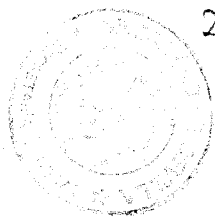


TD
217

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
CIENCIAS BIOLÓGICAS



Departamento de Genética y Biotecnología
El día 193 de Abril de 1967
Sevilla, España

TD/217

R. 9399

Isabel López Calderón



REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE TREONINA EN *Saccharomyces cerevisiae*

Trabajo realizado en el Departamento de Genética y Biotecnología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, para optar al Grado de Doctor en Biología, por el Licenciado

CAYO RAMOS RODRIGUEZ

Sevilla, Abril de 1990

Directores

Dr. Isabel López Calderón

Dr. Marco Antonio Delgado Delgado

A mis padres.

RESUMEN

En esta Tesis se ha abordado el estudio de la regulación de la ruta biosintética de la treonina en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*: Para ello se han utilizado dos estrategias diferentes:

1. Caracterización de algunas enzimas de esta ruta

Por un lado se han estudiado las dos actividades pertenecientes a la ruta específica de la treonina, homoserina quinasa y treonina sintetasa, por ser las menos estudiadas; por otro, la actividad aspartato quinasa cuya regulación por treonina era conocida y podía ser de gran utilidad en la caracterización de cepas desreguladas. En primer lugar se ha puesto a punto un método específico y repetitivo para la medida de las actividades homoserina quinasa y aspartato quinasa en un extracto parcialmente purificado. En este ensayo se determina la liberación de ADP dependiente del sustrato específico de cada enzima, mediante acoplamiento del sistema piruvato quinasa/ lactato deshidrogenasa. Se ha estudiado la variación de la velocidad inicial de las actividades homoserina quinasa y aspartato quinasa con respecto a cada uno de sus sustratos. Para ambas enzimas se ha determinado el patrón de inhibición por L-treonina, hidroxinorvalina (un análogo tóxico de la treonina) y otros aminoácidos relacionados con la ruta de biosíntesis de la treonina. Únicamente la L-treonina tiene un papel significativo en la regulación de ambas actividades enzimáticas, fundamentalmente sobre la aspartato quinasa la cual parece ser la enzima clave en el control del flujo metabólico a través de esta ruta.

También se ha puesto a punto un método para ensayar la actividad treonina sintetasa basado en la medida, mediante HPLC, de la producción de treonina por un extracto crudo al que se ha añadido homoserina-fosfato. Se ha podido comprobar que como sugerían estudios previos, efectivamente la actividad treonina sintetasa está determinada por el gen *THR4*.

2. Aislamiento y caracterización de mutantes superproductores de treonina

En primer lugar se ha determinado que la hidroxinorvalina inhibe parcialmente el crecimiento de *Sacch. cerevisiae* en medio con prolina como fuente de nitrógeno. Este efecto se atenúa cuando al medio de cultivo se añaden, además, otros aminoácidos. Mediante mutagénesis con nitrosoguanidina, se han obtenido mutantes resistentes a hidroxinorvalina; algunos de ellos, además, excretan treonina al medio de cultivo. Estos mutantes producen entre 15 y 30 veces más treonina que las cepas silvestres y, aunque en menor grado, acumulan también isoleucina. En todas las cepas analizadas, la superproducción esta asociada a la presencia de un alelo del gen *HOM3* que determina una aspartato quinasa insensible a retroinhibición por treonina. Estos resultados, al igual que los anteriores, indican que la aspartato quinasa es la enzima clave en la regulación de la ruta de biosíntesis de la treonina en *Sacch. cerevisiae*.

INDICE

INTRODUCCION.....	
BIOSINTESIS DE TREONINA.....	
Ruta común para la treonina y metionina.....	
Ruta específica de biosíntesis de treonina.....	
REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE AMINOACIDOS EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Regulación de la biosíntesis de treonina.....	
Regulación de la actividad enzimática.....	
Regulación de la síntesis enzimática.....	
Estudio de mutantes superproductores de aminoácidos.....	
Aislamiento de mutantes resistentes a análogos de aminoácidos.....	
Aislamiento de revertientes protótrofos.....	
EXCRECION DE AMINOACIDOS EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
OBJETIVO Y ESTRATEGIA DE ESTE TRABAJO.....	
MATERIALES.....	
1. CEPAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
1.1. Nomenclatura genética.....	
1.2. Cepas haploides no originales.....	
1.3. Cepas haploides originales.....	
2. PRODUCTOS QUIMICOS.....	
3. TAMPONES.....	
3.1. Tampón A.....	
3.2. Tampón AT.....	
3.3. Tampón B.....	
3.4. Tampón BT.....	

- 3.5. Tampón Hepes.....
- 3.6. Tampón Tris-maleato.....
- 3.7. Tampón Fosfato.....
- 3.8. Tampón Tris.HCl.....
- 3.9. Tampón BAP x 10.....
- 3.10. Tampón TES.....
- 3.11. Tampón TED.....
- 3.12. Tampón Bifosfatasa.....
- 3.13. Tampón Acetato.....

4. MEDIOS LIQUIDOS.....

- 4.1. Medio mínimo usual (SD).....
- 4.2. Medio mínimo con prolina como fuente de nitrógeno (SDP).....
- 4.3. Medios con hidroxinorvalina.....
- 4.4. Medio sin fuente de nitrógeno (SDN⁻).....
- 4.5. Medio nutritivo (YPD).....

5. MEDIOS SOLIDOS.....

- 5.1. Medios mínimos.....
- 5.2. Medios con hidroxinorvalina.....
- 5.3. Medio nutritivo.....
- 5.4. Medio para micromanipulación.....
- 5.5. Medio de preesporulación.....
- 5.6. Medio de esporulación.....

METODOS.....

1. METODOS DE CULTIVO.....

- 1.1. Condiciones de cultivo.....
 - 1.1.1. Obtención de precultivos.....
 - 1.1.2. Cultivos de menos de 10 ml.....
 - 1.1.3. Cultivos de 10 hasta 500 ml.....
 - 1.1.4. Cultivos de más de 500 ml.....
- 1.2. Curvas de crecimiento.....

2. DETERMINACION DEL NUMERO DE CELULAS.....

- 2.1. Células totales.....

2.2. Células viables	
3. DETERMINACION DEL PESO DE CELULAS.....	
3.1. Peso seco.....	
3.2. Peso húmedo.....	
4. MEDIDA DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS.....	
4.1. Homoserina quinasa y aspartato quinasa.....	
4.1.1. Purificación parcial.....	
4.1.1.1. Preparación de extractos crudos.....	
4.1.1.2. Precipitación con sulfato de protamina.....	
4.1.1.3. Precipitaciones con sulfato amónico.....	
4.1.1.4. Conservación del extracto.....	
4.1.2. Ensayo de la actividad homoserina quinasa.....	
4.1.3. Ensayo de la actividad aspartato quinasa.....	
4.2. Treonina sintetasa.....	
4.2.1. Obtención y purificación de homoserina-fosfato.....	
4.2.1.1. Obtención.....	
4.2.1.2. Purificación.....	
4.2.2. Preparación de extractos.....	
4.2.3. Ensayo de la actividad.....	
5. DETERMINACION DE AMINOACIDOS Y OTRAS MOLECULAS.....	
5.1. Análisis cuantitativos.....	
5.1.1. Cuantificación de aminoácidos.....	
5.1.1.1. Con ninhidrina.....	
5.1.1.2. Por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en columna de fase reversa.....	
5.1.2. Cuantificación de proteínas totales.....	
5.1.3. Cuantificación de ADP.....	

5.2. Determinaciones cualitativas.....	
5.2.1. Determinación de la excreción de treonina mediante prueba de alimentación cruzada.....	
5.2.2. Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina.....	
6. METODOS GENETICOS.....	
6.1. Tratamientos mutagénicos.....	
6.1.1. Mutagénesis con nitrosoguanidina.....	
6.1.2. Mutagénesis con luz ultravioleta.....	
6.2. Obtención de diploides.....	
6.2.1. Selección de los diploides.....	
6.2.2. Micromanipulación de cigotos.....	
6.3. Esporulación.....	
6.4. Disección de ascas y análisis meiótico.....	
6.5. Determinación del sexo.....	
6.5.1. En un número de bajo de cepas (menos de 10).....	
6.5.2. En un número alto de cepas (más de 10).....	
RESULTADOS.....	
CARACTERIZACION DE LAS ACTIVIDADES HOMOSERINA QUINASA Y ASPARTATO QUINASA.....	
1. Optimización del método de purificación y medida.....	
1.1. Homoserina quinasa.....	
1.1.1 Ensayos preliminares.....	
1.1.2. Purificación parcial.....	
1.1.3. Optimización de la medida de actividad.....	
Volumen de fracción	
pH.....	
Temperatura.....	

1.2. Aspartato quinasa.....	
1.3. Especificidad de los ensayos.....	
2. Cinética de sustratos.....	
2.1. Homoserina quinasa.....	
2.1.1. Variación de la velocidad con la concentración de L-homoserina.....	
2.1.2. Variación de la velocidad con la concentración de ATP.....	
2.2. Aspartato quinasa.....	
2.2.1. Variación de la velocidad con la concentración de L-aspartato y ATP.....	
3. Regulación de las actividades enzimáticas.....	
3.1. Aminoácidos relacionados con la ruta de la treonina.....	
3.2. Inhibición por L-treonina e hidroxinorvalina.....	
ACTIVIDAD TREONINA SINTETASA.....	
1. Obtención y purificación de homoserina-fosfato.....	
1.1. Identificación de aminoácidos en las fracciones procedentes de la cromatografía de intercambio iónico.....	
1.1.1. Aminoácidos totales.....	
1.1.2. Homoserina-fosfato y homoserina.....	
Tratamientos con fosfatasa alcalina.....	
Cuantificación de homoserina-fosfato y homoserina...	
2. Ensayo de la actividad treonina-sintetasa.....	
OBTENCION DE MUTANTES SUPERPRODUCTORES DE TREONINA.....	
1. Reversión de cepas <i>thr1</i>	
1.1. Obtención de mutantes auxótrofos para la treonina.....	
1.2. Determinación del genotipo (<i>thr1</i> ó <i>thr4</i>) de los auxótrofos para la treonina.....	

1.3. Identificación de mutaciones fin de mensaje en los alelos <i>thr1</i> y <i>thr4</i>
1.4. Obtención de revertientes Thr ⁺ a partir de las cepas CJ1 a CJ8.....
1.5. Caracterización de los revertientes Thr ⁺
2. Resistencia a hidroxinorvalina.....
2.1. Efecto de la hidroxinorvalina.....
2.1.1. Sobre el crecimiento.....
Concentración mínima inhibitoria.....
En medio sólido.....
En medio líquido.....
Efecto en presencia de aminoácidos.....
2.1.2. En ausencia de crecimiento.....
2.2. Aislamiento de mutantes resistentes.....
2.3. Selección de excretores de treonina.....
2.3.1. Análisis de dominancia/recesividad.....
2.4. Caracterización bioquímica de las cepas Ahv ^R Thr ^E
2.4.1. Efecto de la treonina y la hidroxinorvalina sobre la actividad aspartato quinasa.....
2.4.2. Cuantificación de treonina y otros aminoácidos en el interior celular y en el medio de cultivo.....
2.5. Caracterización genética de las cepas Ahv ^R Thr ^E
2.5.1. Segregación de la superproducción de treonina respecto del gen <i>THR1</i>
2.5.2. Segregación de la superproducción de treonina respecto del gen <i>HOM3</i>

DISCUSION.....

ACTIVIDAD HOMOSERINA QUINASA.....

Purificación.....

Caracterización.....

ACTIVIDAD ASPARTATO QUINASA.....

Purificación.....

Caracterización.....

ACTIVIDAD TREONINA SINTETASA.....

Obtención y purificación de homoserina-fosfato.....

Medida de la actividad.....

BUSQUEDA DE MUTANTES DESREGULADOS.....

Reversión de cepas thr1.....

Resistencia a hidroxinorvalina.....

Efecto de la hidroxinorvalina.....

Aislamiento de mutantes resistentes a hidroxinorvalina y excretores de treonina.....

Relación superproducción-temperatura.....

Caracterización bioquímica de los superproductores.....

Caracterización genética de los superproductores.....

CONCLUSIONES.....

BIBLIOGRAFIA.....

AGRADECIMIENTOS.....

INTRODUCCION

Entre los procesos de obtención de metabolitos primarios por fermentación microbiana la producción de aminoácidos es uno de los más importantes y conocidos. Las bacterias son los microorganismos usados más frecuentemente para la producción de aminoácidos, fundamentalmente *Escherichia coli* y las pertenecientes a los géneros *Corynebacterium* y *Brevibacterium* (Aida, 1986). Los aminoácidos así obtenidos se utilizan principalmente en la industria alimentaria, si bien también son de gran utilidad en medicina y cosmética. Algunos aminoácidos como por ej. el glutamato (en su forma de glutamato monosódico) son muy valiosos por su poder enaltecedor del sabor. Otros, como los aminoácidos esenciales, son particularmente importantes para su uso como fortificantes de alimentos humanos y piensos. En este sentido, actualmente, existen plantas industriales dedicadas a la fabricación de piensos en las que las deficiencias nutritivas se corrigen mediante la adición de levaduras prensadas. Las levaduras pueden obtenerse en grandes cantidades como subproductos de industrias dedicadas a la fabricación de cerveza o directamente obteniendo biomasa a partir de subproductos como melazas de caña o remolacha (Spencer y Spencer, 1983). Sin embargo, la levadura usada en alimentación es pobre en metionina, lisina, treonina y triptófano. Resulta muy interesante, por tanto, modificar genéticamente cepas de levaduras a fin de aumentar su contenido en estos aminoácidos, consiguiendo así biomasa enriquecida en aminoácidos esenciales en la dieta.

En levaduras, los 20 aminoácidos constituyentes de las proteínas se agrupan en seis familias. A cada familia pertenecen todos los aminoácidos que derivan de una molécula común. La treonina, objeto de esta Tesis, pertenece a la familia del aspartato a la cual, pertenecen además, la asparagina, la metionina y la isoleucina. La isoleucina se considera también de la familia del piruvato pues parte de su esqueleto carbonado se sintetiza a partir de este compuesto. Su ruta biosintética comparte cuatro enzimas con la de la valina (Figura 1).

