativo reside en que, una vez reparado, el plásmido autónomo puede recuperarse de la levadura extrayendo ADN y amplificándolo en bacterias directamente. (Orr-Weaver *et al.*, 1983). La frecuencia de integración de estos plásmidos replicativos (tipo YRp) es menor del 1% cuando se transforma con los plásmidos circulares. Sin embargo, la transformación con los plásmidos cortados con una enzima de restricción aumenta su frecuencia de integración hasta un 50% (Orr-Weaver *et al.*, 1983). En este caso, se ha utilizado un plásmido replicativo derivado del YRp17 que lleva el alelo *HOM3* silvestre. A partir de este plásmido se ha construido el alelo nulo *hom3-Δ1* mediante delección del fragmento interno *KpnI-KpnI*, de 1.2 kb de longitud (Figura 10). Para el rescate se ha utilizado el plásmido pMR301, que contiene este alelo, cortado con las enzimas *KpnI* y *BfrI*. Esta molécula lineal posee aproximadamente 300 pb de homología con el extremo 5' de la región no codificante del gen *HOM3* y 800 pb de homología con el extremo 3', que contiene aún unas 220 pb de la región codificante del gen (según la secuencia publicada por Rafalski y Falco, 1990).

Con este plásmido se transformó una cepa de levaduras *Hom3-R* y *Ura3⁻*. La selección de los transformantes se llevó a cabo mediante complementación de la mutación *ura3*, siendo *URA3* el marcador del vector. Posteriormente, se comprobó que en el 50 % de los transformantes, el plásmido permanece autónomo y se pierde con una alta frecuencia (98%; datos no mostrados). Sin embargo, la recuperación del plásmido autónomo no fue fácil: en sólo dos casos pudo amplificarse el plásmido en *E. coli* y en ninguno de los dos casos el plásmido tenía el tamaño esperado. Está descrito, que los vectores tipo YRp son muy inestables, de hecho se mantienen sólo

en un 30 % de las células incluso en condiciones de presión selectiva a pesar de que el número de copias por célula es alto (de 20-80 copias por célula) (Kingsman *et al.*, 1991). Esto podría implicar que sólo una pequeña proporción del ADN de los transformantes sea plásmido y que, en consecuencia, la transformación de *E. coli* sea poco eficiente.

Otro factor puede también haber influido en este resultado. Como ya se cita con anterioridad, las células de levaduras que acumulan treonina presentan cierta morbilidad. Si el alelo *HOM3-R2*, que produce acumulación de treonina, resultara "tóxico" en un número alto de copias, sería desventajoso para la célula mantenerlo. En este caso, tal vez se verían favorecidas las células que portaran un número de copias del plásmido más bajo, o incluso, aquellas que lo tuviesen integrado. En consecuencia, la proporción de ADN plasmídico total de las levaduras transformantes sería mínimo.

El alelo mutante fue rescatado a partir de los transformantes de levaduras que mantenían el plásmido de forma integrada. En principio se comprobó que estos transformantes no perdían el marcador *URA3*. Después de extraer ADN genómico, éste fue digerido con enzimas de restricción que tienen dianas en los extremos del gen *HOM3* y ligado nuevamente para seleccionar dichos plásmidos en *E. coli*. Los plásmidos así obtenidos se utilizaron para transformar levaduras y comprobar que complementaban la mutación *hom3*. Sólo se obtuvo un plásmido con estas características. El hecho de complementar la mutación *hom3* indica que el plásmido original había sido reparado, recuperándose el fragmento de aproximadamente 1460pb que se había eliminado.

Con el fin de demostrar que el alelo rescatado contiene la mutación que hace a la aspartato quinasa insensible a retroinhibición por treonina, se ha determinado la actividad aspartato quinasa de la cepa transformante que portaba el presunto alelo *HOM3-R2* y de la que lleva el alelo silvestre *HOM3*, y su inhibición por 20mM de treonina. Según se muestra en la Tabla VII, la actividad aspartato quinasa silvestre se inhibe en un 95%, mientras la mutante no es sensible a esta inhibición. Este resultado indica que, efectivamente, se ha clonado el alelo mutante. Es más, el resultado implica que la mutación está en el fragmento que fué delecionado en el plásmido pMR301. Sin embargo, se encuentra que la actividad específica de la enzima mutante representa aproximadamente el 10% de la silvestre. Estos datos concuerdan con los de Ramos (1990), que encuentra que la actividad aspartato quinasa de los mutantes resistentes a hidroxinorvalina es, en muchos casos, menor

a la de la cepa silvestre (alrededor del 20%), y con los de Seibold *et al.*(1981), que describen una actividad específica en los mutantes *BORI*, purificada parcialmente de manera similar a la descrita por Ramos *et al.* (1991), aproximadamente de la mitad de la que se obtenía a partir de la cepa parental. Este hecho podría deberse a que la estabilidad de la enzima mutante fuese menor y se estuviera perdiendo gran parte durante el proceso de purificación.

Existe otra explicación alternativa o complementaria a estos resultados: la aspartato quinasa de *S. cerevisiae* muestra una típica cinética de saturación Michaelis-Menten con una K_m para el L-Asp alrededor de 4 mM (Ramos *et al.*, 1991). La constante de inhibición (K_i) de la L-thr descrita por estos autores es de alrededor de 3 mM. La actividad aspartato quinasa mutante, parece perder afinidad no sólo por el inhibidor, la L-thr, sino también por el sustrato L-asp (E. Martínez-Force, comunicación personal). Esto supondría que probablemente la enzima mutante haya sufrido un cambio conformacional cerca del sitio de unión del sustrato e inhibidor. En consecuencia, la actividad específica que se recupera de la célula es menor.

La búsqueda de mutantes resistentes a hidroxinorvalina es una estrategia efectiva para aislar cepas superproductoras de treonina en *S. cerevisiae* (Ramos y Calderón, enviado). En bacterias, la inhibición del crecimiento producida por este análogo tóxico se contrarresta por la adición al medio de cultivo de aminoácidos relacionados con la ruta de síntesis de treonina (Cohen *et al.*, 1965a). En levaduras este efecto no sólo se contrarresta con aminoácidos relacionados con la ruta de treonina (Ramos, 1990). Dado que la hidroxinorvalina y la treonina entran en la célula de levaduras, mayoritariamente, por la Permeasa General de Aminoácidos (GAP) (Martín-Rendón *et al.*, en preparación), muchos de estos aminoácidos podrían competir con la hidroxinorvalina para entrar en la célula.

Dado que el efecto tóxico de este análogo de treonina se ve enmascarado por la presencia de diversos aminoácidos en el medio de cultivo, es conveniente determinar la resistencia o sensibilidad de una cepa al análogo en medio que no contenga aminoácidos. La cepa transformante que porta el alelo mutante *HOM3-R2* posee marcadores de auxotrofia, que son necesarios para la selección de los plásmidos. Como el alelo *HOM3-R2* es dominante en heterocigosis (Ramos, 1990), se decidió construir un diploide donde se complementasen dichas auxotrofías y probar la resistencia a hidroxinorvalina del mismo. Como se describe en Resultados, este diploide no es resistente a hidroxinorvalina, al menos no al nivel

que lo era el mutante original. Estos mutantes fueron obtenidos tras mutagénesis con nitrosoguanidina y sometidos a una fuerte presión selectiva, en la que se exigía no sólo resistencia a una concentración considerable de hidroxinorvalina (10mM), sino también que produjesen una gran cantidad de treonina y que ésta fuese excretada al medio (Ramos, 1990). Esta selección tan estricta podría llevar a que los mutantes aislados fueran portadores de más de una mutación, una de las cuales debe ser precisamente la que da lugar a una aspartato quinasa insensible a retroinhibición por treonina. Según esta hipótesis, los cruzamientos que se lleven a cabo con las cepas AHV^R originales podrían conducir a la destrucción de las combinaciones alélicas originales, lo que podría incidir en la pérdida del grado de resistencia a hidroxinorvalina y de producción de treonina propios de estas cepas.