En plantas verdes, Phycomycetes pertenecientes al orden Hyphochytriales y a la familia Saprolegniaceae y en procariotas

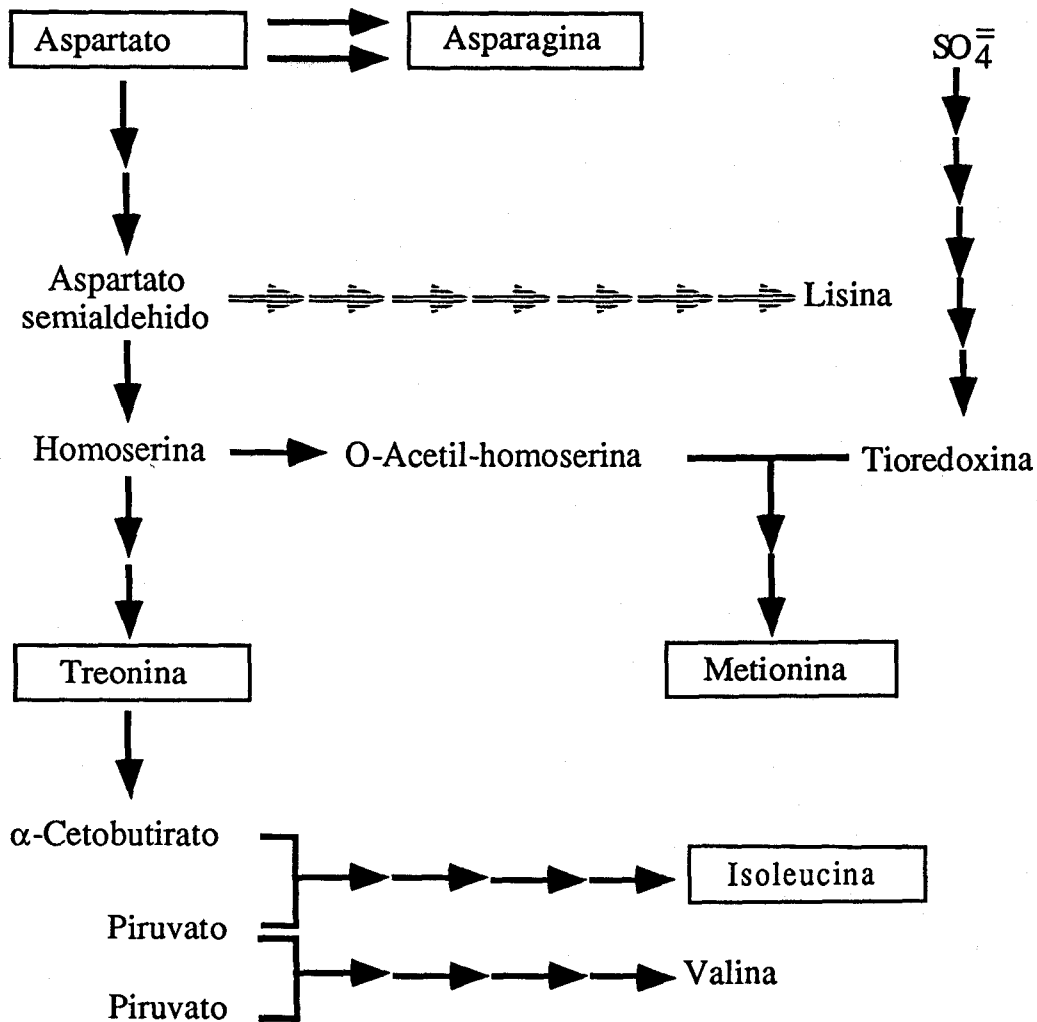


Figura 1. Biosíntesis de los aminoácidos pertenecientes a la familia del aspartato en levaduras. Se encuadran los aminoácidos que se consideran de esta familia. Las flechas rayadas representan la biosíntesis de lisina en bacterias.

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 y a la familia Mucoraceae y en levaduras la lisina se sintetiza vía α -aminoadipato, compuesto que deriva del glutamato. El hecho de que en procariotas no exista esta vía sugiere que ha podido desarrollarse después de la aparición de los eucariotas (Bhattachargee, 1983).

BIOSÍNTESIS DE TREONINA

La biosíntesis de treonina y su regulación ha sido, y continua siendo, ampliamente estudiada en procariotas a niveles enzimático, genético y molecular debido al gran interés que tiene la producción biológica de este aminoácido. Los estudios de esta ruta en levaduras son escasos pues se reducen al trabajo realizado durante los años 1963 a 1973 por el grupo de de Robichon-Szulmajster. En este apartado se describen cada una de las actividades que forman parte de esta ruta de biosíntesis tanto en procariotas, fundamentalmente en *E. coli*, como en *Saccharomyces cerevisiae*.

Ruta común para la treonina y metionina

La biosíntesis de treonina parte del aspartato del cual, mediante tres pasos, se sintetiza homoserina (Figura 2). 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;

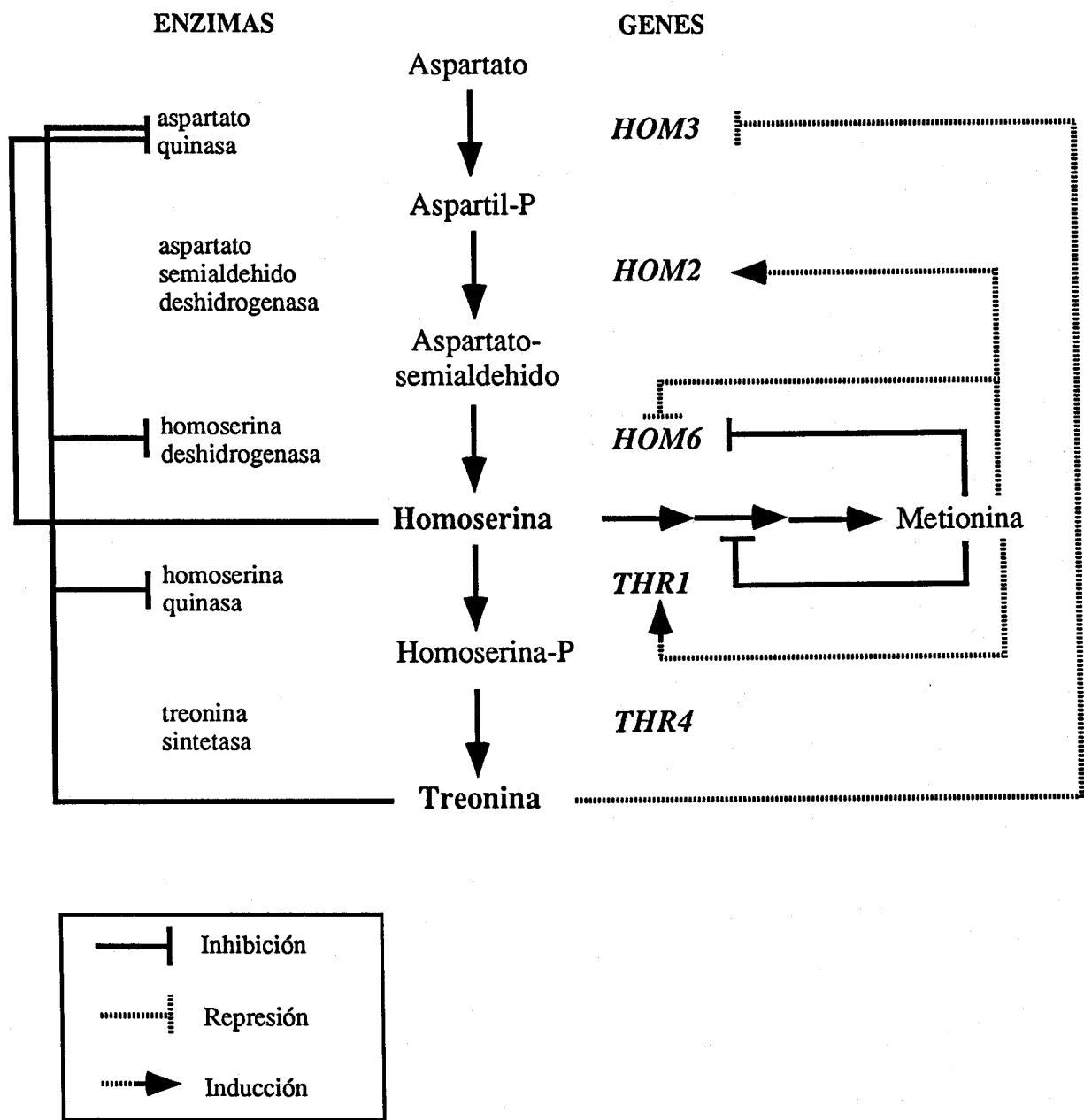


Figura 2. Ruta de biosíntesis de treonina y regulación de la misma en *Sacharomyces cerevisiae*.

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 determinante de la aspartato quinasa II de *Bacillus subtilis* (Chen *et al.*, 1987).

En levaduras, cepas portadoras de una mutación en el gen *HOM3* requieren homoserina o bien simultáneamente treonina y metionina y no presentan actividad aspartato quinasa (de Robichon-Szulmajster *et al.*, 1966). Este hecho sugiere que dicho gen determina la única aspartato quinasa existente en levaduras. De hecho el gen *HOM3* de levaduras ha sido clonado por complementación de una mutación *hom3*, y secuenciado (Rafalski y Falco, 1987). La secuencia de aminoácidos de la aspartato quinasa, deducida de la de nucleótidos del gen *HOM3*, es homóloga a la de las tres aspartato quinasa de *E. coli*. Resultados de de Robichon-Szulmajster *et al.* (1963 y 1964) indican que la aspartato quinasa de levaduras, al igual que la número I de *E. coli* es inhibida alostéricamente por treonina. Resultados de estos mismos autores indican que esta enzima también se inhibe por homoserina y lisina pero no por metionina, por el contrario, Stadman *et al.* (1961) no observaron 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 *Sacch. cerevisiae* por el *HOM2*. En ninguno de los dos organismos la actividad aspartato semialdehído deshidrogenasa es inhibida por producto final. El gen *asd* ha sido clonado y secuenciado (Haziza *et al.*, 1982).

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. La aspartato quinasa I y la homoserina deshidrogenasa I forman parte de una misma proteína determinada por el gen *thrA*. La treonina inhibe alostéricamente tanto la actividad aspartato quinasa I como la

homoserina deshidrogenasa I. Se han descrito mutaciones simples que afectan a la inhibición de ambas actividades (Cohen *et al.*, 1965 a y b). 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.

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 que determina la actividad homoserina quinasa (*thrB*) (Mateos *et al.*, 1987a). Los codones de iniciación y terminación del gen *thrA* han sido deducidos de su secuencia (Mateos *et al.*, 1987b).

Ruta específica de biosíntesis de treonina

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

La Homoserina quinasa (EC 2.7.1.39) cataliza la fosforilación de la homoserina dando lugar a homoserina-fosfato. En procariotas, esta actividad está determinada por el gen *thrB*, en levaduras, por el *THR1*. La actividad homoserina quinasa de *E. coli* se inhibe por treonina (Burr *et al.*, 1976) y por el sustrato homoserina (Shames *et al.*, 1984). La inhibición por treonina es competitiva respecto de la homoserina. Considerando que la cantidad de homoserina acumulada por células de *E. coli* es muy pequeña, este hecho podría indicar que la treonina es *in vivo* un potente inhibidor de la homoserina quinasa (Théze *et al.*, 1984). Los genes *thrB* de *E. coli*, *B. lactofermentum* y de la cianobacteria *Calotrix* han sido clonados y secuenciados. De la comparación de secuencias entre los genes procedentes de cada organismo se ha concluido que el presente en cianobacterias es más similar al de Bacilaceas que al existente en Enterobacterias (Cossart *et al.*, 1981; Mateos *et al.*, 1987a; Parsot y Mazel, 1987).

Hasta el momento se tienen muy pocos datos acerca de la homoserina quinasa de levaduras. Según de Robichon-Szulmajster *et al.* (1967) esta actividad parece inhibirse por treonina.

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 asignada al *THR4* de levaduras por no existir ninguna otra auxotrofia satisfecha solamente por treonina (de Robichon-Szulmajster *et al.*, 1966). 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 (Schildkrant y Greer, 1973). Los genes *thrC* de *E. coli* y *B. lactofermentum* han sido clonados y secuenciados. Los codones de iniciación y terminación de ambos genes han sido deducidos de su secuencia (Parsot *et al.*, 1983; Malumbres *et al.*, 1988).

REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE AMINOACIDOS EN *Saccharomyces cerevisiae*.

La regulación de las rutas metabólicas en levaduras es poco conocida si se compara con los conocimientos que de ellas se tienen en bacterias. Resulta difícil extrapolar los estudios que se realizan de uno a otro organismo debido a dos diferencias fundamentales entre estos dos tipos de células: la organización del material genético y la compartimentación, en levaduras, del espacio celular.

En bacterias, los genes que determinan las diferentes actividades de una ruta biosintética suelen estar ligados en un operón de modo que todos responden a una cierta señal metabólica a través de una o pocas secuencias reguladoras (promotores y operadores). En levaduras, por el contrario, estos genes no están ligados y las enzimas que se regulan lo hacen generalmente mediante señales diferentes o receptores diferentes de una misma señal.

La biosíntesis de aminoácidos en levaduras se regula mediante controles generales y específicos. Los controles específicos son, por definición, los mecanismos que operan sobre la ruta de biosíntesis de un único aminoácido como respuesta a la concentración de los productos intermediarios o finales. El control específico se produce tanto a nivel de síntesis como de actividad enzimática, siendo el último de ellos el que controla más fuertemente el flujo de aminoácidos a través de una ruta biosintética.

Como es común en las rutas ramificadas, en la biosíntesis de aminoácidos cada producto final suele regular la actividad de las enzimas tanto de la ruta común, como del inicio de cada una de las específicas.

Se han descrito reguladores específicos de la síntesis de enzimas pertenecientes a las rutas biosintéticas de aminoácidos que actúan tanto en *trans* (arginina, treonina y metionina) como en *cis* (arginina, fenilalanina-tirosina e isoleucina). Los genes reguladores de actuación en *trans* no determinan en ningún caso a un represor clásico (Jones y Fink, 1982). Todos los reguladores específicos descritos hasta el momento actúan a nivel transcripcional con la excepción del producto del gen *CPAR* que regula a nivel traduccional la síntesis de la subunidad glutaminasa de la carbamil-fosfato-sintetasa A, perteneciente a la ruta de biosíntesis de la arginina (Messenguy, 1987).

La síntesis de algunas enzimas de las rutas biosintéticas de los aminoácidos se regula, además, mediante el denominado control general. Cuando células de levaduras se cultivan en condiciones de "hambre" para un aminoácido determinado o en presencia de análogos de los mismos, aumenta la expresión de los genes regulados por este tipo de control (Schürch *et al.*, 1974; Delforge *et al.*, 1975; Wolfner *et al.*, 1975). Las rutas biosintéticas de aminoácidos en las cuales se conoce al menos una enzima que se regula por este tipo de control son las siguientes: triptófano, fenilalanina, tirosina, arginina, histidina, lisina, isoleucina-valina, leucina, glutamina, glutámico y metionina (Hinnebusch, 1988).

En los últimos años se han realizado grandes progresos en el esclarecimiento a nivel genético y molecular de la regulación por control general. Se han estudiado en profundidad los genes estructurales que codifican para muchas enzimas reguladas mediante este sistema, fundamentalmente los implicados en la biosíntesis de la arginina, triptófano e histidina (Hinnebusch, 1988). Por otro lado, se han aislado mutantes con defectos en los genes reguladores de este sistema de control los cuales se agrupan en dos clases:

-mutantes *gcn*, en los cuales está activada la transcripción de todos los genes que determinan enzimas sometidas al control general.

-mutantes *gcd*, en los cuales la transcripción de estos genes es inactivable.

Se ha determinado que el activador de la transcripción de estos genes es el producto del gen *GCN4*. La activación se produce tras la unión de esta proteína a una pequeña secuencia de nucleótidos localizada en el extremo 5' de todos los genes sometidos a control general (5'-TGACTC-3') (Hinnebusch y Fink, 1983). En condiciones de "hambre" de aminoácidos aumenta la traducción de los genes *GCN1*, *GCN2* y *GCN3* los cuales regulan positiva pero indirectamente al *GCN4* impidiendo la traducción de los genes *GCD*, reguladores negativos directos de la traducción de *GCN4* (Hinnebusch, 1988).

Otro aspecto fundamental a tener en cuenta es la compartimentación de los aminoácidos que se da en levaduras entre sus distintos orgánulos celulares siendo comunmente la vacuola la que actúa como reservorio. El mecanismo que regula la distribución de los aminoácidos entre los diferentes compartimentos celulares no se conoce muy bien si bien se sabe que responde a señales metabólicas tales como la síntesis de proteínas y el "hambre" de nitrógeno (Messenguy *et al.*, 1980). Wiemken y Dürr (1974) demostraron que las vacuolas de *Sacch. cerevisiae* acumulan preferentemente aminoácidos de tipo básico

estando excluidos de las mismas la mayoría de los aminoácidos ácidos y los neutros. Sato *et al.* (1984) describieron que al menos diez aminoácidos son transportados activamente al interior de vesículas preparadas con membranas vacuolares de *Sacch. cerevisiae* a través de siete sistemas de transporte diferentes. Uno de estos sistemas transporta específicamente lisina y arginina (Kitamoto *et al.*, 1988a). Mutantes aislados como sensibles a 8mM de L-lisina acumulan menor cantidad de aminoácidos básicos y distinta distribución de los mismos entre citoplasma y vacuola que las cepas silvestres (Kitamoto *et al.*, 1988b).

Regulación de la biosíntesis de treonina

Se da tanto a nivel de actividad enzimática, cómo de síntesis de las enzimas.

Regulación de la actividad enzimática

Anteriormente se ha hecho mención de los factores que regulan la actividad de cada una de las enzimas pertenecientes a esta ruta biosintética (Figura 2). En resumen, tres de ellas están sujetas a retroinhibición por treonina (aspartato quinasa, homoserina deshidrogenasa y homoserina quinasa). Durante la realización de esta Tesis se han obtenido resultados sobre la regulación por lisina y homoserina de la actividad aspartato quinasa que serán discutidos más adelante. La metionina regula también la ruta común inhibiendo competitivamente la actividad homoserina deshidrogenasa.

Regulación de la síntesis enzimática

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 trabajos realizados por este grupo se limitaron a la determinación de algunos niveles enzimáticos presentes tanto en células silvestres cultivadas en presencia o ausencia de alguno de los productos finales (treonina o metionina), cómo en cepas auxótrofas para uno de ellos sometidas a hambre del aminoácido en cuestión. Como se indicó anteriormente, ninguno de los genes descritos hasta el momento como reguladores de la biosíntesis de aminoácidos determinan a un represor o activador clásico. Se dice que una enzima se induce o reprime por un determinado compuesto si la actividad específica de la misma aumenta o disminuye respectivamente en células cultivadas en presencia del compuesto. Los resultados de estas determinaciones no son lo suficientemente concluyentes cómo para precisar con exactitud el mecanismo que regula la síntesis de cada una de las enzimas pero permiten trazar una visión general de la regulación de esta ruta que se resume en la Figura 2. En general se puede decir que si bien a nivel de actividad enzimática la treonina ejerce el papel regulador principal, a nivel de síntesis de las enzimas es la metionina la que cumple esta papel regulando la síntesis de cuatro enzimas de la ruta.

El nivel de actividad aspartato quinasa disminuye de 4 a 7 veces cuando las células se cultivan en presencia de treonina u homoserina (de Robichon-Szulmajster *et al.*, 1965). 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 esta se somete a "hambre" para este aminoácido que cuando se cultiva en presencia de la misma. Esto no ocurre cuando una cepa auxótrofa

para la treonina se cultiva en ausencia de esta (Cherest, 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.

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

- Si la síntesis de la aspartato quinasa responde a un control específico mediado por treonina (como se indicó anteriormente) y no por metionina.

- Si la aspartato semialdehído deshidrogenasa no responde a ningún control específico, como parece indicar el hecho de que ninguno de los productos finales repriman su síntesis (de Robichon-Szulmajster *et al.*, 1973).

Con los datos disponibles no es posible proponer hipótesis acerca del mecanismo que regula la síntesis de las enzimas perteneciente a la ruta específica de biosíntesis de treonina.

Estudio de mutantes superproductores de aminoácidos

El estudio de la regulación de una ruta biosintética se aborda con frecuencia mediante el aislamiento y caracterización de mutantes desregulados en uno o varios de los puntos de control de la ruta en cuestión. El método de aislamiento dependerá del modo en que se regula la ruta. En el caso de las rutas de biosíntesis de aminoácidos los métodos más comúnmente utilizados son: selección de mutantes resistentes a un análogo tóxico de un aminoácido y aislamiento de revertientes protótrofos a partir de una cepa auxótrofa cuya deficiencia se localiza en el gen estructural de una enzima regulada.

Aislamiento de mutantes resistentes a análogos de aminoácidos

La resistencia a un análogo de un aminoácido que, en principio es tóxico, puede darse por diversos mecanismos que dependen del nivel/es al cual/es actúe el análogo: en el transporte del aminoácido natural, en la biosíntesis del mismo y/o en la síntesis de proteínas.

Cuando el análogo inhibe el transporte del aminoácido natural la resistencia se produce generalmente por alteración del sistema/s de transporte. Los análogos pueden actuar inhibiendo competitivamente la actividad de alguna enzima y/o sustituyendo al aminoácido natural en procesos de inhibición, represión o inducción. De esta forma puede alterarse la síntesis del aminoácido natural (cuando la enzima está implicada en la ruta de síntesis del mismo) o la síntesis de proteínas (si la enzima se trata de la aminoacil ARN_t sintetasa del aminoácido en cuestión). En todos estos casos la resistencia puede producirse mediante alteración de la afinidad de la enzima afectada por el análogo y/o aminoácido natural, superproducción de la enzima o superproducción del aminoácido. La superproducción del aminoácido también disminuiría la incorporación del análogo a proteínas en el caso de que esta se produzca (Arfin y Gantt, 1983).

Algunos de los mutantes resistentes estarán alterados en su capacidad de regular la síntesis del aminoácido natural. Así pues, el aislamiento de este tipo de mutantes resulta muy conveniente en el estudio de la regulación de una ruta biosintética. Esta estrategia tiene, además, grandes ventajas desde experimentales: por un lado, el procedimiento de selección es positivo, por otro, permite aislar mutantes afectados en los diferentes mecanismos reguladores de la ruta en cuestión.

En la literatura se describen gran cantidad de casos, fundamentalmente en bacterias, sobre producción de aminoácidos mediante el uso de cepas mutantes desreguladas, obtenidas por resistencia a análogos de los mismos. Una revisión

reciente y completa sobre este tema puede encontrarse en "Progress In industrial Microbiology: Biotechnology of Amino Acid Production" editado por Aida *et al.* (1986), Kodansha LTD. Tokio. A continuación se describen los estudios que se han realizado en este sentido con análogos de la treonina y que esencialmente se reducen a hidroxinorvalina y borrelidina.

La hidroxinorvalina (ahv, α -amino- β -hidroxivalérico) se diferencia de la treonina (α -amino- β -hidroxibutírico) únicamente en la presencia de un carbono más en su molécula. En bacterias, este análogo parece actuar sustituyendo a la treonina en procesos de retroinhibición. Células cultivadas en presencia de hidroxinorvalina tienen inhibida la actividad de las enzimas susceptibles a retroinhibición por treonina. Como consecuencia la síntesis de los aminoácidos pertenecientes a esta ruta biosintética disminuye, llegando incluso a ser limitante del crecimiento celular. Si al medio de cultivo se añaden los aminoácidos relacionados con la ruta de biosíntesis de la treonina (treonina, metionina, isoleucina) las células recuperan su tasa normal de crecimiento (Cohen *et al.*, 1965b).

Se han obtenido mutaciones que confieren resistencia a hidroxinorvalina en *E. coli*, *B. lactofermentum*, *B. flavum*, *Corynebacterium glutamicum*, *C. acetoacidophilum*, *Proteus retgerii* y *Serratia marcescens*. La alteración más frecuente que indujo la resistencia en los diferentes organismos fue la insensibilización de la aspartato quinasa y/o homoserina deshidrogenasa a la retroinhibición por treonina. En todos los casos las cepas resistentes superproducen treonina. Mutantes de *B. flavum* cuya homoserina deshidrogenasa es insensible a la inhibición por treonina superproducen también homoserina, isoleucina y valina (Nakaromi, 1986).

La borrelidina es un antibiótico macrólido que inhibe la síntesis de proteínas tanto en procariotas como en eucariotas mediante inhibición de la actividad treonil ARN_t sintetasa. El efecto inhibitorio 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 *Sacch. cerevisiae* entre otros),

como en células de mamíferos. Entre las alteraciones que indujeron la resistencia en los diferentes organismos se encuentran:

- Modificación de la estructura primaria de la treonil ARN_t sintetasa en dos sentidos alternativos: disminución de la afinidad por el antibiótico o aumento de la afinidad por el aminoácido natural, treonina (Paetz y Nass, 1973; Nass y Thomale, 1974).
- Desrepresión de la síntesis de la treonil ARN_t sintetasa mediante la modificación de elementos reguladores que actúan en *cis* (promotor u operador). Este fenómeno se describió por primera vez en *E. coli* (Fröler *et al.*, 1980).
- Insensibilización de la aspartato quinasa a la inhibición por treonina. En *Sacch. cerevisiae*, este fenotipo se debe a una mutación dominante en un gen denominado *BOR1* que se ha descrito cómo ligado al *HOM3* y que probablemente se trate del mismo. Estas cepas superproducen treonina y homoserina (Nass y Poralla, 1976; Seibold *et al.*, 1981).

Aislamiento de revertientes protótrofos

Una forma de obtener mutantes desregulados se basa en la reversión de mutaciones en genes cuyos productos están sujetos a regulación. Todas estas reversiones restituyen la actividad de la enzima, si bien esta restitución puede tener diversos orígenes, cuales son: (1) Reversión extragénica en la que se mantiene la mutación pero esta es compensada por una mutación en otro gen. (2) Reversión intragénica perfecta, es decir, la enzima correspondiente tiene la misma secuencia de aminoácidos que la silvestre. (3) Reversión intragénica imperfecta en la que o bien el aminoácido mutado se ha sustituido por otro distinto del presente en el silvestre pero que cumple la función, o bien se introducen otros cambios en la secuencia que compensa el de la mutación por tener una secuencia distinta de la silvestre.

Entre los revertientes del tipo 3 cabe esperar que algunos contengan una enzima de configuración ligeramente irregular y que esta irregularidad le confiera bien termosensibilidad, o bien insensibilidad a moléculas reguladoras (Demain *et al.*, 1966).

Esta estrategia ha sido utilizada por Gaillardin y Heslot (1979) para insensibilizar la homocitrato sintetasa de *Saccharomyces lipolytica* de la inhibición que la lisina ejerce sobre la actividad de la misma. En *Sacch. cerevisiae* esta estrategia ha sido utilizada únicamente por Delgado *et al.*, (1982), para insensibilizar la aspartato quinasa de la inhibición por treonina. Entre los revertientes protótrofos para la homoserina, que obtuvieron a partir de una cepa *hom3*, seleccionaron excretores de treonina. Dichas cepas resultaron tener la modificación deseada y como consecuencia superproducían y excretaban treonina al exterior de la célula.

EXCRECIÓN DE AMINOÁCIDOS EN *Sacharomyces cerevisiae*.

En la literatura se han descrito mutantes de *Sacch. cerevisiae* que excretan al medio de cultivo lisina (Gray y Battacharjee, 1976; Delgado, 1981), metionina (Masselot y de Robichon-Szulmajster, 1974a y 1974b; Delgado, 1981), arginina (Grenson, 1973), triptófano (Schürch *et al.*, 1974) o treonina (Delgado *et al.*, 1982). En todos los casos en que se realizó un análisis genético de estos mutantes se comprobó que la excreción era consecuencia de la superproducción del aminoácido en cuestión. Sin embargo, la condición de superproductor de un aminoácido no implica necesariamente la excreción del mismo. Así, en cepas de *Sacch. cerevisiae* y de otras levaduras, se han descrito genes implicados en la excreción de lisina (Gaillardin *et al.*, 1975, Bekerich *et al.*, 1979) y treonina (Delgado *et al.*, 1982). Existen al menos dos genes, denominados *TEX1* y *TEX2*, implicados en la excreción de treonina. Cepas con un fondo genético superproductor de treonina y portadoras de al menos uno de los alelos *tex1-1* o *tex2-1* excretan treonina al medio de cultivo. Los productos de estos genes no han sido identificados

pero, en principio, parecen tratarse de permeasas que bombean treonina fuera de la célula, diferentes de las descritas para la el transporte de la misma al interior de las células (Martín-Rendón *et al.*, en preparación).

OBJETIVO Y ESTRATEGIA DE ESTE TRABAJO

El proyecto del cual forma parte este trabajo tiene como objetivo último la obtención de cepas superproductoras de treonina que pudieran ser empleadas como biomasa enriquecida en este aminoácido para alimentación humana o animal. Para conseguir este objetivo, se están realizando estudios fisiológicos, bioquímicos y genéticos tanto en cepas de laboratorio de *Sacch. cerevisiae* como en levaduras industriales.

En concreto, con este trabajo se pretende establecer la importancia relativa de algunos de los puntos de control de la ruta de biosíntesis de treonina en *Sacch. cerevisiae*. Para ello se han utilizado dos estrategias diferentes:

1. Caracterización de algunas de las actividades enzimáticas implicadas en esta ruta, en primer lugar y por ser menos conocidas, las que actúan en la ruta específica para la síntesis de treonina, homoserina quinasa y treonina sintetasa; posteriormente la actividad aspartato quinasa por la importancia que la misma parece tener en la regulación de la ruta.

2. Obtención y posterior caracterización bioquímica y genética de mutantes que superproduzcan treonina.

MATERIALES

1. CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

Como abreviatura de *Saccharomyces cerevisiae* se utiliza "*Sacch. cerevisiae*" (Kreger y Van Rij, 1984).

1.1. Nomenclatura genética

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).

Los genes se designan mediante tres letras (que hacen referencia a la actividad fisiológica que determinan) y un número. Las mutaciones y los alelos se indican mediante el símbolo del gen afectado y otro número separado del primero mediante un guión. Los alelos cuyo fenotipo sea dominante se escriben con mayúscula; los recesivos, con minúscula. En este trabajo se utilizan las designaciones genéticas siguientes:

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

- *ARO* son genes comunes a las rutas biosintéticas de varios aminoácidos aromáticos. Una cepa portadora de una mutación *arold* requiere simultáneamente fenilalanina, triptofano y tirosina.