Una de esas mutaciones adicionales podría ser una treonil-ARN_t-sintetasa. En levaduras se ha descrito el aislamiento de mutantes en los genes estructurales de la leucil-ARN_t-sintetasa (Hartwell y Mclaughlin, 1968), metionil-ARN_t-sintetasa (Mclaughlin y Hartwell, 1969) y la treonil-ARN_t-sintetasa (Nass y Poralla, 1976). Los mutantes en la treonil-ARN_t-sintetasa fueron aislados como resistentes a borrelidina, un antibiótico macrólido que actúa como inhibidor de dicha enzima, tanto en procariotas como en eucariotas; y cuyo efecto puede revertirse con la adición de treonina u homoserina al medio (Poralla, 1975). Nass y Poralla (1976) han descrito que la actividad treonil-ARN_t-sintetasa de estos mutantes se ve reducida a un tercio en comparación con la de la enzima silvestre, aunque mantiene la K_m para la treonina. Estos autores proponen que, mutaciones que lleven a una elevada acumulación interna de treonina, harían a la célula resistente a borrelidina. De hecho, los mutantes superproductores seleccionados como resistentes a hidroxinorvalina, también lo son a borrelidina (Ramos y Calderón, enviado).

Si el mecanismo de resistencia a hidroxinorvalina fuese similar al de resistencia a borrelidina, quizás podría explicarse por qué una cepa que porta el alelo *HOM3-R2*, cuya aspartato quinasa es insensible a inhibición por treonina, no es resistente a hidroxinorvalina (al menos a las concentraciones de 1, 5 y 10mM). Todo parece apuntar a que la inhibición ejercida por la hidroxinorvalina es competitiva. (Ramos, 1990) Este análogo podría estar compitiendo con la treonina por su unión al ARN_t, es decir, compitiendo como sustrato de la treonil-ARN_t-sintetasa. La cepa original de donde ha sido rescatado el alelo mutante *HOM3-R2* podría portar además una mutación en la treonil-ARN_t-sintetasa, que la hiciera

resistente a hidroxinorvalina. Al transferir dicho alelo *HOM3-R2* a otra cepa, con una treonil-ARN_t-sintetasa silvestre, la resistencia se pierde.

En *E. coli* se han descrito mutantes resistentes a un análogo de isoleucina (Szentirmai et al., 1968) y a borrelidina (Nass y Thomale, 1974) en los que parecen estar implicados la isoleucil- y treonil-ARN_t-sintetasa respectivamente. La resistencia a tioisoleucina en *E. coli* se debe a tres mutaciones en diferentes *loci* (Comer, 1982). También han sido aislados mutantes resistentes a hidroxinorvalina que se identifican porque excretan treonina al medio de cultivo (Saint-Girons y Margarita, 1975). Entre los mutantes resistentes a hidroxinorvalina hay algunos que no excretan treonina al medio. Estos parecen estar afectados en uno de los genes estructurales de la treonil-ARN_t-sintetasa (Comer, 1982).

AISLAMIENTO Y AMPLIFICACION DEL GEN *THR1*

El gen *THR1* determina la homoserina quinasa, enzima que cataliza el primer paso de la ruta específica de treonina transformando la homoserina en homoserina fosfato. Como ocurre generalmente en las rutas biosintéticas de eucariotas, el primer paso de ramificación hacia la síntesis de este aminoácido está sujeto a regulación por producto final, (Jones y Fink, 1982). Este hecho llevó a pensar que tal vez la presencia de un alto número de copias de este gen en la célula de la levadura supusiera un aumento en la producción de treonina.

Como se detalla en Resultados, se ha clonado el gen *THR1* de *S. cerevisiae* mediante complementación de una mutación *thr1*. Durante la realización de esta Tesis, otros autores han publicado el aislamiento, caracterización y secuencia nucleotídica de este gen (Aas et al., 1988; Manhaupt et al., 1990a; Schultes et al., 1990). Cuando comparan la secuencia de aminoácidos de la homoserina quinasa de levaduras con la de sus correspondientes isoenzimas en bacterias, encuentran zonas muy conservadas en estas proteínas. Concretamente, el extremo carboxilo de las mismas, que es también común en otras enzimas que se unen a treonina y serina (ej., treonina sintetasa y deshidratasa), lo que tiene gran importancia evolutiva.

Con el plásmido multicopia portador del gen *THR1* (pMR1-4) aislado de la genoteca se transformó una cepa de levaduras para comprobar si la síntesis de treonina podía estar sujeta a dosis de dicho gen. La cepa transformante presenta una actividad homoserina quinasa alrededor de 20-40 veces mayor que la de la cepa

silvestre (Tabla IX). Sin embargo, esto no se traduce en una mayor acumulación de treonina (Tabla VI); es decir, la amplificación del gen *THR1* no induce la superproducción de treonina. De forma similar a como se describe más arriba, se llevó a cabo la prueba de alimentación cruzada para comprobar si se daba o no excreción de treonina al medio de cultivo. La cepa transformante TMR1-4 portadora de *THR1* en alto número de copias, presenta un fenotipo "no excretor". Es obvio que la cantidad de treonina que esta cepa produce no debe ser suficiente para alimentar a una cepa auxótrofa para este aminoácido, que se utiliza como cepa indicadora. Como se ha comentado anteriormente, la cantidad de treonina acumulada por TMR1-4 no difiere mucho de la acumulada por una cepa silvestre en las mismas condiciones. Sin embargo, no se puede descartar la idea de que la excreción de treonina se deba a un alelo (*tex1-1* ó *tex2-1*) ausente en esta cepa. Como era de esperar, las cepas transformantes no son "excretoras", según la prueba de alimentación cruzada.

PRODUCCION DE AMINOACIDOS POR CEPAS QUE CONTIENEN ALELOS AMPLIFICADOS

Según la Teoría de Control de Flujo Metabólico (Kell, 1989), en una ruta metabólica no tiene por qué existir uno o varios pasos limitantes o "cuello de botella" en los que se ejerza la regulación de la misma. Alternativamente, cada enzima debe intervenir en el control total del flujo en una cierta proporción, y ésta sería indicativa de la importancia de ese paso de la ruta. Congruentes con esta Teoría son los resultados de la amplificación de genes de síntesis de triptófano de levaduras. Así, cuando se amplifican individualmente estos genes se encuentra que no aumenta la producción de este aminoácido (Aebi *et al.*, 1982; Furter *et al.*, 1986). Ninguno de ellos por sí solo modifica el flujo metabólico a través de la ruta. Sin embargo, cuando estos genes se clonan en tandem en un plásmido multicopia (Niederberger *et al.*, 1984), la acumulación de triptófano en la célula es 6-7 veces mayor que en la mejor cepa manipulada mediante técnicas clásicas.

Como ya se ha mencionado, una cepa de levaduras con un alto número de copias del alelo silvestre *HOM3* es capaz de producir unas 10 veces más treonina que la cepa silvestre (Tabla VI). En el caso de la biosíntesis de treonina, el primer paso catalizado por la aspartato quinasa parece ejercer el papel protagonista en la

regulación de la ruta. Así lo demuestra el hecho de que mutantes *HOM3-R* y *BORI* que tienen una aspartato quinasa insensible a retroinhibición por treonina producen 30 veces y 23 veces más treonina respectivamente que la cepa silvestre (Ramos y Calderón, enviado; Seibold *et al.*, 1981). Los datos que al respecto se aportan en esta Tesis son consistentes con los mencionados: una cepa que contiene el alelo silvestre *HOM3* en alto número de copias acumula 10 veces más treonina que la silvestre (Tabla VI). Como era de esperar, una cepa con el alelo *HOM3-R2* amplificado acumula hasta 5 veces más treonina que la que lleva el alelo silvestre *HOM3*; esto es, 50 veces más que la cepa silvestre. Así pues, la amplificación del alelo responsable de la aspartato quinasa desregulada no conduce a una acumulación de treonina superior a la que presenta una cepa con una sola copia del mismo. Esto podría indicar que existen otros factores que impiden la producción de treonina por encima de esta cantidad. De hecho, según ha podido observarse, distintas cepas (XMR27-1C y XMR27-5B) derivadas de un mutante *Hom3-R* y portadoras del mismo alelo superproductor, presentaban diferencias en la acumulación de aminoácidos de la ruta (Tabla X). Ambas fueron seleccionadas para el rescate de dicho alelo por presentar las siguientes características: tener una alta frecuencia de transformación, y ser excretoras de treonina, según la prueba de alimentación cruzada (Delgado *et al.*, 1982; Ramos y Calderón, enviado). Así, mientras la cepa XMR27-1C presentaba "halo" de excreción a los cuatro días de incubación a 30°C, éste no se detectaba antes de los siete días al someter a la cepa XMR27-5B a la misma prueba. También en determinaciones cuantitativas se encontraron diferencias entre las cepas de acumulación no sólo de treonina, sino también de homoserina y otros aminoácidos (Tabla X). La cepa XMR27-5B acumulaba menos treonina que la XMR27-1C y, sin embargo, superproducía homoserina. Este hecho llevó a pensar que tal vez en un fondo genético *HOM3-R*, que ha perdido la regulación de la aspartato quinasa, la homoserina quinasa, responsable de la transformación de homoserina en homoserina fosfato, adquiere un papel importante en la regulación del flujo a través de la ruta. Si así fuese, la amplificación del gen *THR1*, que determina la homoserina quinasa, en estas cepas ayudaría a entender mejor la regulación de la síntesis de treonina, y así, poder elegir la mejor estrategia para obtener cepas de levaduras superproductoras de este aminoácido.

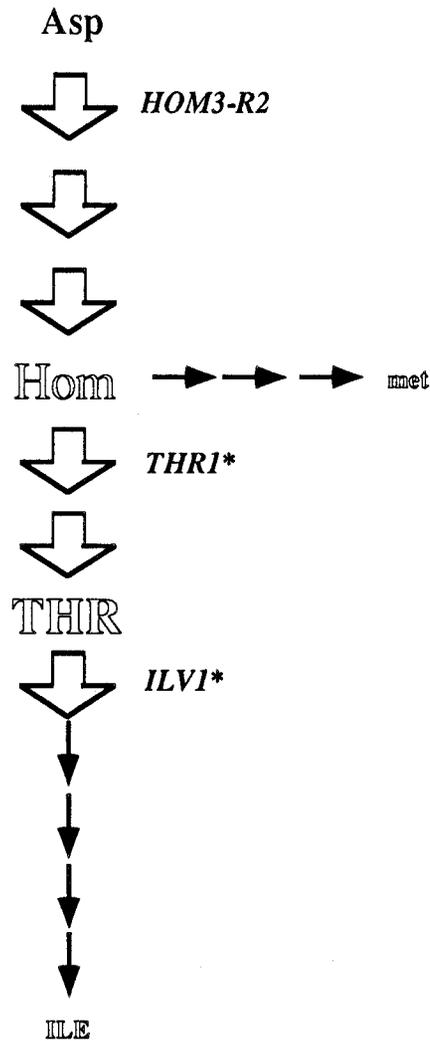
Se transformaron las cepas XMR27-1C y XMR27-5B con el plásmido multicopia que porta el gen *THR1*. La cepa original XMR27-1C produce gran

cantidad de treonina e isoleucina; sin embargo, al igual que en la cepa silvestre, no es detectable la metionina acumulada (Tabla X). El que no aumente la cantidad de metionina en esta cepa podría deberse a que según está descrito, la ruta específica de síntesis de este aminoácido está fuertemente regulada, sobre todo a nivel de la homoserina O-transacetilasa (Jones y Fink, 1982). Se ha descrito que esta enzima se inhibe y su síntesis se reprime, por metionina y S-adenosilmetionina (de Robichon-Szulmajster, 1967; Cherest *et al.*, 1969; Cherest *et al.*, 1971). La presencia de un alto número de copias del gen *THRI* hace que esta cepa acumule más metionina, sin que se vean muy alterados los niveles de treonina e isoleucina. La metionina acumulada podría ser la responsable de que disminuya la cantidad interna de homoserina 5 veces, ya que como se describe en Resultados (Tabla XI), la metionina reprime la síntesis de la aspartato quinasa. El nivel de acumulación de treonina también se ve afectado, reduciéndose a la mitad.

La cepa XMR27-5B produce 4 veces más homoserina que XMR27-1C, y cantidades detectables de metionina, así como algo menos de la décima parte de treonina (Tabla X). La diferencia entre ambas cepas podría estar en la ruta específica de síntesis de treonina. Los resultados podrían explicarse si la cepa XMR27-1C portase una mutación adicional en la homoserina quinasa, que haga que el flujo metabólico hacia treonina aumente, sintetizándose mayor cantidad de este aminoácido (ver Figura 14). Esta mutación podría consistir en una falta (o disminución) en la regulación por el producto final, treonina. La cepa XMR27-5B transformada con un plásmido multicopia con *THRI* (cepa TMR1-45B) acumula 4 veces más treonina que la cepa sin transformar, disminuyendo también 15 veces la homoserina acumulada. Sin embargo, la cantidad interna de metionina acumulada por XMR27-5B es similar a la que acumula esta cepa con el gen *THRI* amplificado. Estos resultados llevan a la idea de que la amplificación del gen *THRI* en un fondo genético superproductor de homoserina se puede traducir en un aumento de la producción de treonina pero que una mutación en este gen puede tener el mismo efecto. En cualquier caso, es evidente que las cepas de laboratorio no son genéticamente homogéneas y que, aún sin buscarlos, existen alelos que pueden directa o indirectamente influir en resultados del tipo de los presentados en esta Tesis.

De los resultados obtenidos podría deducirse que, si bien la aspartato quinasa es el primer paso importante en la regulación de la síntesis de los aminoácidos metionina y treonina, la ruta específica de treonina está también

XMR27-1C



XMR27-5B

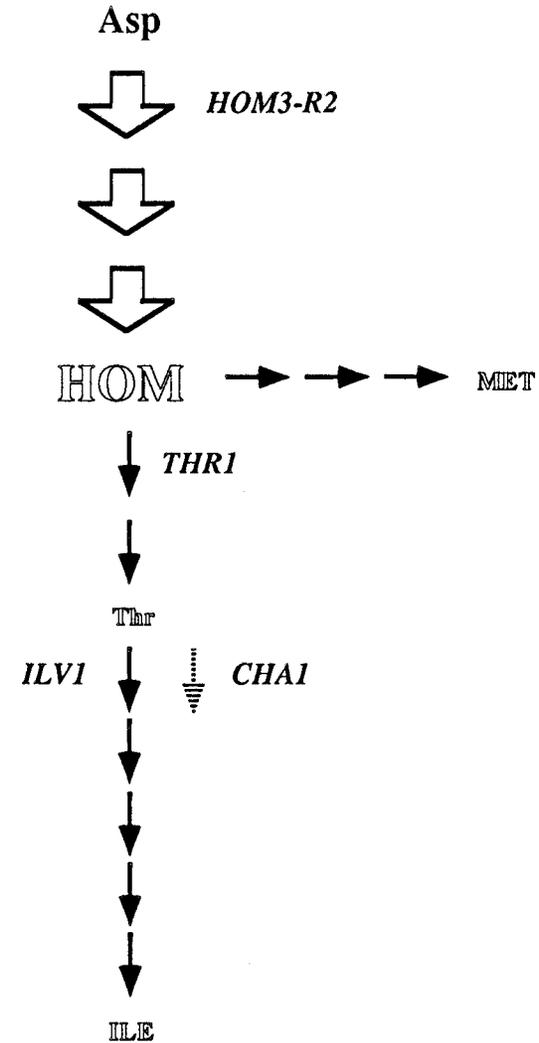


Figura 14: Hipótesis sobre las diferencias de flujo metabólico de la ruta de síntesis de treonina y metionina en las cepas XMR27-1C y XMR27-5B. (El tamaño de las letras con que se representan los aminoácidos de la ruta e intermediarios corresponde a las cantidades acumuladas de los mismos por estas cepas; *, significa alelo mutante).

regulada por este aminoácido, ejerciéndose esta regulación probablemente a nivel del primer paso, catalizado por la homoserina quinasa. Esta regulación tiene sentido sobre todo en condiciones en las que se acumula homoserina.