- *HOM* son 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.

- *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 tanto para isoleucina como para valina.

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

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

- *CUP1* es un gen que codifica para una metalotioneína que acompleja cobre. La amplificación de este gen determina 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 deleción. Deleciones diferentes de un mismo gen se diferencian por la numeración colocada tras la delta mayúscula.

- Las letras "ts" indican que el producto de dicho alelo es termosensible (funcional a 22°C y no a 37°C).

- pTMR1-4, es un plásmido de alto número de copias portador del gen *THR1* que codifica para la homoserinaquinasa.

Los fenotipos se designan con letra mayúscula inicial:

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

- *Ahv*^R indica que la cepa es resistente a α -amino- β -hidroxivalerato (hidroxinorvalina, *ahv*).

- Thr^E y Thr^{NE} indican que la cepa es excretora o no excretora de treonina respectivamente.

Los símbolos adicionales 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.

1.2. Cepas haploides no originales

En la Tabla I se relacionan las cepas utilizadas en esta Tesis y su procedencia:

- La Cruz del Campo, S.A., Sevilla (LCC)
- Richard Bailey, Solar Energy Research Institute, Golden Co., E.E.U.U. (RB)
- Yeast Genetics Stock Center, Berkeley, California (YGSC)
- Encarnación Martín-Rendón, Departamento de Genética y Biotecnología de la Universidad de Sevilla (EMR)

1.3. Cepas haploides originales

En la Tabla II se indican las cepas obtenidas durante la realización de esta Tesis. El origen de cada una se especifica dando la cepa de la que procede, el mutágeno utilizado para su obtención (NG=N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) o el cruzamiento del que deriva. En este último caso constan las cepas parentales separadas por el signo "x" para indicar cruzamiento; la selección de haploides se realizó siempre por micromanipulación de ascas.

2. PRODUCTOS QUIMICOS

En la Tabla III se relacionan los productos químicos más relevantes utilizados en esta Tesis y su procedencia:

- Aldrich Chemical Co. Ltd., Dorset, Gran Bretaña (Aldrich)
- Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland (Fluka)

Tabla I. Cepas haploides no originales utilizadas en esta Tesis.

Cepa	Genotipo	Origen
D160-2C	<i>MATα ilv1 ura3 hom3 his1 arg6 trp2 adel met1 gal2</i>	YGSC
F4	<i>MATα thr4</i>	LCC
F15	<i>MATα arg4 thr1</i>	LCC
MMY1	<i>MATα ura3Δ52 Cyh^R</i>	RB
MMY2	<i>MATα ura3Δ52 Cyh^R</i>	RB
S2068B	<i>MATα thr4 adel trp1</i>	YGSC
S2206D	<i>MATα hom3 gal2 his2 his6 ura3 leu1</i>	YGSC
X2180-1A	<i>MATα SUC2 mal gal2 CUP1</i>	YGSC
X2180-1B	<i>MATα SUC2 mal gal2 CUP1</i>	YGSC
3971-5B	<i>MATα gal10 SUC mal trp1-1_a ura3 ura4_o met8-1_a ade5,7_a leu2_u lys1-1_o arold_a ilv1-1_o can1_o</i>	YGSC
TMR1-4	<i>MATα his4 leu2-3,112 thr1 (pTMR1-4: LEU2 THR1)</i>	EMR

Tabla II. Cepas haploides originales obtenidas durante la realización de esta Tesis.

Cepa	Genotipo	Origen
XCR13-5A	<i>MATα trp1-1_a lys1-1_o ura4_o leu2_u</i>	3971-5B x X2180-1B
CJ1 a CJ7	<i>MATα trp1-1_a lys1-1_o ura4_o leu2_u thr1</i>	XCR13-5A (NG)
CJ8	<i>MATα trp1-1_a lys1-1_o ura4_o leu2_u thr1-ts</i>	XCR13-5A (NG)
CJ9 a CJ10	<i>MATα trp1-1_a lys1-1_o ura4_o leu2_u thr4</i>	XCR13-5A (NG)
CJ11	<i>MATα trp1-1_a lys1-1_o ura4_o leu2_u thr4_o</i>	XCR13-5A (NG)
XCR28-4A	<i>MATα ura3 arg6 hom3 his1</i>	D160-2c x F4
AHV1 a AHV6	<i>MATα trp1-1_a lys1-1_o ura4_o leu2_u Ahv^R Thr^E</i>	XCR13-5A (NG)
YAHV1	<i>MATα hom3-R1</i>	AHV1 x MMY1
YAHV2	<i>MATα hom3-R2</i>	AHV2 x MMY1
YAHV3	<i>MATα ura3 Ahv^R Thr^E</i>	AHV3 x MMY1
YAHV4	<i>MATα ura4 Ahv^R Thr^E</i>	AHV4 x MMY1
YAHV5	<i>MATα ura3 hom3-R5</i>	AHV5 x MMY1

Tabla III. Productos químicos más relevantes utilizados durante la realización de esta Tesis y procedencia de los mismos.

Producto	Abreviatura	Procedencia
Acetonitrilo		Fluka
Acido acético		Panreac
Acido adenosín-5'-trifosfórico (sal sódica)	ATP	Sigma
Acido fórmico		Panreac
Acido 2-[4-(2-hidroxietyl)-1-piperacínil]-etanosulfónico (sal disódica)	HEPES	Sigma
Acido maleico		Merck
Acido perclórico		Merck
Acetato bórico		QOFF
Acetato cádmico		Merck
Acetato sódico		Merck
Acetona		Panreac
Aminoácidos		Sigma
Ditioeritrol (2,3 dihidroxi-1,4-ditiolbutano)	DIE	Sigma
Dowex AG 1x8 (200-400, HCOO ⁻)		Serva
Etanol		Probus
Etilendiaminotetraacetato (sal disódica)	EDTA	Sigma
Etilenglicol-monometiléter		Sigma
Fosfatasa Alcalina (de <i>E.coli</i>)	PA	Sigma
Fosfoenolpiruvato (sal de tri(monocicloexilamonio))	PEP	Sigma
Ftaldialdehido	OPA	Sigma
Helicasa (de jugo gástrico de <i>Helix Pomatia</i>)		LIBF
Hidridantina		Sigma
Hidroxinorvalina (α -amino- β -hidroxivalerato)	ahv	Degussa
DL-homoserina		Janssen
L-homoserina		Fluka
Lactato-deshidrogenasa/Piruvato-quinasa (de músculo de conejo)	PK/LDH	Sigma
β -mercaptoetanol		Sigma
Metanol		Probus
Nicotinamida-adenina-dinucleotido, forma reducida (sal disódica)	NADH	Sigma
Ninhidrina		Sigma
Nitrosoguanidina (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina)	NG	Aldrich
Norit-A		IIBM
Protamina sulfato		Sigma
Tetrahidrofurano		Merck
Tris(hidroxietyl)metil-2-aminoetanosulfonato	TES	Sigma
Tris(hidroximetil)aminometano	TRIS	Sigma

3.5. Tampón Hepes

Consiste en una solución de Acido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacínil]-etanosulfónico (sal disódica) a la concentración deseada ajustada al pH requerido con HCl 1 M.

3.6. Tampón Tris-maleato

Preparado según Gomori (1955). Una solución 0.2 M de tris-maleato (solución A) se diluye hasta 0.05 M, mediante adición de una solución de OHNa 0.2 M y agua destilada en las proporciones adecuada para obtener un pH de 7.8.

Solución A: Tris(hidroximetil)aminometano, 24.2 g; ácido maleico, 23.2 g; agua destilada, 1000 ml.

Se esteriliza por filtración a través de un filtro Millipore HA de 0.45 μ M de diámetro de poro, succionando con una bomba de vacío Millipore.

3.7. Tampón Fosfato

Preparado según Gomori (1955).

- Solución A: Fosfato monopotásico, 40 mM.
- Solución B: Fosfato dipotásico, 40 mM.

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



3.8. Tampón Tris.HCl

Consiste en una solución 0.5 M de Tris(hidroximetil)-aminometano ajustada al pH requerido con HCl 1 M (Gomori, 1955).

3.9. Tampón BAP x 10

Se prepara a partir del Tampón Tris.HCl, pH=8; contiene además 10 mM de ZnCl₂.

3.10. Tampón TES

Consiste en una solución de Tris(hidroxietil)metil-2-aminoetanosulfonato a la concentración deseada ajustada al pH requerido con NaOH 10 M.

Durante la realización de esta Tesis se han utilizado dos tampones TES diferentes:

- Tampón TES 40 mM, pH=7.5
- Tampón TES 50 mM, pH=8.0

3.11. Tampón TED

Se prepara a partir del Tampón TES 40 mM, pH=7.5, al que se añade EDTA y DTE ambas hasta una concentración final 1 mM. Este tampón es una modificación del descrito por Szczesiul y Wampler, 1976.

3.12. Tampón Bifosfatasa

Se prepara una solución que contiene imidazol, 50 mM; KCl, 0.1 M; MgCl₂, 10 mM y EDTA, 1 mM a pH=7.0.

3.13. Tampón Acetato

- Solución A: acetato sódico, 4 M
- Solución B: ácido acético, 4 M

Las soluciones A y B se mezclan en las proporciones adecuadas para obtener un pH de 5.5 (Gomori, 1955).

4. MEDIOS LIQUIDOS

4.1. Medio mínimo usual (SD)

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

Los suplementos requeridos por cada cepa se añaden siempre después de autoclavar el medio a las concentraciones finales indicadas en la Tabla IV (estas concentraciones son las descritas por Sherman y Lawrence (1974) con algunas modificaciones). Para ello se preparan soluciones concentradas de cada suplemento que se esterilizaron como se indica en la misma Tabla.

4.2. 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).

4.3. Medios con hidroxinorvalina

Al medio SDP con los requerimientos apropiados para cada cepa se añade, después de autoclavarlo, hidroxinorvalina a una concentración final de 1 mM. (0.13 mg/ml).

4.4. Medio sin fuente de nitrógeno (SDN-)

Constituido por L-histidina, 0.0001%; L-metionina, 0.0001%; L-triptófano, 0.0001%; glucosa, 2%.

4.5. Medio nutritivo (YPD)

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

Tabla IV. Concentraciones finales de requerimientos usadas para suplementar medios mínimos y método de esterilización de los mismos.

<u>Requerimiento</u>	<u>mg/l de medio</u>	<u>Método de esterilización</u>
Adenina.HCl	38	filtración
L-arginina	30	autoclavado
L-fenilalanina	50	autoclavado
L-isoleucina	20	autoclavado
L-histidina	20	autoclavado
D,L-homoserina	300	filtración
L-leucina	40	autoclavado
L-lisina	40	autoclavado
L-metionina	20	autoclavado
L-tirosina	20	filtración
L-treonina	150	filtración
L-triptófano	20	filtración
Uracilo	20	autoclavado

5. MEDIOS SOLIDOS

5.1. Medios mínimos

Se preparan según se describe en el apartado anterior pero añadiendo 2% de agar (Adsa=Micro).

5.2. Medios con hidroxinorvalina

Al medio SDP con los requerimientos apropiados para cada cepa se añade, después de autoclavarlo, hidroxinorvalina a una concentración final de 10mM (1.33 mg/ml).

5.3. Medio nutritivo

Se prepara según se describe en le apartado anterior pero añadiendo 2% de agar (Analema, Vorquimica, S.L., Vigo).

5.4. Medio para micromanipulación

Consiste en medio nutritivo al que se añade agar tipo Adsa=Micro por ser de mayor pureza que el anterior. Con este agar se consigue una mayor transparencia en el medio lo que facilita la micromanipulación.

5.5. Medio de preesporulación

Contiene extracto de levadura (Adsa=Micro), 0.8%; peptona (Difco), 0.3%; glucosa, 10% y agar (Analema), 2%.

5.6. Medio de esporulación

Constituido por extracto de levadura (Adsa=Micro), 0.1%; acetato potásico, 1%; glucosa 0.05% y agar (Adsa=Micro), 2%.

METODOS

1. METODOS DE CULTIVO

1.1. Condiciones de cultivo

1.1.1. Obtención de precultivos

Una colonia de la cepa que se deseaba cultivar se inoculó en 10 ml de medio nutritivo (YPD) y se incubó a 30°C, con aireación forzada por un agitador New Brunswick Scientific Co., INC. (modelo G2) a 200 r.p.m., hasta alcanzar la fase estacionaria (aproximadamente 2×10^8 células/ml).

1.1.2. Cultivos de menos de 10 ml

Se tomó 1ml de un precultivo obtenido como se describe en el apartado anterior, y se centrifugó durante 5 minutos a 6000 r.p.m.. Las células se lavaron 2 veces con el mismo medio de cultivo a inocular, y se resuspendieron posteriormente en 1 ml de dicho medio. Se tomó una gota (aproximadamente 0.05 ml) de esta suspensión y con ella se inoculó el nuevo medio. Se incubó a 30°C con aireación forzada, tal como se describe en el apartado anterior, hasta alcanzar la turbidez deseada.

1.1.3. Cultivos de 10 hasta 500 ml

De un precultivo preparado como se describe en el apartado 1.1.1., se tomó el volumen necesario para obtener en el nuevo medio una D.O. 660nm de aproximada de 0.05. En el caso de que el medio a inocular fuese distinto de YPD, las células se centrifugaron y se lavaron 2 veces con agua destilada estéril, antes de inocular el medio. El cultivo se incubó a 30°C con aireación forzada por un agitador Lab Line Instruments, EEUU, modelo 3.527-1, hasta alcanzar la turbidez deseada.

1.1.4. Cultivos de más de 500 ml

De un cultivo de 100 ml en medio YPD, preparado como se describe en el apartado 1.1.3., se tomó el volumen necesario para obtener en el medio a inocular una D.O. 660nm aproximada de 0.05. Tras centrifugar y lavar las células 2 veces con agua destilada estéril, se inoculó el nuevo medio y se incubó a 30°C con aireación forzada por un agitador magnético, hasta alcanzar la turbidez deseada.

En todos los casos, la turbidez del cultivo se ha determinado mediante un Spectronic 20 (Bausch and Lomb, Bélgica) a 660 nm de longitud de onda.

1.2. Curvas de crecimiento

Siguiendo las condiciones de cultivo detalladas en el apartado 1.1.2., se inocularon tubos de 9 ml de capacidad que contenían 3 ml del medio apropiado en cada caso. Se siguió periódicamente el incremento de D.O. 660nm del cultivo hasta que éste alcanzaba la fase estacionaria (aproximadamente 1.0).

El crecimiento, expresado como tasa máxima de crecimiento (μ), se determina a partir del tiempo medio de duplicación (tiempo de generación, T) durante el aumento exponencial de la turbidez, de acuerdo con la expresión:

$$\mu = \frac{\ln 2}{T} \quad (\text{Van Uden, 1971})$$

2. DETERMINACION DEL NUMERO DE CELULAS

2.1. Células totales

La concentración de células totales se estimó contando el número de células en un microscopio óptico, con una cámara de Petroff-Hausser (C.A. Hausser & Sons, Philadelphia, USA).