Es común en ambas cepas Hom3-R2 que la cantidad interna de metionina aumente cuando portan el gen *THR1* en alto número de copias (4 veces en el caso de XMR27-5B y hasta 40 veces en el caso de XMR27-1C). Una posible explicación sería que la amplificación de la homoserina quinasa desvíe el flujo a través de la ruta común hacia la síntesis de treonina (como se ha discutido), provocándose una disminución en la síntesis de metionina. Esta amplificación llevaría a una reducción en la cantidad de homoserina disponible, lo que podría implicar una "desrepresión" de la homoserina deshidrogenasa, tercera enzima de la ruta común, y/o de otras enzimas de la ruta específica de la síntesis de metionina, como puede ser la homoserina O-acetil transferasa. La homoserina deshidrogenasa parece estar regulada por metionina ya que su síntesis se reprime 2 veces en presencia de metionina (de Robichon-Szulmajster y Corrivaux, 1964). Una cepa auxótrofa de metionina cultivada en cantidades subóptimas de este aminoácido "desreprime" la homoserina deshidrogenasa, lo que sugiere que esta enzima está regulada específicamente por treonina (Cherest *et al.*, 1971; de Robichon-Szulmajster *et al.*, 1973).

Por otro lado, la treonina se convierte en α -cetobutirato por acción de la treonina deaminasa anabólica, producto del gen *ILV1*, siendo este compuesto el primer sustrato para la síntesis de isoleucina (Kakar y Wagner, 1964). Se ha descrito la existencia de una L-serina (L-treonina) deaminasa catabólica, que es capaz de sustituir a la anabólica cuando las células de levaduras se cultivan en presencia de serina y/o treonina (3.6 y 5mM respectivamente) como únicas fuentes de nitrógeno (Ramos y Wiame, 1982). Esta segunda enzima está determinada por el gen *CHAI* y no está presente cuando las células se cultivan en amonio. En condiciones de cultivo descritas, en las que las cantidades internas de los hidroxiaminoácidos, serina y/o treonina deben ser altas, la transcripción de *CHAI* se induce (Petersen *et al.*, 1988).

Sorprendentemente, a pesar de las cantidades de treonina tan dispares acumuladas por las cepas XMR27-1C y XMR27-5B, la disponibilidad de este aminoácido dentro de la célula es la inversa. Así, C. Bornaes (comunicación personal) ha podido demostrar que en XMR27-5B se transcribe activamente una fusión promotor de *CHAI-lacZ*. No ocurre lo mismo con la cepa XMR27-1C. Este

resultado podría interpretarse como que la cantidad de treonina que acumula la cepa XMR27-5B, y su localización, es suficiente para inducir la L-treonina deaminasa catabólica.

Alternativamente la cepa XMR27-1C podría portar una mutación en el gen *ILVI* que determinase una treonina deaminasa menos sensible a regulación por producto final, o bien con mayor afinidad por el sustrato. Esta treonina deaminasa "más eficiente" podría estar transformando en α -cetobutirato la treonina que actuaría como inductor de *CHAI*. Está descrito que el producto de *ILVI* sirve como inductor del resto de las enzimas comunes de las rutas de isoleucina y valina (Bollon, 1974). Estas rutas podrían estar activadas de forma que el posible efecto tóxico de la acumulación de algunos intermediarios de la ruta, como el α -cetobutirato, se vería mermado (ver Figura 14).

Los experimentos de acumulación de treonina comentados se llevaron a cabo con células cultivadas en medio mínimo (SD) que contenía algunos aminoácidos requeridos por las distintas cepas. Con el fin de estudiar de qué modo influye la presencia de aminoácidos de la ruta en la síntesis de las enzimas en estudio (aspartato quinasa y homoserina quinasa), se llevaron a cabo estudios preliminares de regulación de la síntesis de estas enzimas en la cepa TMR1-4, que contiene un alto número de copias de *THRI*. Se dice que una enzima se induce o se reprime por un determinado compuesto cuando la actividad específica de la misma aumenta o disminuye respectivamente en células cultivadas en presencia del compuesto.

Según se puede comprobar (Tablas VI y XI), las cantidades de aminoácidos acumulados por la cepa TMR1-4 disminuye unas 10 veces si el medio de cultivo contiene metionina, incluso en cantidades pequeñas (0.13mM). Esta disminución podría implicar diferencias en las actividades aspartato quinasa y homoserina quinasa por estar supuestamente regulada su transcripción por este aminoácido. También se encuentran (datos no mostrados) diferencias si el crecimiento tiene lugar en presencia de treonina, si bien la treonina se añade normalmente a los medios de cultivo en una concentración 10 veces superior al resto de los aminoácidos. Se trataba, pues, de comprobar hasta qué punto el cultivo en estos aminoácidos podía influir en las actividades de las enzimas y, consecuentemente, en la acumulación de aminoácidos de la ruta.

En la Tabla XI se presentan los resultados obtenidos cuando se realiza un experimento utilizando concentraciones mayores de aminoácidos (2mM). Según muestra la Tabla, la actividad aspartato quinasa se reprime en un 90% cuando las

células han crecido en presencia de 2 mM de treonina o metionina, lo que sugiere que la primera enzima de la ruta podría estar sujeta a un control específico mediado por los productos finales. La homoserina reprime la síntesis de la aspartato quinasa sólo en un 30%. De Robichon-Szulmajster y Corrivaux (1963) describen que el nivel de actividad aspartato quinasa disminuye de 4 a 7 veces cuando las células se cultivan en presencia de treonina u homoserina, sin embargo, no encuentran este efecto con la metionina. Mountain *et al.* (1990) han estudiado la regulación de la transcripción del gen *HOM3* en presencia de metionina y treonina, encontrando un ligero aumento en los niveles de ARNm cuando las células se cultivan en presencia de metionina, pero no de treonina. Estos resultados podrían indicar que la regulación de la síntesis de la aspartato quinasa mediada por treonina es postranscripcional, presumiblemente a través del treonil-ARN_t.

Mountain *et al.* (1990) también encuentran que la estimulación de la transcripción de *HOM3* por metionina parece estar mediada por la proteína *gcn4*. Esto podría concordar con lo que propone Charest *et al.* (1971), es decir, una regulación por control general de la aspartato quinasa y de la aspartato semialdehído deshidrogenasa ya que los niveles enzimáticos de las mismas aumentan cuando se somete una cepa auxótrofa de metionina a "hambre" de este aminoácido.

La síntesis de la homoserina quinasa se reprime en un 45% por treonina y en un 30% por metionina (Tabla X), mientras que se induce al doble por el sustrato específico, la homoserina. Se sabe que esta actividad se inhibe en un 40% por treonina (Ramos *et al.*, 1991). No hay estudios anteriores realizados *in vivo* sobre la regulación de la homoserina quinasa, aunque se sabe que los niveles de ARNm de *THR1* aumentan ligeramente cuando se cultivan las células en presencia de metionina y de treonina (Mountain *et al.*, 1990). Según estos autores la estimulación de la transcripción por metionina parece estar mediada por la proteína *gcn4*, al igual que ocurre con *HOM3*, lo que sugiere que también el gen *THR1* se encuentra bajo control general. De hecho se han encontrado secuencias consenso para la unión de *gcn4* próximas a las zonas codificantes de los genes *HOM3* y *THR1* (Rafalski y Falco, 1988; Mannhaupt *et al.*, 1990a). Los resultados presentados sugieren que la homoserina quinasa también se reprime por treonina (45%), lo que implicaría que la síntesis de esta enzima está sujeta a un control por producto final. El que su efecto represor no sea tan drástico sobre esta actividad como lo es sobre la aspartato quinasa podría ser indicativo de la importancia de

ambos pasos en la regulación del flujo metabólico de la ruta de síntesis de treonina. Tiene sentido, por tanto, pensar que la homoserina quinasa juega un papel importante en la ruta de síntesis de treonina, si bien secundario respecto del jugado por la aspartato quinasa. La regulación a este nivel sería importante en los casos en los que se acumule homoserina. La acumulación de este aminoácido sería la señal para la inducción de la homoserina quinasa cuando hace falta aumentar el flujo de la ruta específica de treonina.

En la misma Tabla XI aparecen valores de concentración interna de aminoácidos de la ruta en las condiciones citadas. Los resultados muestran que cuando las células de TMR1-4 se cultivan en homoserina, la cantidad de treonina acumulada aumenta alrededor de 10 veces respecto de cuando se cultivan en presencia de metionina o sin añadir aminoácidos de la ruta. Cuando hay treonina en el medio, la aspartato quinasa se reprime, dando lugar a una disminución en la cantidad interna de homoserina que se acumula. La cantidad de isoleucina aumenta cuando hay mayor cantidad de treonina, ya sea por producción interna o por adición al medio de cultivo. No se encuentra explicación para este aumento cuando las células se cultivan en presencia de metionina.

Como conclusión de estos estudios podría deducirse que la producción de treonina por estas cepas podría mejorar si, además de mutaciones que confieren insensibilidad a inhibición por producto final y/o genes amplificados, se modifican *in vivo* o *in vitro* los promotores de estos genes de modo que fueran insensibles a cambios en los niveles de los aminoácidos que regulan su transcripción.

CONCLUSIONES

- 1.- La amplificación del gen *HOM3* que determina la aspartato quinasa en *Saccharomyces cerevisiae*, permite a las células de la levadura acumular 10 veces más treonina que una cepa silvestre.
- 2.- Se ha clonado el alelo mutante *HOM3-R2* de *S. cerevisiae*, responsable de una aspartato quinasa insensible a inhibición por treonina. La amplificación de este alelo hace a la cepa que lo porta acumular 5 veces más treonina que la que lleva el alelo *HOM3* silvestre, es decir, unas 50 veces más treonina que lo que acumula la cepa silvestre.
- 3.- Se ha clonado por complementación el gen *THR1* de *S. cerevisiae*, que determina la homoserina quinasa. Cuando este gen se amplifica en una cepa de levaduras con fondo genético *HOM3* silvestre, la acumulación de treonina es similar a la de la cepa silvestre. Sin embargo, si se amplifica este gen en una cepa con fondo genético superproductor, *HOM3-R2*, la producción de treonina y metionina es 4 veces mayor que en la cepa sin el gen amplificado.
- 4.- La síntesis de la actividad aspartato quinasa parece reprimirse por treonina y metionina (90%), y en menor grado por homoserina (30%). La síntesis de la actividad homoserina quinasa parece reprimirse también por treonina (45%) y por metionina(30%), mientras que se activa (2 veces) por su sustrato específico, la homoserina. Como consecuencia, la producción de treonina se ve afectada, disminuyendo cuando hay represión de estas enzimas, y aumentando unas 10 veces cuando las células de levaduras se cultivan en presencia de homoserina.
- 5.- Las cepas de laboratorio de *S. cerevisiae* son heterogéneas en cuanto a los factores determinantes de la producción de treonina. Estas cepas parecen poseer combinaciones alélicas diferentes que, en ocasiones, por cruzamientos entre ellas son destruidas o modificadas.
- 6.- La amplificación de genes implicados en la biosíntesis de treonina supone, para la superproducción de este aminoácido, una estrategia tan efectiva como las técnicas clásicas de mutagénesis y selección. Esta estrategia tiene la ventaja de minimizar los cambios que se provocan en los microorganismos como consecuencia de la manipulación genética de los mismos.

BIBLIOGRAFIA

Aas, S.F. y S.E. Rognes 1990 Nucleotide sequence of the yeast *THR4* gene encoding threonine synthase. *Nucleic Acids Res.*18:665.

Aas, S.F., M.B. Brurberg, S. Brynstad, A.-J. Andresen y S.E. Rognes 1988 Molecular cloning of three genes of threonine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. En: 14th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Espoo, Finlandia. *Yeast*, vol. 4 (Special Issue),pp. S313.

Aebi, M., P. Niederberger y R. Hütter 1982 Isolation of the *TRP2* and *TRP3* genes of *Saccharomyces cerevisiae* by functional complementation in yeast. *Curr. Genet.* 5:39-46.

Aida, K. 1986 An overview of the microbial production of amino acids. En: *Progress in Industrial Microbiology: Biotechnology of Amino Acid production.* (Aida, K., I. Chibata, K. Nakayama, K. Takinami y H. Yamada, eds.) vol. 24, pp. XXI-XXV

Araki, K. 1990 Production of Amino Acids. En: *Nutrition: Proteins and Amino Acids* (Yoshida, A., H. Naito, Y. Niiyama y T. Suzuki, eds.) Japan Scientific Societies Press, Tokio,pp.303-322.

Armstrong, K.A., T. Som, F.C. Wolkert, A. Rose y J.R. Broach 1989 Propagation and expression of genes in yeast using 2 μ circle vectors. En: *Yeast Genetics Engineering* (Barr, ed.) pp.

Arndt, K. y G.R. Fink 1986 GCN4 protein, a positive transcriptional factor in yeast, binds general control promoters at all 5' TGACTC3' sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8516-8520.

Beggs, J.D. 1978 Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature* 275:104-109.

Bhattacharjee, J.K. 1983 The lysine biosynthesis in eukaryotes. En: *Amino Acids Biosynthesis and Genetic Regulation.* (Herrmann, K.M. y R.L. Somerville, eds.). Addison-Wesley Publishing Company, Inc. U.S.A. pp. 229-244

Birnboim, H.C. y J. Doly 1979 A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513.

Bojko, M., C. Bornaes, S.W. Rasmussen, S. Holmberg y J.G.L. Petersen 1989 Sequencing of the *CHA1* region proximal to the *HML locus*. BAP Meeting on sequencing of the yeast chromosome III pp. 28-31.

Bollon, A.P. 1974 Fine structure analysis of a eucaryotic multifunctional gene. *Nature* 250:630-634.

Bollon, A.P. 1975 Regulation of the *ILV1* multifunctional gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 142:1-12.

Botstein, D., S.C. Falco, S.E. Stewart, M. Brennan, S. Scherer, D.T. Stinchcomb, K. Struhl y R.W. Davis 1979 Sterile host yeasts: A eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene* **8**:17-24.

Broach, J.R., J.F. Atkins, C. McGill y L. Chow 1979 Identification and mapping of the transcriptional and translational products of the yeast plasmid, 2 μ circle. *Cell* **16**:827-839.

Burr, B., J. Walker, P. Truffa-Bachi y G.N. Cohen 1976 Homoserine kinase from *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.* **62**:519-526

Bussey, H. y H.E. Umbarger 1969 Biosynthesis of branched-chain amino acids in yeast: regulation of synthesis of the enzymes of isoleucine and valine biosynthesis. *J. Bacteriol.* **98**:623.

Chen, N.-Y., F.M. Hu y H. Paulus 1987 Nucleotide sequence of the overlapping genes for the subunits of *Bacillus subtilis* aspartokinase II and their control regions. *J. Biol. Chem.* **262**: 8787-8798

Cherest, H., F. Eichler y H. Robichon-Szulmajster 1969 Genetic and regulatory aspects of methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **97**:328-336

Cherest, H., Y. Surdin-Kerjan y H. de Robichon-Szulmajster 1971 Methionine-mediated repression in *Saccharomyces cerevisiae*: A pleiotropic regulatory system involving methionyltransfer ribonucleic acid and the product of gene *eth2*. *J. Bacteriol.* **106**:758-772

Cohen, G. N., J. C. Patte, P. Truffa-Bachi, C. Sawas y M. Doudoroff 1965b Repression and end product inhibition in a branched biosynthetic pathway. En: Colloque International du C.N.R.S. sur Mécanismes de Régulation des Activités Cellulaires chez les Microorganismes. CNRS, Paris pp.243-253

Cohen, G. N., J.C. Patte y P. Truffa-Bachi 1965a Paralled modifications caused by mutations in two enzymes concerned with the biosynthesis of threonine in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **19**:546-550

Cohen, G.N. e I. Saint-Girons 1987 Biosynthesis of Threonine, Lysine and Methionine. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Celular and Molecular Biology (Ingraham, J.L., K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H.E. Umbarger, eds.) American Society for Microbiology, Washington, D.C. vol. 1 pp. 429-444.