2.2. Células viables

Se define como célula viable aquella capaz de formar colonia en medio YPD sólido. El número de células viables de un cultivo o una suspensión se determinó sembrando una muestra del mismo en cajas que contenían medio YPD sólido. Se realizaron las diluciones adecuadas para obtener entre 100 y 200 colonias por caja. Tras incubar durante 2-3 días a 30°C, se contó el número de colonias aparecidas. Para cada determinación se sembraron 3-4 cajas de Petri y se calculó el valor medio.

3. DETERMINACION DEL PESO DE CELULAS

3.1. Peso seco

Una muestra de 20 ml de cultivo o una alícuota de una solución concentrada de células se filtró a través de un filtro Millipore de 0.45 μ de diámetro de poro. El filtro con la biomasa retenida se secó en una estufa a 105°C durante 10 minutos (previamente se había comprobado que incubaciones más prolongadas no conllevaban una disminución significativa en el peso). La diferencia entre el peso del filtro y el peso del filtro junto con la biomasa tras el secado se tomó como peso seco de las células.

3.2. Peso húmedo

El peso húmedo equivale aproximadamente a cuatro veces el peso seco.

4. MEDIDA DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

4.1. Homoserina quinasa y aspartato quinasa

En los siguientes apartados se describen los métodos seguidos para purificar y ensayar la homoserina quinasa y aspartato quinasa. La purificación parcial de ambas enzimas se realizó obteniendo en primer lugar un extracto crudo de las células y sometiéndolo 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.

4.1.1. Purificación parcial

Ambas enzimas se purificaron parcialmente siguiendo un método sustancialmente modificado al descrito por Thèze *et al.* (1974) para *Escherichia coli*.

4.1.1.1. Preparación de extractos crudos

A partir de un cultivo en medio mínimo con los requerimientos adecuados y a D.O._{660nm} entre 0.7 y 0.8, se recogían las células mediante centrifugaciones sucesivas y se lavaban 2 veces en tampón AT. Se rompían las células en un homogeinizador Braun, modelo MSK; la mezcla de ruptura llevaba por cada gramo de peso húmedo de células, 4.25 ml de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro y 1.65 ml de tampón AT. Los residuos celulares se eliminaban del extracto mediante dos centrifugaciones consecutivas a 4°C, la primera de 20 minutos a 8000 x g (aproximadamente 15000 rpm en un rotor Beckman JA20) y la segunda de 2 horas a 105000 x g (aproximadamente 50000 rpm en un rotor Beckman 75Ti).

4.1.1.2. Precipitación con sulfato de protamina

Al extracto crudo se añadían 5 mg de sulfato de protamina, (neutralizada a pH=7 con NaOH) por cada gramo de peso húmedo de células de partida. Tras mantener el extracto en agitación suave a 4°C durante 1 hora, se eliminaba el precipitado (ácidos nucleicos y proteínas asociadas a los mismos) mediante centrifugación a 4°C durante 15 minutos a 8000 x g.

4.1.1.3. Precipitaciones con sulfato amónico

Al sobrenadante, obtenido como se describe en el apartado anterior, se añadía sulfato amónico hasta un 30% de saturación y se mantiene en agitación suave a 4°C durante 30 minutos, transcurridos los cuales, se eliminaba el precipitado (P30) por centrifugación a 4°C durante 15 minutos a 8000 x g. Al sobrenadante se añadía sulfato amónico hasta un 45% de saturación. El precipitado (P45), obtenido tras agitar y centrifugar en las mismas condiciones utilizadas para la obtención del P30, se resuspendía en 0.6 ml de tampón BT por cada gramo de peso húmedo de células de partida y se dializaba dos veces, durante 12 horas cada una, frente a 500 ml del mismo tampón.

Como se indica en Resultados, en algunas ocasiones se utilizó otro tampón distintos del AT para la obtención del extracto crudo.

4.1.1.4. Conservación del extracto

No se observó pérdida en la actividad de ninguna de las dos enzimas tras mantener los extractos a -80°C durante 1 mes.

4.1.2. **Ensayo de la actividad homoserina quinasa**

La actividad homoserina quinasa se ensayó a 30°C cuantificando la liberación de ADP mediante el sistema piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa (PK/LDH) descrito en el apartado 5.1.3. Para la medida de absorbancia se utilizó en algunas ocasiones un espectrofotómetro Baush & Lomb, modelo 2000 y cuando fue necesario, uno Beckman DU50 con cámara reguladora de temperatura.

Reactivos

Salvo cuando se especifique otra cosa, se utilizaron las siguientes soluciones:

- Solución A: hepes, 0.5 M pH=7.6; KCl, 70 mM

- Solución B: fosfoenolpiruvato, 45 mM; MgSO₄·7H₂O, 0.3M; KCl, 1.8 M
- Soluciones de:
 - NADH, 6mM
 - ATP, 50mM, neutralizado con NaOH 1M
 - L-homoserina, 1 mM
 - PK/LDH, 700 y 1000 unidades por ml respectivamente.

Tanto el NADH, como el ATP se disolvieron en hepes, 0.05 M pH=7.6; el resto de la soluciones se hicieron con agua destilada.

Durante la realización de los ensayos, la solución A y la de L-homoserina se mantuvieron a 30°C; la solución B, la de NADH y la de ATP se mantuvieron en un baño de hielo, a 0°C.

Mezcla de reacción

Se preparó directamente en la cubeta del espectrofotómetro mezclando : Solución A, 100 µl; Solución B, 50 µl; NADH, 25 µl; ATP, 50 µl; PK/LDH, 12 µl; extracto parcialmente purificado y agua destilada hasta un volumen de 450 µl. Tras mantener la mezcla en un baño a 30°C durante 2 minutos se desencadena la reacción añadiendo 50 µl de la solución de L-homoserina. La concentración final a la que quedaba cada uno de los componentes en la mezcla de reacción fue la siguiente: Hepes, 0.1 M; PEP, 4.5 mM; NADH, 0.3 mM; ATP, 5mM; L-homoserina, 1 mM; KCl, 194 mM; MgSO₄·7H₂O, 30 mM.

Como se indica en Resultados, los extractos parcialmente purificados presentan una pequeña actividad independiente de la presencia del sustrato L-homoserina. Por esta razón resultó necesario realizar cada medida en presencia y ausencia de la misma. En este último caso la solución de L-homoserina fue sustituida por agua destilada.

Donde se indica en Resultados, la L-homoserina fue sutituida por DL-homoserina a una concentración final de 0.2 mM.

Unidades de actividad

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

Las unidades de actividad se calculan según la siguiente ecuación:

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

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

B = $-\Delta$ 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 Δ D.O._{340nm} por minuto se calculó utilizando solamente el tiempo durante el cual el descenso de absorbancia se mantiene lineal que era siempre menor a 10 minutos.

En algunos casos la actividad se expresa como (A-B).

4.1.3. Ensayo de la actividad aspartato quinasa

La actividad aspartato quinasa se midió de la misma forma que la actividad homoserina quinasa (apartado 4.1.2) excepto que en vez de con L-homoserina, la reacción se desencadenaba mediante la adición de 50 μ l de una solución 100 mM de L-aspartato, neutralizada con NaOH 1M. Además en este ensayo se utilizaba una concentración final de ATP de 10 mM.

4.2. Treonina sintetasa

4.2.1. Obtención y purificación de homoserina-fosfato

4.2.1.1. Obtención

Se preparó a partir de DL-homoserina y ATP con homoserina quinasa de *Sacch. cerevisiae* según el siguiente protocolo:

La enzima se purificó parcialmente según se describe en el apartado 4.1.1. a partir de 10.4 g de peso humedo de células de la cepa TMR1-4, que contiene el plásmido multicopia pTMR1-4, portador del gen *THR1* que determina la homoserina-quinasa.

De forma independiente se prepararon 150 ml de una solución que contenía Hepes pH=7.5, 15 mmoles; KCl, 30 mmoles; MgSO₄.7H₂O, 4.5 mmoles; ATP, 10.5 mmoles; DL-homoserina, 15 mmoles. Se ajustó el pH a 7.5 con NaOH 1M. A esta solución se añadieron 3 ml de la preparación de homoserinaquinasa y la mezcla se incubó durante 3 horas y 30 minutos a 30°C transcurridos los cuales, se paró la reacción manteniendo la mezcla a 100°C durante 15 minutos. El precipitado se eliminó mediante centrifugación durante 20 minutos a 3600 x g (aproximadamente 10000 rpm en un rotor Beckman JA20).

Para seguir el curso de la reacción, que al cabo de las 3 horas alcanzaba el 23%, se tomaron a lo largo de la incubación alicuotas de 0.5 ml a las que se añadieron 35 µl de HClO₄ 2N para parar la reacción. Mediante la adición de KOH 10 N se ajustaba la solución a pH=7. Se centrifugó a 13000 rpm en una microcentrifuga Heraeus Sepatech, modelo Biofuge A y se eliminó el precipitado. En el sobrenadante se midió la cantidad de ADP según se describe en el apartado 5.1.3. (Figura 3).

4.2.1.2. Purificación

Precipitación con Bario y etanol

Se realizó según Watanabe y Shimura (1956). El pH de la solución se ajustó a 8.2 con NaOH 1 M y se añadieron 60 ml de

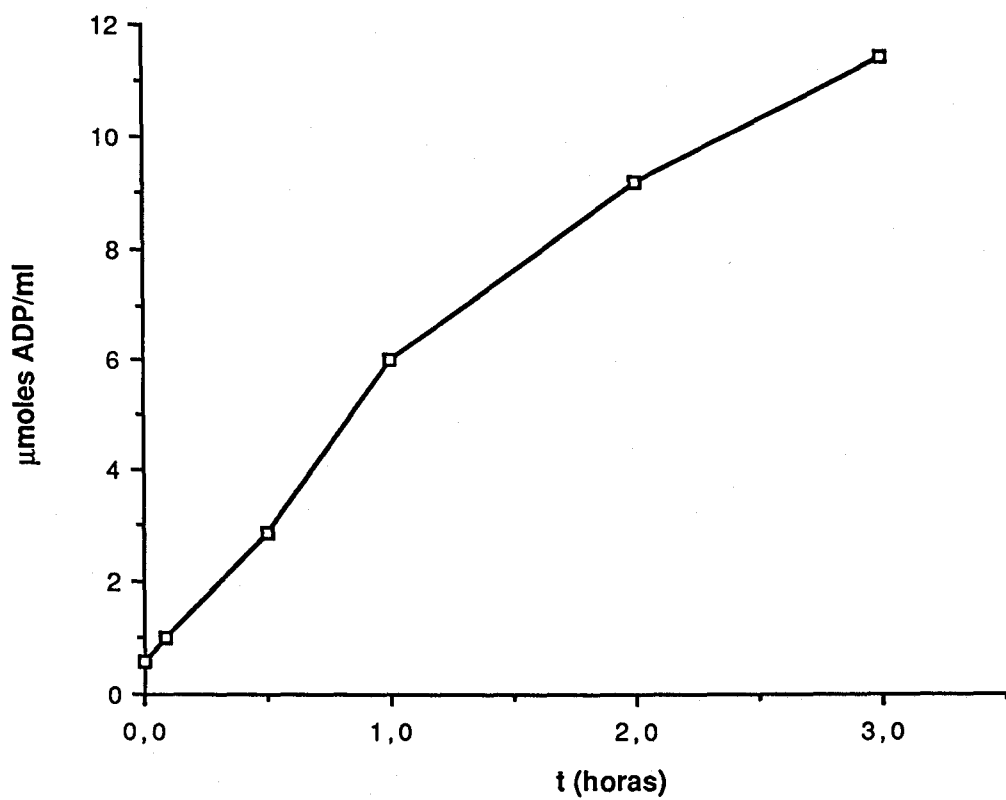


Figura 3. Formación de ADP durante la obtención de homoserinafosfato.

acetato de bario 1 M y 3 volúmenes (aproximadamente 615 ml) de etanol absoluto. Las sales béricas precipitaban al incubar la suspensión a 0°C durante 12 horas, transcurridas las cuales se recogía el precipitado por centrifugación durante 20 minutos a 3600 x g en un rotor Beckman JA20, y se lavaba 3 veces con etanol frío al 75%.

La homoserina-fosfato se extraía del precipitado mediante la adición de 25 ml de HCl 0.1 M. Este proceso se repitió 3 veces desechando cada vez el material no soluble en ácido mediante centrifugación a 3600 x g durante 20 minutos en un rotor Beckman JA20. Se ajustó el pH a 4.5.

Los nucleótidos-fosfato se eliminaron de la solución mediante la utilización de carbón activo añadiendo 0.5 g de Norit A e incubándola a 25°C durante 1.5 horas. Previamente era necesario lavar el carbón activo durante 15 minutos a 80°C con 10 volúmenes de HCl 1 N, eliminar el ácido con agua destilada y dejar secar a 110°C.

El exceso de bario se eliminó añadiendo a la solución 60 mmoles de Na₂SO₄ y manteniendo la solución en agitación mediante un agitador magnético durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras eliminar el precipitado (sulfato de bario) por centrifugación, se ajustó el pH a 7.5 con KOH 10 N.

Separación de homoserina-fosfato por cromatografía de intercambio iónico.

La solución de homoserina-fosfato se aplicó a una columna de 1 x 24 cm rellena con una resina de intercambio aniónico Dowex-AG 1x8 de 200-400 mesh, forma fórmica. La resina se había lavado previamente con ácido fórmico 10 mM.

Tras lavar la columna con 1 volumen de ácido fórmico 10 mM, la homoserina-fosfato se eluyó de la columna con 8 volúmenes de ácido fórmico 500 mM. Las fracciones, de aproximadamente 4 ml, se recogieron con ayuda de un colector Bucher Instruments, USA, modelo Fractomat. Se utilizó un flujo de 0.26 ml/minuto obtenido con una bomba peristáltica LKB Bromma, modelo 10200 Perpex. Se tomó una alícuota de 0.1 ml de cada una de las fracciones para

detectar aminoácidos con ninhidrina como se describe en el apartado 5.1.1.1.

Tratamiento con fosfatasa alcalina

La mezcla de reacción contenía: Tampón 10 x BAP, 5 μ l; fosfatasa alcalina (166 unidades/ml), 5 μ l; muestra de aminoácido fosfatado y agua destilada hasta un volumen final de 50 μ l.

La mezcla de reacción se mantuvo a 60°C durante 1.5 horas.

4.2.3. Preparación de extractos

Se llevó a cabo de la forma descrita en el apartado 4.1.1.1. para la purificación de la homoserina quinasa y aspartato quinasa excepto que el Tampón utilizado fue Tampón TED y omitiendo la centrifugación a 105000 x g.

4.2.4. Ensayo de la actividad

La actividad treonina sintetasa se ensayó en extractos obtenidos como se describe en el apartado anterior.