Comer, M.M. 1982 Threonine tRNAs and their genes in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **187**:132-137.

Cossart, P., M. Katinka y M. Yaniv 1981 Nucleotide sequence of the *thrB* gene of *E. coli* and its two adjacent regions: the *thrAB* and *thrC* junctions. *Nucleic Acids Res.* **9**:339-347

Cossart, P., M. Katinka, M. Yaniv, I. Saint-Girons y G.N. Cohen 1979 Construction and expression of a hybrid plasmid containing the *Escherichia coli* *thrA* and *thrB* genes. *Mol. Gen. Genet.* **175**:39-44

Crueger, W. y A. Crueger 1989 *Biotechnology: A textbook of industrial microbiology*, R. Oldenbourg Verlag GmbH, München.

Davis, R.W., M. Thomas, J. Cameron, T.P. St John, S. Scherer y R.A. Padgett 1980 Rapid DNA isolations for enzymatic and hibridization analysis. *Methods in Enzymology* **65**:404-411.

de Robichon-Szulmajster, H. 1967 Régulation du fonctionnement de deux chaines de biosynthèse chez *Saccharomyces cerevisiae*, thréonine-méthionine et isoleucine-valine *Bull. Soc. Chim. Biol.* **49**:1431-1462

de Robichon-Szulmajster, H. y D. Corrivaux 1963 Régulations métaboliques de la biosynthèse de la méthionine et de la thréonine chez *Saccharomyces cerevisiae* I: Repression et rétro-inhibición de l'aspartokinase. *Biochim. Biophys. Acta* **73**:248-256.

de Robichon-Szulmajster, H. y D. Corrivaux 1964 Régulations métaboliques de la biosynthèse de la méthionine et de la thréonine chez *Saccharomyces cerevisiae* III. Etude Cinétique de la répression et de la dérèpression des trois premiers enzymes de la chaîne. *Biochim. Biophys. Acta.* **92**:1-9

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

de Robichon-Szulmajster, H., Y. Surdin, Y. Karassevitch y D. Corrivaux 1965 Régulations métaboliques chez *Saccharomyces cerevisiae*. Biosynthèse de la méthionine et de la thréonine. En: Colloque International du C.N.R.S. sur Mécanismes de Régulation des Activités Cellulaires chez les Microorganismes. CNRS, París pp. 255

de Robichon-Szulmajster, H., Y. Surdin-Kerjan y H. Cherest 1973 Regulatory aspects of threonine and methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. En: *Genetics of Industrial Microorganisms: Actinomycetes and Fungi* (Vanek, Z., Z. Hostálek y J. Cudlín, eds.) Elsevier, Amsterdam. vol.2 pp.149-163

Delgado, M.A., J. Guerrero y J. Conde 1982 Genetic and Biochemical study of threonine-overproducing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **2**:731-736

Demerec, M., E.A. Adelberg, A.J. Clark y P.E. Hartman 1966 A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics *Genetics* **54**:61-76.

Enei, H., K. Yokozeki y K. Akashi 1989 Recent progress in microbial production of amino acids. Japanese Technology Reviews, vol.5 Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam.

Falco, S.C., K.S. Dumas y K.L. Livak 1985 Nucleotide sequence of the yeast *ILV2* gene which encodes acetolactate synthase. Nucleic Acids Res. **13**:4011-4027.

Furter, R., G. Paravicini, M. Aebi, G. Braus, F. Prantl, P. Niederberger y R. Hütter 1986 The *TRP4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Isolation and structural analysis. Nucleic Acids Res. **16**:6357-6373.

Gaillardin C. y H. Heslot 1979 Evidence for mutations in the structural gene for homocitrate synthase in *Saccharomycopsis lipolytica*. Molec. Gen. Genet. **172**:185-192

Gomori, G. 1955 Preparation of buffers for use in enzyme studies. En: Methods in Enzymology (Colowick S.P. y N.D. Kaplan, eds.). Academic Press, New York, vol.1 pp. 38-146

Goss, T.J. y P. Datta 1985 Molecular cloning and expression of the biodegradative threonine dehydratase gene (*tdc*) of *Escherichia coli* K-12 Mol. Gen. Genet. **201**:308-314.

Grenson, M., C. Hou y M. Crabeel 1970 Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae* IV. Evidence for a general amino acid permease. J. Bacteriol. **103**:770-777

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.

Hartwell, L.H. y C.S. McLaughlin 1968 Mutants of yeast with temperature-sensitive isoleucyl-tRNA-synthetases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **59**:422-428.

Haziza, C., P. Stragier y J.C. Patte 1982 Nucleotide sequence of the *asd* gene of *Escherichia coli*: absence of a typical attenuation signal. EMBO J. **1**:379-384

Hinnebusch, A.G. 1988 Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Rev. **52**:248-273

Hinnen, A., J.B. Hicks y G.R. Fink 1978 Transformation of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**:1929-1933.

Holmberg, S. y J.G.L. Petersen 1988 Regulation of isoleucine-valine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet. **13**:207-217.

Ito, H., U. Fukuda, K. Murata y A. Kimura 1983 Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J. Bacteriol. **153**:163-168.

Johnston, J.R. y R.K. Mortimer 1959 Use of snail digestive juice in isolation of yeast spore tetrads. *J. Bacteriol.* **78**:292-297

Johnston, J.R., F. Hilger y R.K. Mortimer 1981 Variation in frequency of transformation by plasmid YRp7 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **16**:325-329.

Jones, E. W. y G.R. Fink 1982 Regulation of amino acids and nucleotide biosynthesis in yeast. En: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces. Metabolism and Gene Expression*", vol. 2 pp.181-299

Kakar, S.N. y R.P. Wagner 1964 Genetic and biochemical analysis of isoleucine-valine mutants of yeast. *Genetics* **49**:213-222.

Katinka, M., P. Cossart, L.Sibilli, I. Saint-Girons, M.A. Chalvignac, G. le Bras, G. N. Cohen y M. Yaniv 1980 Nucleotide sequence of *thrA* gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:5730-5733

Kell, D.B., K. van Dam y H.V. Westerhoff 1989 Control analysis of microbial growth and productivity. En: *Microbial Products: New Approaches* (Banmberg, S., I, Hunter y M. Rhodes, eds.) vol.44, Cambridge University Press pp. 61-93.

Kielland-Brandt, M.C., S. Holmberg, J.G.L. Petersen y T. Nilsson-Tillgren 1984 Nucleotide sequence of the gene of the threonine deaminase (*ILVI*) of *S. cerevisiae*. *Carlsberg Res. Commun.* **49**:567-575.

Kim, E.K. y H.Z. Lea 1986 Molecular cloning and restriction endonuclease mapping of homoserine dehydrogenase gene (*HOM6*) in yeast, *S. cerevisiae*. *Kor. J. Microbiol.* **24**:357-363.

Kingsman, A.J., E.J. Mellor, M.J. Dobson y S.M. Kingsman 1991 Recombinant DNA techniques. En: *Saccharomyces* (Tuite, M.F. y S.G. Oliver, eds.) Plenum Press, New York, vol. 4 pp. 149-167.

Kingsman, A.J., L. Clarke, R.K. Mortimer y J. Carbon 1979 Replication in *Saccharomyces cerevisiae* of plasmid pBR313 carrying DNA from the yeast *TRP1* region. *Gene* **7**:141-152.

Kobayashi, T., Y. Doi y T. Takami 1990 Application of amino acids in foods and feeds. En: *Nutrition: Proteins and Amino Acids* (Yoshida, A., H. Naito, Y. Niiyama y T. Suzuki, eds.) pp.285-299.

Lowry, O.H., N.I. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275

Malumbres, M., L.M. Mateos, C. Guerrero y J.F. Martín 1988 Nucleotide sequence of the threonine synthase (*thrC*) gene of *Brevibacterium lactofermentum*. *Nucleic Acids Res.* **16**: 9859

Maniatis, T., E.F. Fritsch y J. Sambrook 1982 Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Mannhaupt, G., G. van Linden, I. Vetter, K. Maurer, U. Pilz, R. Planta y H. Feldmann 1990b Analysis of the *THR4* region on chromosome III of the yeast *S. cerevisiae*. *Yeast* 6:353-361.