La mezcla de reacción, adaptada de Szczesiul y Wampler (1976), consta de: Tampón Tes 50mM, pH=8; fosfato de piridoxal, 70 mM; homoserina-fosfato (obtenida como se describe en el apartado 4.2.1.), 1 mM; extracto crudo y agua destilada hasta un volumen final de 4 ml. La mezcla se incubó a 30°C durante 60 minutos a lo largo de los cuales se toman alícuotas de 1ml que se mantienen a 100°C durante 4 minutos para parar la reacción. El precipitado se eliminó por centrifugación a 13000 rpm en una microcentrifuga Heraeus Sepatech, modelo Biofuge A. El sobrenadante se filtró a través de un filtro Millipore de 0.45 μ de diámetro de poro.

La actividad se midió cuantificando mediante HPLC la desaparición de homoserina-fosfato y la aparición de treonina a lo largo del tiempo, según se describe en el apartado 5.1.1.2..

5. DETERMINACION DE AMINOACIDOS Y OTRAS MOLECULAS

5.1. Análisis cuantitativos

5.1.1. Cuantificación de aminoácidos

5.1.1.1. Con ninhidrina

Se realizó según Plummer (1971).

Reactivo

El reactivo, que se preparaba en un frasco protegido de la luz y que debía utilizarse en las 24 horas después de su preparación, consta de:

- Ninhidrina, 0.8 g
- Hidridantina, 0.12 g
- Etilenglicol-monometiléter, 30 ml
- Tampón acetato 4M, pH=5.5, 10 ml

Mezcla de reacción

A 1 ml de muestra se añadía 1 ml de reactivo. Se calentaba la mezcla durante 15 minutos a 100°C y se dejaba enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadía 1.5 ml de etanol 50% y, tras esperar 10 minutos, se medía a 570 nm el color desarrollado (purpureo) por la reacción del grupo α -amino con la ninhidrina.

Curva patrón

Se realizó una curva patrón a partir de soluciones que contenían entre 5 y 75 nmoles de DL-homoserina con los cuales se obtuvieron valores de absorbancia a 570 nm comprendidos entre 0.1 y 1.6.

5.1.1.2. Por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en columna de fase reversa

Se realizó según Martínez-Force y Benitez (1990).

Obtención de muestras

De un cultivo en medio mínimo (SD) con los requerimientos adecuados que había alcanzado una D.O.660 nm entre 0.7 y 0.8, se extraía una muestra de 40 ml y se centrifugaba a 6000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante y el precipitado resultantes sirvieron para determinar la concentración de aminoácidos fuera y dentro de las células respectivamente, según se describe a continuación:

En el interior de las células

Las células del precipitado se lavaron 5 veces con agua destilada y se resuspendieron en 2 ml de agua desionizada. La suspensión de células se mantuvo en un baño a 100°C durante 15 minutos para extraer los aminoácidos del interior de las mismas. A continuación se centrifugó y se filtró el sobrenadante a través de un filtro Millipore de 0.45 µm de diámetro de poro.

En el medio de cultivo

Se tomó una alícuota de 10 ml del sobrenadante la cual se mantuvo en un baño a 100°C durante 15 minutos, para someter las muestras a ensayar al mismo proceso descrito anteriormente, y se liofilizó en un liofilizador Edwards, modelo EF03 hasta un secado total (aproximadamente 12 horas). El liofilizado se disolvió en 1 ml de agua desionizada y se filtró a través de un filtro Millipore de 0.45 µm de diámetro de poro.

Las muestras se conservaron a -20°C hasta el momento de su medida.

Sistema de HPLC utilizado

Se utilizó un cromatógrafo Waters equipado con una columna Novapack™ C18 de 18 x 100 mm, empaquetada con sílica esférica de 5 µm de diámetro, dos bombas Waters, modelos 501 y 510 respectivamente y un detector de ultravioleta-visible Waters, modelo 481.

Las inyecciones de muestras se hacían a través de una válvula fija con un lazo de 20 µl, ambos Rheodyne, modelos 7010 y 7012 respectivamente.

El control del sistema, la integración de datos y su almacenamiento se realizaba utilizando el programa "Baseline 810" en un ordenador IBM AT.

Solventes

Se han utilizado dos mezclas de solventes, cuya composición volumen/volumen es la siguiente:

-Solvente A: fosfato sódico 400 mM pH=7.2, 5%; tetrahidrofurano, 1.5%; agua desionizada, 93,5%.

-Solvente B: fosfato sódico 400 mM pH=7.2, 2.5%; acetonitrilo, 55%; agua desionizada 42.5%.

Una vez preparados los solventes, se degasificaban en un baño de ultrasonidos "Selecta" a 200 Watios y durante 15 minutos.

Gradientes

Se utilizaron 2 gradientes diferentes, realizados con los solventes descritos anteriormente, según se quisiese cuantificar aminoácidos totales, o, únicamente homoserina, homoserina-fosfato y treonina. En ambos casos la velocidad del flujo era de 2 ml/minuto.

Cuantificación de aminoácidos totales

La cantidad de solvente B, que comenzaba con un 0% a tiempo=0 minutos, se incrementaba en un 5% cada minuto y 40 segundos hasta una concentración final del 60% después de 20 minutos. Se mantenía el 60% de solvente B durante 1.5 minutos transcurridos los cuales se volvía linealmente, durante 1.5 minutos, al 0% de solvente B.

Cuantificación de homoserina, homoserina-fosfato y treonina

Igual al anterior durante los primeros 9.9 minutos en los que el solvente B alcanzaba una concentración del 25%. A partir de este momento, la cantidad de solvente B se aumentaba linealmente hasta un 60%, que se alcanzaba a tiempo=11.5 minutos. Se mantenía el 60% de solvente B durante 1.5 minutos transcurridos los cuales se volvía linealmente, durante 1.5 minutos, al 0% de solvente B.

Derivatización de aminoácidos con ftaldialdehido

Mezcla derivatizante

Se preparó mezclando 4.5 ml de solución A con 0.5 ml de solución B y 0.2 ml de β -mercaptoetanol. La mezcla se filtraba a través de un filtro Millipore de 0.45 μ m de diámetro de poro. Debido a la inestabilidad del β -mercaptoetanol en la mezcla derivatizante, ésta debía mantenerse durante su uso a 0°C y desecharse antes de 24 horas después de su preparación.

-Solución A: borato sódico 0.4 M, pH=10

-Solución B: ftaldialdehido 54 mg/ml en metanol. Se mantenía a -20°C y protegida de la luz hasta el momento de su uso.

Tratamiento

A 25 μ l de una muestra de aminoácidos se añadía 75 μ l de mezcla derivatizante. Se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente antes de ser inyectada en el HPLC.

El grado de derivatización de los aminoácidos es diferente cuando se utilizan mezclas derivatizantes preparadas independientemente. Fue necesario, por tanto, calibrar la derivatización ocasionada sobre cada aminoácido por una mezcla concreta. Por este motivo, antes y después de la inyección de un grupo de muestras tratadas con una misma mezcla derivatizante, se derivatizaba e inyectaba una solución patrón que contenía 650 nmoles/ml de cada aminoácido. Este patrón se preparó diluyendo 4 veces una solución de aminoácidos en HCl 0.1N distribuida por Sigma.

Los derivados de aminoácidos se detectaron a 340 nm de longitud de onda.

Tiempos de retención

La Tabla V indica los tiempos de retención obtenidos para cada uno de los aminoácidos presentes en la mezcla patrón descrita anteriormente. Cada dato es la media de los valores obtenidos a partir de 3 experimentos independientes. La desviación típica calculada era en todos los casos menor de 0.15.

El tiempo de retención obtenido para la DL-homoserina fue de 8.31 minutos. La homoserina-fosfato se retenía a dos tiempos diferentes (aproximadamente a los 0.78 y 1.10 minutos) apareciendo en los cromatogramas como dos picos solapados.

5.1.2. Cuantificación de proteínas totales

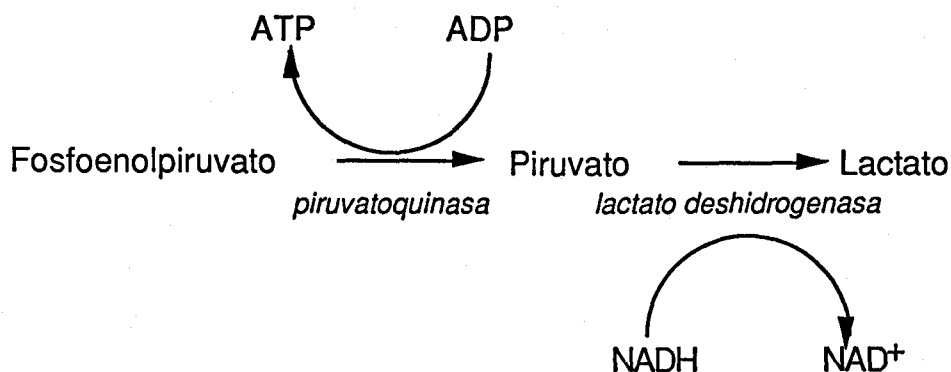
La cantidad de proteínas totales se determinó según el método descrito por Lowry *et al.* (1951).

Tabla V. Tiempos de retención obtenidos para cada uno de los aminoácidos. NI: aminoácidos no identificados, NDT: aminoácidos no detectables tras el proceso de derivatización seguido.

<u>L-aminoácido</u>	<u>Tiempo de retención (minutos)</u>
Aspártico	1.14
Glutámico	2.04
Serina	6.70
Histidina	7.96
Glicina	8.60
Treonina	9.04
Alanina	10.48
Arginina	11.01
Tirosina	12.37
Valina	14.45
Metionina	14.67
Isoleucina	16.15
Fenilalanina	16.34
Leucina	16.63
Lisina	16.88
Asparagina	NI
Glutamina	NI
Cisteina	NDT
Prolina	NDT
Triptófano	NDT

5.1.3. Cuantificación de ADP

Se realizó mediante el sistema piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa (PK/LDH) (Spencer *et al.*, 1984). En este método la cuantificación se realiza siguiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm ($-\Delta D.O._{340}$) que se produce debido al consumo de NADH según la siguiente reacción:



La mezcla de reacción, en un volumen final de 500 μl constaba de: Tampón Bifosfatasa, 250 μl ; fosfoenolpiruvato 40 mM, 5 μl ; NADH 5 mM (disuelto en CO_3Na_2 10 mM a pH=10), 10 μl ; muestra, 200 μl y agua destilada, 30 μl . La reacción se desencadenó con 3.5 unidades de piruvato-quinasa y 5 de lactato-deshidrogenasa (5 μl de una solución que contenía 700 y 1000 unidades/ml respectivamente de cada una de las enzimas). La concentración mM de ADP se determina mediante la siguiente ecuación:

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

A= D.O.₃₄₀ antes de desencadenar la reacción

B= D.O. 340 una vez transcurrida la reacción

V_t= volumen total de mezcla de reacción (500 μl)

V_e= volumen de muestra utilizada (200 μl)

E= coeficiente de extinción milimolar del NADH (6.2)

l= paso de luz (1 cm)

5.2. Determinaciones cualitativas

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

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

A partir de un cultivo estacionario en YPD de la cepa indicada 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 las colonias a probar, nunca más de 9 cepas por cada caja. Tras incubar las cajas a la temperatura deseada (22, 30 ó 37°C) las cepas excretoras presentaban un halo de crecimiento del césped alrededor de la colonia sembrada. Durante la realización de esta Tesis, se ha comprobado que el tiempo de aparición del halo depende de la temperatura de incubación, siendo éste menor cuanto más alta sea aquella. Se consideró que una colonia era "no excretora" a una temperatura determinada cuando no se observaba halo de excreción tras 7 días de incubación a esa temperatura.

5.2.2. Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina

Se utilizaron cromatoplasmas de vidrio de 20 x 20 cm con una capa de celulosa de 0.1 mm de espesor suministradas por Merck.

Solventes

Se utilizaron, independientemente, dos solventes diferentes cuya composición volumen/volumen es la siguiente:

- Solvente 1: fenol : agua destilada en proporción 80:20
- Solvente 2: etanol : ácido acético : agua destilada en proporción 65:1:34.

Antes de iniciar la cromatografía con un solvente determinado, es necesario saturar la cubeta con el mismo. Para ello se mantenía el solvente dentro de la cubeta, sellada con vaselina, durante al menos 15 minutos antes de introducir la placa.

Muestras

De cada muestra, que contenía aproximadamente 1 nmol de aminoácido/ μ l, se colocaban 10 μ l sobre la placa de cromatografía a una distancia de 1 cm de uno de los bordes de la misma y separadas 2 cm entre sí. Las muestras se secaban con ayuda de un secador de mano.

Las cromatografías se desarrollaban durante 8 horas transcurridas las cuales el frente se localizaba a unos 17 cm del origen.

Revelado

Se realizó según Atfield y Morris (1961).

El reactivo se preparó mezclando las soluciones A y B. Se rociaba la placa con el reactivo utilizando un pulverizador, y se dejaba secar en una campana durante 30 minutos, transcurridos los cuales, los aminoácidos se revelaban como manchas de color purpúreo.

- Solución A: ácido acético glacial, 1 ml; agua destilada, 5 ml; acetato de cadmio, 50 mg
- Solución B: acetona, 50 ml; ninhidrina, 500 mg

El desplazamiento de un aminoácido (R) se calculó dividiendo la distancia recorrida por el aminoácido en cuestión por la distancia recorrida por el frente de la cromatografía.

6. METODOS GENETICOS

6.1. Tratamientos mutagénicos

6.1.1. Mutagénesis con nitrosoguanidina

Se realizó según el método descrito por Calderón y Cerdá-Olmedo, 1983. Se preparó una solución 1 mg/ml de nitrosoguanidina en agua destilada que se separó en alicuotas de 0.2 ml. Las alicuotas se guardaron congeladas en la oscuridad a -20°C hasta el momento de ser usadas y en ningún caso se volvieron a congelar.

Las células que habían estado creciendo en medio YPD líquido hasta alcanzar la fase estacionaria (aproximadamente 2×10^8 células/ml), se centrifugaron y resuspendieron en tampón tris-maleato 0.05M, $\text{pH}=7.8$. Se añadió nitrosoguanidina a una concentración final de 20 $\mu\text{g/ml}$ y se incubó a 37°C con agitación esporádica durante 10 ó 12 minutos. Al final del tratamiento se diluyó 1ml de la suspensión de células tratadas hasta 10ml con agua destilada estéril. Las células se centrifugaron y se lavaron 2 veces con agua estéril. Las células tratadas se sembraron en los medios apropiados según el tipo de mutantes que se quería obtener. La supervivencia, que en los distintos tratamientos realizados osciló entre el 3% y 48%, se determinó a partir de siembras en YPD antes y después del tratamiento mutagénico.

6.1.2. Mutagénesis con luz ultravioleta

Las células que habían estado creciendo en medio YPD líquido hasta alcanzar la fase estacionaria, se centrifugaron, se lavaron 2 veces y se concentraron de 10 a 50 veces en agua destilada estéril. Se sembraron cajas con 0.1 ml de ésta suspensión de células y se expusieron a luz ultravioleta ($42 \mu\text{w/cm}^2$ según medida realizada en un flujometro Hewlett Packard, modelo 8330-A) entre 5 y 45 segundos. La supervivencia, calculada por siembras de células tratadas y sin tratar en cajas que contenían YPD, fluctuó entre 25 y 0.1% según el tiempo de exposición.

6.2. Obtención de diploides

Se tomaban con sendos palillos de dientes cantidades equivalentes de biomasa de cada uno de los conjugantes, cultivados en medio nutritivo sólido durante 48 horas a 30°C, y se mezclaban sobre una caja del mismo medio extendiéndolos sobre una superficie de aproximadamente 1 cm². Sobre la biomasa extendida se colocaba una gota de agua destilada estéril. La mezcla conjugante se incubaba a 30°C durante 3 a 4 horas. Se comprobó que el proceso había tenido lugar normalmente observando al microscopio la aparición de cigotos.

Para aislar los diploides se utilizaron dos métodos distintos. El uso de uno u otro dependió del genotipo de los conjugantes.

6.2.1. Selección de los diploides

Cuando las dos estirpes conjugantes poseían auxotrofias complementarias, la mezcla conjugante se replicó mediante terciopelo a una caja con medio selectivo en el que sólo podía crecer el diploide formado.

6.2.2. Micromanipulación de cigotos

Este método se utilizó cuando los diploides no eran seleccionables. Mediante un micromanipulador (Lawrence Precision Machines, California) fijado a un microscopio invertido Nikon (modelo MS) y dotado de una microaguja de cristal, se separaban algunos cigotos de la mezcla conjugante, sobre una caja de medio para micromanipulación, cuando estaban emitiendo su primera yema. Estos cigotos tienen una morfología inconfundible (llamada en "flor de lis"). El carácter diploide de las células aisladas fue comprobado por su capacidad de esporular.

6.3. Esporulación

Biomasa de los diploides que se deseaban esporular, se transfirió con un palillo de dientes a una caja de medio de preesporulación extendiéndola sobre una superficie de 1 cm². Se incubó durante 24 horas a 30°C. La biomasa obtenida se transfirió, mediante réplica en terciopelo, a una caja de medio de esporulación que se incubó durante al menos 4 días a 22°C.

6.4. Disecion 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 trataron con helicasa (Johnston y Mortimer, 1959). Una pequeña cantidad de biomasa esporulada se suspendió en una gota de una solución 5 mg/ml de helicasa sobre un trozo de papel de parafina colocado dentro de una caja de Petri vacía y estéril. Se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora y 30 minutos. Posteriormente, una porción de esta gota se extendió con un asa sobre una caja de medio para micromanipulación. Las esporas se separaron mediante micromanipulación cómo se describe en el apartado 6.2.2. Se incubaron a 30°C durante 48 horas y, una vez germinadas, se sembraron en los medios apropiados para determinar su fenotipo y/o genotipo. Cuando se analizaban simultáneamente dos caracteres cada tétrada se denominó como DP, DR o T según la segregación de los caracteres en esa tétrada fuese ditipo parental, ditipo recombinante o tetratipo respectivamente.

6.5. Determinación del sexo

Se utilizaron dos procedimientos distintos. El uso de uno u otro dependió del número de cepas cuyo sexo se quiere identificar.

6.5.1. En un número de bajo de cepas (menos de 10)

Se cruzaban las cepas de sexo desconocido con otras dos de sexos α y α respectivamente (cepas indicadoras que, en esta Tesis, fueron MMY1 y MMY2) tal como se describe en el apartado 6.2.. 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.

6.5.2. En un número alto de cepas (más de 10)

Se sembraba un cespel de 10^7 células sobre cajas de YPD de cada una de las cepas indicadoras. En este caso estas cepas, además de ser de sexo α y α respectivamente, debían tener auxotrofias complementarias a las cepas cuyo sexo se quería determinar. Las cajas se incubaban durante 48 horas a 30°C.

Sobre cajas de medio nutritivo se sembraban las cepas de sexo desconocido en trazos paralelos espaciados 1 cm. Se recoge biomasa de cada una de las cepas indicadoras con el canto de sendas tablillas de madera y se sembraban en trazos perpendiculares a los primeros. Se obtenía así una red en cuyos nudos tenían lugar los cruzamientos en el caso de que las cepas fueran de sexo contrario. Tras incubar las cajas a 30°C durante 24 horas, se seleccionaban los diploides como se describe en el apartado 6.2.1.. El crecimiento de un diploide en el un nudo de la malla indicaba que la cepa era de sexo contrario a aquella por la que se cruzó.

RESULTADOS

CARACTERIZACION DE LAS ACTIVIDADES HOMOSERINA QUINASA Y ASPARTATO QUINASA

En este apartado se describen los ensayos realizados con el objetivo de caracterizar las actividades homoserina quinasa y aspartato quinasa de *Sacch. cerevisiae*. Para ello fue necesario, en primer lugar, poner a punto protocolos de purificación y medida para las mismas.

1. Optimización del método de purificación y medida

1.1. Homoserina quinasa

A continuación se describe la puesta a punto del protocolo de purificación y medida de la actividad homoserina quinasa. Las medidas se realizaron, en principio, a 28°C y pH=7.6 (obtenido con Tampón Hepes a una concentración final de 0.1 M) por ser éstas las condiciones óptimas para el ensayo en *E. coli*. El resto de las condiciones se describen en el apartado 4.1.2. de Métodos excepto que se utilizó DL-homoserina a una concentración final de 2 mM.

1.1.1. Ensayos preliminares

En primer lugar se trató de comprobar la especificidad del ensayo de actividad homoserina quinasa. Para ello, se obtuvo un extracto crudo a partir de un cultivo de la cepa X2180-1A según se describe en el apartado 4.1.1.1. de Métodos, pero, sin someterlo a la ultracentrifugación a 105000 x g y utilizando tampón A. Se midió la cantidad de ADP producida por este extracto en presencia y ausencia de cada uno de los componentes de la mezcla de reacción. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla VI. De ellos se deduce que no existe liberación significativa de ADP en ausencia de extracto crudo, ATP, PEP ó PK/LDH. Por el contrario, la producción medida en ausencia de DL-homoserina constituye aproximadamente un 62% de la producción de la mezcla de reacción completa. Esto implica que durante el curso de la reacción se libera ADP

independientemente del que se produce en presencia de homoserina.

Tabla VI. Especificidad del ensayo de la actividad homoserina quinasa en un extracto crudo de la cepa X2180-1A. mU: nmoles de ADP producidos por minuto y ml.

<u>Mezcla de reacción</u>	<u>Actividad (mU)</u>
completa	1188
sin DL-homoserina	736
sin ATP	81
sin PEP	54
sin PK/LDH	32
sin extracto	5

Para comprobar si la producción de ADP dependiente de homoserina se debía, efectivamente, a la actividad homoserina quinasa, producto del gen *THR1*, se midió la misma en extractos crudos, obtenidos como se describió anteriormente, de las cepas XCR13-5A y CJ1, portadora esta última de un alelo *thr1* y proveniente de la anterior por mutagénesis con NG. El extracto de la cepa CJ1 produce la misma cantidad en presencia que en ausencia de homoserina mientras que la cepa parental, XCR13-5A, se comporta cómo la X2180-1A es decir, sólo un 40% de la producción de ADP depende de la presencia de homoserina en la mezcla. Estos resultados implican que la producción de ADP dependiente de homoserina en la cepa Thr⁺ se debe a actividad homoserina quinasa.

Los siguientes ensayos tenían como fin aumentar la proporción de actividad dependiente de homoserina vs. independiente. Para ello y utilizando la cepa XCR13-5A, se probaron las siguientes condiciones:

1. Realizar un paso de purificación de la enzima precipitándola en la fracción de sulfato amónico 30-45% (P45) según se describe en Métodos pero sin realizar la precipitación con sulfato de protamina.

En esta fracción, Flavin (1962) describió una purificación de 15 veces para la homoserina quinasa de levadura de panadería.

2. Cultivar la cepa en presencia de 20 $\mu\text{g/ml}$ de L-metionina lo que, según está descrito (de Robichon-Szulmajster *et al.*, 1973) induce la síntesis de homoserina quinasa.

3. Ensayar la enzima en presencia de CNK y FNa a una concentración final de 30 y 20 mM respectivamente. Según está descrito (Flavin, 1962) estos compuestos inhiben la actividad de las enzimas responsables de la actividad independiente de homoserina.

Los resultados de estos ensayos realizados tanto con el extracto crudo, cómo con la fracción P45, se muestran en la Tabla VII. De ellos se deduce que en ninguna de las condiciones ensayadas se conseguía un aumento sustancial de la actividad dependiente de homoserina. En consecuencia se planteó la necesidad de llevar a cabo una purificación parcial de la homoserina quinasa.

Tabla VII. Producción de ADP dependiente de homoserina (HS) por extractos de la cepa XCR13-5A. n.d.: no determinado

	<u>Actividad dependiente de HS</u>	
	<u>Extracto crudo</u>	<u>Fracción P45</u>
Control	43%	33%
Cultivo con L-met	37%	n.d.
Ensayo con FNa y KCN	n.d.	26%

1.1.2. Purificación parcial

Se siguió el protocolo descrito en el apartado 4.1.1. de Métodos. La Tabla VIII resume los resultados obtenidos tras cada uno de los pasos de purificación.

De los resultados se deduce que con la purificación de la homoserina quinasa obtenida (tres veces aproximadamente) la actividad no dependiente de homoserina disminuyó hasta un 12%. En adelante, pues, se utilizó la fracción P45 para los ensayos de esta actividad.

1.1.3. Optimización de la medida de actividad

A continuación se describen los ensayos realizados con el propósito de fijar las condiciones óptimas para la medida de la actividad homoserina quinasa. Se variaron 3 parámetros: volumen de fracción, pH del ensayo y temperatura a la que se llevaba a cabo la reacción.

Volumen de fracción

Según se observa en la Figura 4, la actividad homoserina quinasa aumenta linealmente con el volumen de fracción utilizado (entre 25 y 100 μ l). A partir de este momento, para las medidas de actividad se utilizaron volúmenes de fracción comprendidos en este intervalo.

pH

Se ensayó la actividad homoserina quinasa en mezclas de reacción preparadas a pH comprendidos entre 6.5 y 8.8 con Tampón Hepes a una concentración final de 0.4 M. Según se desprende de la Figura 5 la actividad óptima se consigue a pH=7.5. Así, en adelante las medidas de actividad se realizaron a este pH.

Tabla VIII. Purificación parcial de la homoserina quinasa de la cepa XCR13-5A. HS: DL-homoserina. Cada medida de actividad es la media entre dos ensayos independientes.

Fracción	mU totales	(1) % Recuperación	Cantidad de proteína (mg . ml ⁻¹)	Actividad específica (mU . mg proteína ⁻¹)	Actividad dependiente de HS
Extracto crudo	6734	-	4.57	80	45%
Sulfato protamina	4989	78.0	3.21	75	48%
P45	2352	49.0	1.51	259	88%
P30	6	0.1	1.07	6	44%

(1) % de actividad recuperada respecto a la existente en el paso de purificación anterior.

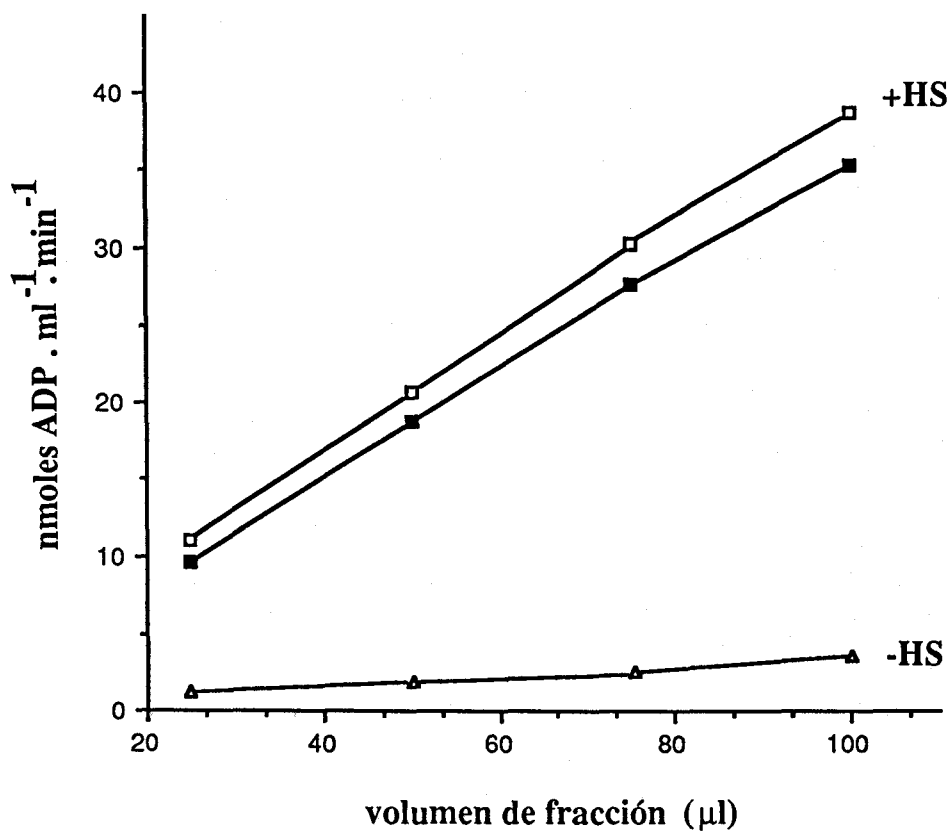


Figura 4. Variación de la actividad homoserina quinasa de la cepa XCR13-5A con el volumen de fracción P45. (■) Cantidad total de ADP liberada; (▲) cantidad de ADP liberada en ausencia de DL-homoserina (2 mM); (■) cantidad de ADP liberada como efecto de la actividad homoserina quinasa, calculada restando las anteriores.