Mannhaupt, G., H.D. Pohlenz, A.K. Seefluth, U. Pilz y H. Feldmann 1990a Yeast Homoserine Kinase: Characteristics of the corresponding gene, *THR1*, and the purified enzyme, and evolutionary relationships with other enzymes of the threonine metabolism. *Eur. J. Biochem.* 102:1-8.

Martín-Rendón, E., C. Ramos e I. L. Calderón (en preparación) Threonine permeases in *Saccharomyces cerevisiae*.

Martínez-Force, E. y T. Benítez 1991 Separation of O-phthalaldehyde derivatives of amino acids of the internal pool of yeast by reverse-phase liquid chromatography. *Biotechnol. Techniques* 5:209-214.

Mateos, L.M., G. del Real, A. Aguilar, J.F. Martín 1987a Nucleotide sequence of the homoserine kinase (*thrB*) of *Brevibacterium lactofermentum*. *Nucleic Acids Res.* 15:3922

Mateos, L.M., G. del Real, A. Aguilar, J.F. Martín 1987b Nucleotide sequence of the homoserine dehydrogenase (*thrA*) gene of *Brevibacterium lactofermentum*. *Nucleic Acids Res.* 15:10598.

Mclaughlin, C.S. y L.H. Hartwell 1969 A mutant of yeast with a defective methionyl-tRNA-synthetase. *Genetics* 61:557-655.

Mizukami, T., M. Yagisawa, T. Oka y A. Furuya 1986 Improvement of the stability of recombinant plasmids carrying the threonine operon in an L-threonine-hyperproducing strain of *Escherichia coli* W. *Agric. Biol. Chem.* 50:1019-1027.

Morinaga, Y., H. Takagi, M. Ishida, K. Miwa, T. Sato, S. Nakamori y K. Sano 1987 Threonine production by co-existence of cloned genes coding homoserine dehydrogenase and homoserine kinase in *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric. Biol. Chem.* 51:93-100.

Mortimer, R.K. y D. Schild 1980 Genetic map of *Saccharomyces cerevisiae* *Microbiol. Rev.* 44:519-571

Mountain, H., A. Byström, J.T. Larsen y C. Korch 1990 Four transcriptional responses in the methionine-threonine biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. En: 15th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology", The Hague, Holland. *Yeast*, vol.6 (Special Issue) pp. S276.

Nakamori, S., M. Ishida, H. Takagi, K. Ito, K. Miwa y K. Sano 1987 Improved L-threonine production by the amplification of the gene encoding

homoserine dehydrogenase in *Brevibacterium lactofermentum*. Agric. Biol. Chem. **51**:87-91.

Nasmyth, K. y S.I. Reed 1980 Isolation of genes by complementation in yeast: Molecular cloning of a cell-cycle gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**:2119-2123.

Nass, G. y J. Thomale 1974 Alteration of structure or level of threonyl-tRNA-synthetase in borrelidin resistant mutants of *E. coli*. FEBS Letters **39**:182-186

Nass, G. y K. Poralla 1976 Genetics of borrelidin resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* and properties of their threonyl-tRNA-synthetase. Molec. Gen. Genet. **147**:39-43

Nass, G. y R. Hasenbank 1970 Effect of borrelidin on the threonyl-tRNA-synthetase activity and the regulation of threonine-biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. Molec. Gen. Genet. **108**:28-32

Niederberger, P. 1989 Amino acid production in microbial eukaryotes and prokaryotes other than coryneforms. En: Society for General Microbiology Symposium (Banmberg, S., I. Hunter y M. Rhodes, eds.) vol.44, Cambridge University Press pp.1-23.

Niederberger, P., M. Abei, R. Furter, F. Prantl y R. Hütter 1984 Expression of an artificial yeast TRP-gene cluster in yeast and *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet., **195**:481-486.

Olsen, J. y K. Allermann 1987 Microbial Biomass as a Protein Source. En: Basic Biotechnology (Bu'lock, J. y B. Kristiansen, eds.) Academic Press Inc., London Ltd. pp.285-308.

Orr-Weaver, T.L. y J.W. Szostak 1983 Yeast recombination: The association of double-strand gar repair and crossing-over. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**:4417-4421.

Orr-Weaver, T.L., J.W. Szostak y R.J. Rothstein 1981 Yeast transformation: A model system for the study of recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**:6354-6358.

Orr-Weaver, T.L., J.W. Szostak y R.J. Rothstein 1983 Genetic applications of yeast transformations with linear and gapped plasmids. En: Methods in Enzymology (Wu, W., L. Grossman y K. Moldave, eds.), Academic Press, New York pp. 228-245.

Parsot, C. y D. Mazel 1987 Cloning and nucleotide sequence of the *thrB* gene from the cyanobacterim *Calothrix* PCC 7601. Mol. Microbiol. **1**:45-52

Parsot, C., P. Cossart, I. Saint-Girons y G. N. Cohen 1983 Nucleotide sequence of the *thrC* and of the transcription termination region of the threonine operon in *Escherichia coli* K12. Nucleic Acids Res. **11**:7331-7345

- Patte, J.C., G. le Bras y G. N. Cohen** 1967 Regulation by methionine of the synthesis of a third aspartokinase and second homoserine dehydrogenase in *Escherichia coli* K12. *Biochim. Biophys. Acta* **136**:245-257
- Petersen, J.G.L. y S. Holmberg** 1986 The *ILV5* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is highly expressed. *Nucleic Acids Res.* **14**:9631-9651.
- Petersen, J.G.L., M.C. Kielland-Brandt, T. Nilsson-Tillgren, C. Bornaes y S. Holmberg** 1988 Molecular genetics of serine and threonine catabolism in *S. cerevisiae*. *Genetics* **119**:527-534.
- Petersen, J.G.L., S. Holmberg, T. Nilsson-Tillgren y M.C. Kielland-Brandt** 1983 Molecular cloning and characterization of the threonine deaminase (*ILV1*) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Carlsberg Res. Commun.* **48**:149-159.
- Polaina, J.** 1984 Cloning of the *ILV2*, *ILV3* and *ILV5* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Carlsberg Res. Commun.* **49**:577-583.
- Poralla, K.** 1975 Borrelidin. En: *Antibiotics* (Corcoran, J.W. y F.E. Hahn, eds.) Springer Verlag. Berlin, vol. 3 pp.365-369
- Prasad, R., Niederberger, P. y R. Hütter** 1987 Tryptophan accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* under the influence of an artificial yeast TRP gene cluster. *Yeast* **3**:95-105.
- Präve, P., U. Faust, W. Sittig y D.A. Sukatsch** 1987 *Fundamentals of Biotechnology*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania.
- Rafalski, J.A. y S. C. Falco** 1988 Structure of the yeast *HOM3* gene which encodes aspartokinase. *J. Biol. Chem.* **263**:2146-2151
- Rafalski, J.A. y S.C. Falco** 1990 (Additions and Corrections) *J. Biol. Chem.* **265**:15346.
- Ramos, C.** 1990 Regulación de la biosíntesis de treonina en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Ramos, C. e I.L. Calderón** (enviado) Overproduction of threonine by yeast mutants resistant to hydroxynorvaline.
- Ramos, C., M.A. Delgado e I.L. Calderon** 1991 Inhibition by different amino acids of the aspartate kinase and homoserine kinase of the yeast *S. cerevisiae* *FEBS Letters* **278**:123-126.
- Ramos, F. y J.M. Wiame** 1982 Occurrence of a catabolic L-serine (L-threonine) deaminase in *S. cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **123**:571-576.

Ratzkin, B. y J. Carbon 1977 Functional expression of cloned yeast DNA in *E. coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**:487-491.

Rose, M.D., J.H. Thomas, D. Botstein y G.R. Fink 1987 A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. Gene **60**:237-243.

Saiki, R. 1989 The design and optimization of the PCR. En: PCR Technology. Principles and Applications for DNA amplification (H.A. Erlich, ed.), M. Stockton Press, USA pp.7-16.

Saint-Girons, I. y D. Margarita 1975 Operator-constitutive mutants in the threonine operon of the *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **124**:1137-1141.

Satyanarayana, T., H.E. Umbarger y G. Lindegren 1968 Biosynthesis of branched-chain amino acids in yeast: correlation of biochemical blocks and genetic lesions in leucine auxotrophs. J. Bacteriol. **96**:2012.

Schildkraut, I. y S. Greer 1973 Threonine synthetase catalysed conversion of phosphohomoserine to a-ketobutyrate in *Bacillus subtilis*." J. Bacteriol., **115**: 777-785

Schultes, N.P., A.D. Ellington, J.M. Cherry y J.W. Szostak 1990 *Saccharomyces cerevisiae* homoserine kinase is homologous to prokaryotic homoserine kinases. Gene **96**:177-180.

Schürch, A., J. Miozzari y R. Hütter 1974 Regulation of tryptophan biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mode of action of 5-methyl-tryptophan and 5-methyl-tryptophan-sensitive mutants. J. Bacteriol. **117**:1131-1140

Seibold, M., Nill, K. y K. Poralla 1981 Homoserine and threonine pools of borrelidin resistant *Saccharomyces cerevisiae* mutants with an altered aspartokinase. Arch. Microbiol. **129**:368-370

Shames, S. L. y F.C. Wedler 1984 Homoserine kinase of *Escherichia coli*: kinetic mechanism and inhibition by L-aspartate semialdehyde. Arch. Biochem. Biophys. **235**:359-370

Sherman, F. y C.W. Lawrence 1974 *Saccharomyces*. En: Handbook of Genetics (King, R.C. ed.). Plenum Press, New York, vol. 1 pp.359-393

Sherman, F., G.R. Fink y C.W. Lawrence 1979 Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory for Quantitative Biology, New York.

Sherman, F., G.R. Fink y C.W. Lawrence 1986 Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory for Quantitative Biology, New York.

Spencer, J. F. T. y D. M. Spencer 1983 Genetic improvement of industrial yeasts. Ann. Rev. Microbiol. **37**:121-142

- Spencer, L.S. y F.C. Wedler** 1984 Homoserine kinase of *Escherichia coli* : kinetic mechanism and inhibition by L-aspartate semialdehyde. Arch. Biochem. Biophys. 235:359-370
- Stadtman, E.R., G.N. Cohen, G. le Bras y H. de Robichon-Szulmajster** 1961 Feedback inhibition and repression of aspartokinase activity in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 236:2033-2038
- Stimchcomb, D.T., K. Struhl y R.W. Davis** 1979 Isolation and characterization of a yeast chromosomal replicator. Nature 282:39-43.
- Struhl, K., D.T. Stimchcomb, S. Scherer y R.W. Davis** 1979 High frequency transformation of yeast, autonomous replication of hybrid molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:1035-1039.
- Struhl, K., J.R. Cameron y R.W. Davis** 1976 Functional genetic expression of eukaryotic DNA in *E. coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:1471-1475.
- Suda, M. y H. Nakagawa** 1971 L-Serine dehydratase (rat liver)". Methods Enzymol. 17B:346-351.
- Szentirmai, A., M. Szentirmai y H.E. Umbarger** 1968 Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli*. XV. Biochemical properties of mutants resistant to thioisoleucine. J. Bacteriol. 95:1672-1679.
- Thomas, D. y Y. Surdin-Kerjan** 1989 Structure of the *HOM2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* and regulation of its expression. Mol. Gen. Genet. 217:149-154.
- Truffa-Bachi, P. y G.N. Cohen** 1966 La b-aspartokinase sensible a la lysine d'*Escherichia coli*. Purification et propriétés. Biochim. Biophys. Acta 113:531-541
- Tsukada, Y. y T. Sugimori** 1971 Induction of auxotrophic mutants from *Candida* and their application of L-threonine fermentation. Agric. Biol. Chem. 35: 1-7.
- van der Walt, J. P.** 1984 Genus 16. *Saccharomyces* Meyen emend. Reess. En: The yeast, a Taxonomic Study (Kreger-van Rij, N. I. W. ed.) pp. 555-715
- van Dyk, T.K. y R.A. LaRossa** 1988 Prevention of endogenous 2-ketobutyrate toxicity in *Salmonella typhimurium*. En: Biosynthesis of Branched Chain Amino Acids (Barak, Z., D.M. Chipman y J.V. Schloss, eds.) Proceedings of the workshop on biosynthesis of branched chain amino acids, Israel pp.123-130.
- White, T.J., N. Arnheim y H.A. Erlich** 1989 The Polymerase Chain Reaction. TIG 5:185-189.
- Willianson, D. H.** 1985 The yeast ARS elements, six years on: A progress report. Yeast 1: 1-14.

Yoshida, A., H. Naito, Y. Niiyama y T. Suzuki 1990 Nutrition: Proteins and Amino Acids, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.

Zakin, M.M., N. Duchange, P. Ferrara y G.N. Cohen 1983 Nucleotide sequence of the *metL* gene of *Escherichia coli*. Its product, the bifunctional asparto kinase II-homoserine dehydrogenase II and the bifunctional product of the *thrA* gen, Asparto Kinase I-Homoserine Dehydrogenase I derive from a common ancestor. J. Biol. Chem. 258:3028-3031

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a aquellas personas y entidades que de una u otra forma han colaborado y han hecho posible que esta Tesis sea realidad. Sin ellas, no hubiera podido conseguirlo:

A la Dra. Isabel López Calderón, directora de esta Tesis, por su confianza desde el primer momento y su contínuo estímulo, por su dedicación, por todo lo que de ella he aprendido. A Isabel, por su amistad.

Al Dr. Andrés Aguilera, por la genoteca utilizada y al Dr. José Manuel Pardo, por suministrarnos la cepa AJ483.

Al Dr. Josep Casadesús, por sus interesantes sugerencias para la discusión de esta Tesis.

Al Dr. Steen Holmberg, que hizo posible mi estancia en Copenhague donde se realizaron algunos de los experimentos de esta Tesis, por sus sugerencias y por la confianza que depositó en mí. Al Dr. Claus Børnæs, por su colaboración y sus críticas a este trabajo. Al Dr. Peter Archtander, en cuyo laboratorio se realizaron los experimentos de PCR y al Prof. Morten Kielland-Brandt, por suministrarnos los cebadores utilizados en esta Tesis.

A todos mis compañeros del Departamento de Genética, con los que he compartido muchas horas de trabajo, especialmente:

A Dudu, por sus consejos, por su amistad y apoyo constante. A Cayo, quien compartió conmigo los malos y buenos momentos, por su amistad y sus valiosas discusiones, algunas de las cuales fueron científicas. A Quique, por su ayuda tanto científica como humana, sobre todo en los últimos momentos de esta Tesis. Al resto del Grupo de Levaduras, por su interés en el desarrollo de este trabajo, y por sus sugerencias. A Bina, por escuchar pacientemente mis locuras y preocupaciones.

A la C.I.C.Y.T. y a los responsables del Plan Andaluz de Investigación, que han financiado estos estudios.

A la Junta de Andalucía, por la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador para la realización de esta Tesis y una beca de Estancia Breve en el Extranjero.

A mis amigos, que disiparon los momentos de agobio y tensión, y con los que he compartido otros muchos de alegría: a Josemaría, Lola Acosta, Paco y Amparo, Goyo y Lola, Antonio León, Concha Dorador, Joseluis Parreño, Charo, a mis hermanos Antonio y Conchi, a Marisa.

Finalmente a Javier, por su comprensión y cariño, y por dar sentido, en muchas ocasiones, a mi vida.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

D. Encarnación María Revolor
sobre Construcción de cepas de levaduras super-
productoras de treonina mediante técnicas de
ingeniería genética molecular.
apto cum laude por
unanimidad

Sevilla, 15 de octubre 1991

El Vocal,

Emigdio

El Vocal,

Jose M Pardo

El Vocal,

Alfonso Lirio

El Presidente

R. Verdáblueda

El Secretario

Alfonso

El Secretario

Alfonso



500408449

FBI E TD-247

408449