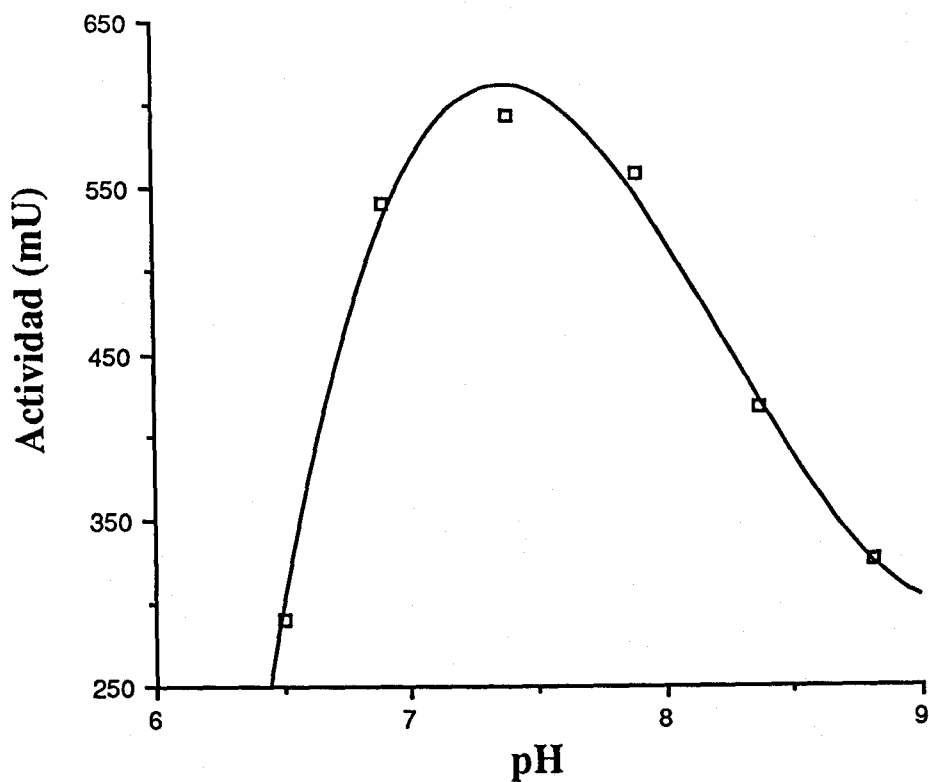


Figura 5. Variación de la actividad homoserina quinasa de la cepa XCR13-5A con el pH.

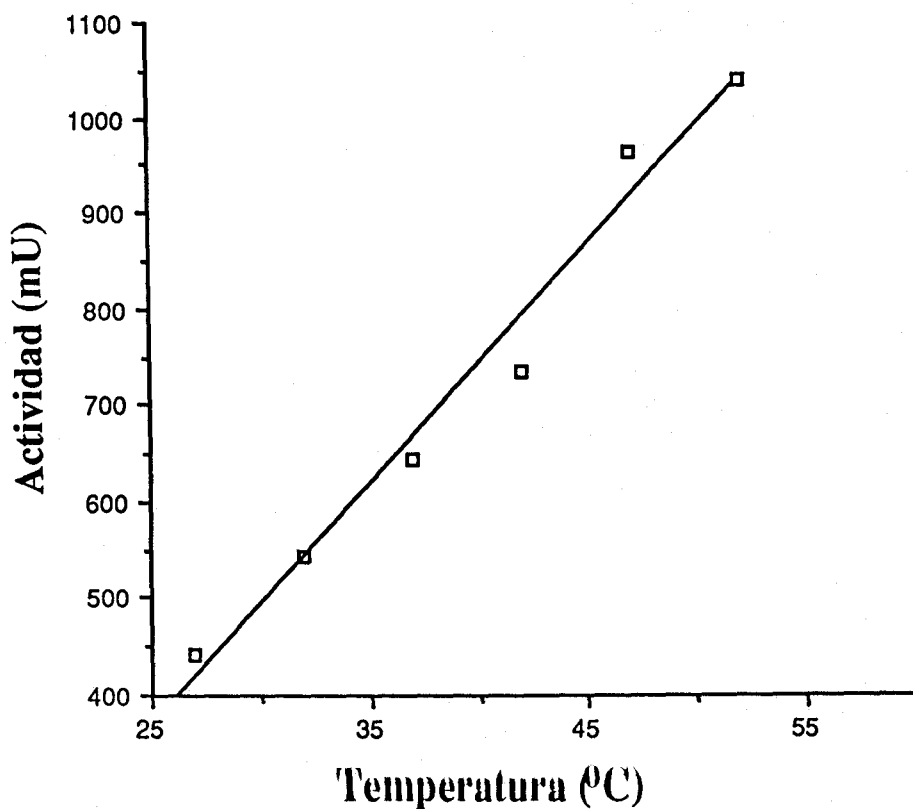


Figura 6. Variación de la actividad homoserina quinasa de la cepa XCR13-5A con la temperatura.

Temperatura

Se midió la actividad homoserina quinasa en mezclas de reacción mantenidas a temperaturas comprendidas entre 27°C y 52°C; el tiempo de reacción fue siempre inferior a 5 minutos. Como se observa en la Figura 6, en las condiciones citadas, la actividad homoserina quinasa aumenta linealmente con la temperatura. Para ensayos posteriores se seleccionó 30°C por ser la temperatura fisiológica de *Sacch. cerevisiae*.

Así, resumiendo los resultados anteriores, en adelante las mezclas de reacción utilizadas para medir la actividad homoserina quinasa se prepararon a pH= 7.5 y utilizando volúmenes de fracción comprendidos entre 25 y 100µl; las reacciones se siguieron a 30°C.

1.2. Aspartato quinasa

Una vez puesto a punto el método de purificación parcial y medida para la homoserina quinasa se trató de hacer un estudio similar para la aspartato quinasa. Para ello y sobre la base de que en *E. coli* la purificación parcial de ambas enzimas se realiza de modo similar (Thèze *et al.* 1974), se estudió si en la misma fracción utilizada para ensayar la homoserina quinasa existía también actividad aspartato quinasa. Según está descrito, la aspartato quinasa de *Sacch. cerevisiae* no varía su actividad a pH comprendidos entre 5 y 9 siendo habitual realizar los ensayos a pH 8.1 (Black, 1962). Con el fin de tratar de unificar las condiciones de purificación y ensayo de la homoserina quinasa y la aspartato quinasa, se ensayó esta última actividad a pH 8.1 (Tampón Tris HCl 0.1M) y a 7.5 (Tampón Hepes 0.1M). El resto de las condiciones del ensayo se describen en Métodos. La Tabla IX muestra los resultados obtenidos.



Tabla IX. Purificación parcial y medida de la aspartato quinasa de la cepa X2180-1A. ASP: L-aspartato 10 mM.

Fracción	pH	Cantidad de proteína (mg · ml ⁻¹)	Actividad dependiente de ASP	Actividad específica (mU · mg proteína ⁻¹)
P45	8.1	3.65	86%	146
	7.5		91%	162
P30	8.1	1.69	71%	22

De la Tabla IX se deduce que la actividad aspartato quinasa está presente en el P45 (aproximadamente un 90% de la actividad total medida) y no varía significativamente a los pH ensayados. En consecuencia, se pueden purificar las actividades homoserina quinasa y aspartato quinasa en la misma fracción, ambas pueden ensayarse mediante el mismo método y al mismo pH cambiando únicamente el sustrato específico de cada enzima, L-homoserina y L-aspartato respectivamente.

1.3. Especificidad de los ensayos

La aspartato quinasa y homoserina quinasa se sintetizan a partir de los genes *HOM3* y *THR1* respectivamente. Para comprobar la especificidad del ensayo puesto a punto, se midieron ambas actividades en dos cepas *hom3 THR1* (D160-2C y S220-6D) y una *thr1 HOM3* (F15). Para igualar las condiciones de crecimiento todas las cepas se cultivaron en presencia de todos los requerimientos de cada una de ellas (adenina, L-arginina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-metionina, L-treonina, L-triptófano y uracilo). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla X.

Tabla X. Actividades aspartato quinasa (ASPK) y homoserina quinasa (HSK) en cepas *HOM3 thr1* y *hom3 THR1*. [DL-homoserina]= 2 mM, [L-aspartato]= 5 mM.

Cepa	Genotipo	Cantidad de proteína (mg · ml ⁻¹)	Actividad específica (mU · mg proteína ⁻¹)	
			HSK	ASPK
F15	<i>HOM3 thr1</i>	4.42	0	225
D160-2C	<i>hom3 THR1</i>	3.96	108	6
S220-6D	<i>hom3 THR1</i>	1.41	113	11

De estos resultados se deduce que los ensayos puestos a punto para la medida de ambas actividades enzimáticas son específicos para las mismas.

2. Cinética de sustratos

Los estudios realizados hasta el momento sobre las actividades homoserina quinasa y aspartato quinasa se habían llevado a cabo sin determinar previamente los parámetros cinéticos de las mismas con respecto a cada uno de sus sustratos. Se consideró adecuado determinar estos parámetros debido a la gran utilidad que el conocimiento de los mismos podía ofrecer para caracterizaciones posteriores de ambas actividades enzimáticas.

A continuación se describen estudios sobre la variación de la velocidad inicial de ambas enzimas, obtenidas a partir de la cepa X2180-1A, en función de la concentración de cada uno de sus sustratos manteniendo el otro a una concentración constante.

2.1. Homoserina quinasa

2.1.1. Variación de la velocidad con la concentración de L-homoserina

En la Figura 7a se representa la velocidad inicial de la reacción frente a la concentración de L-homoserina.

La cinética de saturación de la homoserina quinasa por la L-homoserina es hiperbólica solo a concentraciones por debajo de 0.5 mM. Por encima de esta concentración, la L-homoserina produce una inhibición parcial de la actividad de modo que a la mayor concentración de L-homoserina probada (100 mM) la velocidad es un 47% de la velocidad máxima. La representación de los datos obtenidos mediante la transformación de Lineweaver-Burk (Figura 7b) permite calcular la constante de Michaelis (K_M) aparente y la constante de inhibición (K_i) de la homoserina quinasa por la L-homoserina (Cleland, 1970) siendo estas de 0.25 y 2 mM respectivamente.

2.1.2. Variación de la velocidad con la concentración de ATP

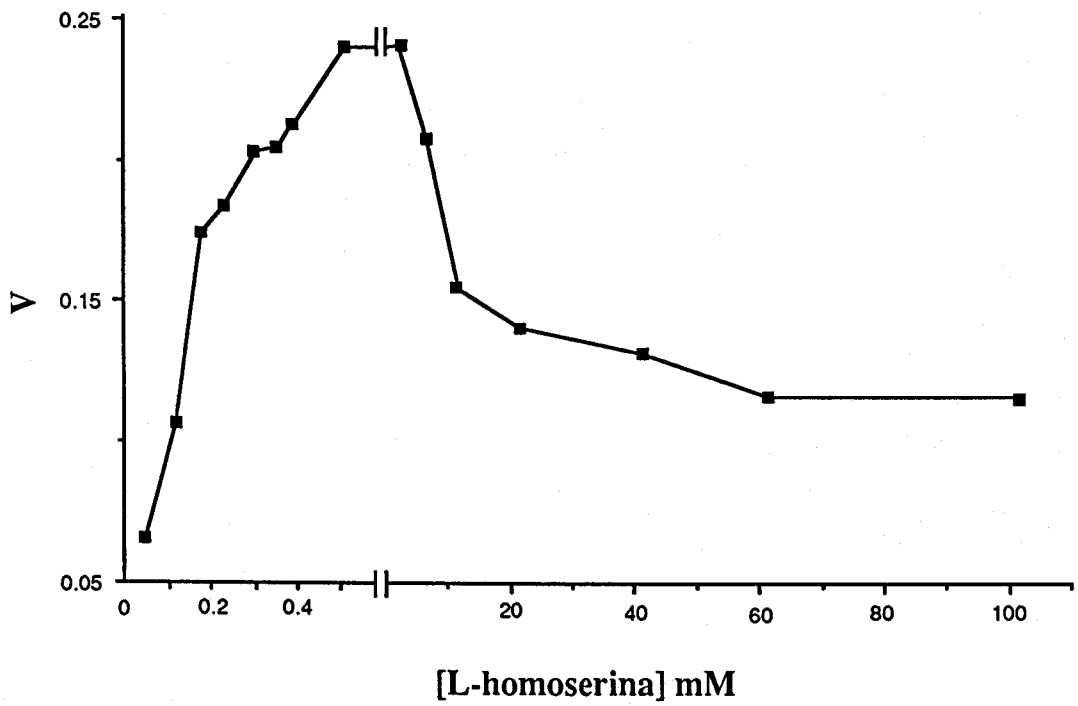
En la Figura 8 se representa la velocidad inicial obtenida en función de la concentración de ATP mediante la transformación de Lineweaver-Burk. La homoserina quinasa sigue una cinética normal de saturación de tipo Michaelis-Menten con respecto al ATP con $K_m = 0.6$ mM.

2.2. Aspartato quinasa

2.2.1. Variación de la velocidad con la concentración de L-aspartato y ATP

En las Figuras 9 y 10 se representa, según la transformación de Lineweaver-Burk, la variación de la velocidad inicial en función de las concentraciones de L-aspartato y ATP respectivamente. De ellas se desprende que la aspartato quinasa sigue una cinética normal de saturación de tipo Michaelis-Menten respecto a sus dos

(a)



(b)

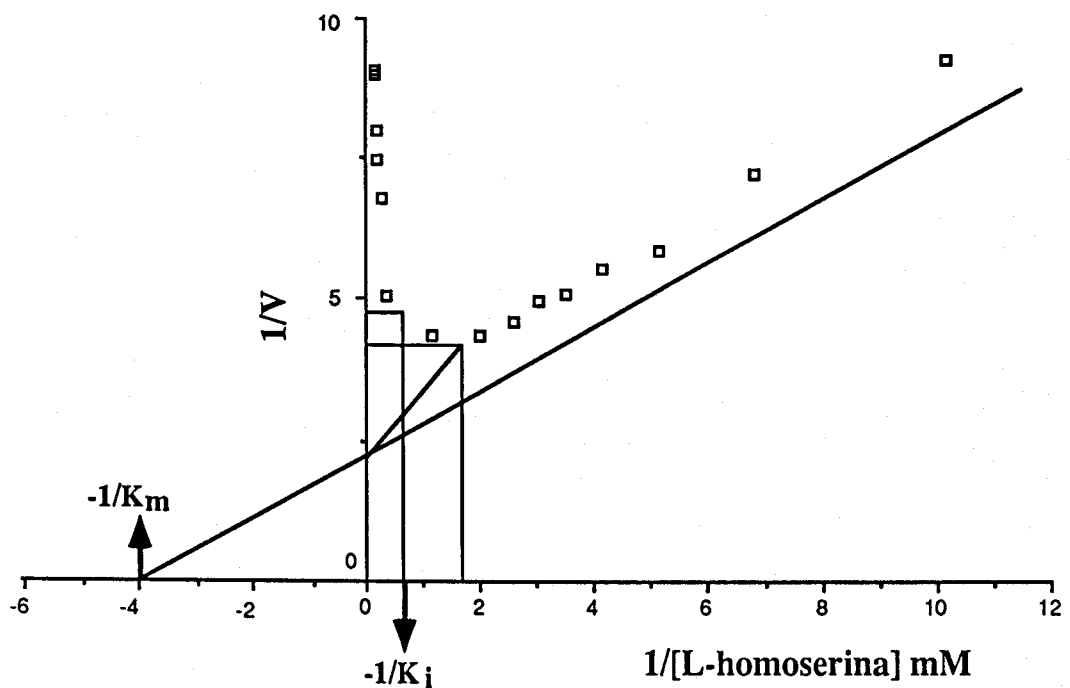


Figura 7. Variación de la actividad homoserina quinasa de la cepa X2180-1A con la concentración de L-homoserina. (a) Representación directa. (b) Representación de Lineweaver-Burk. V : velocidad inicial ($-\Delta D.O.340nm/min$). Cada medida es la media de los resultados obtenidos en dos experimentos independientes. La desviación típica fue siempre menor al 7%. La concentración de ATP se mantuvo constante a 5 mM.

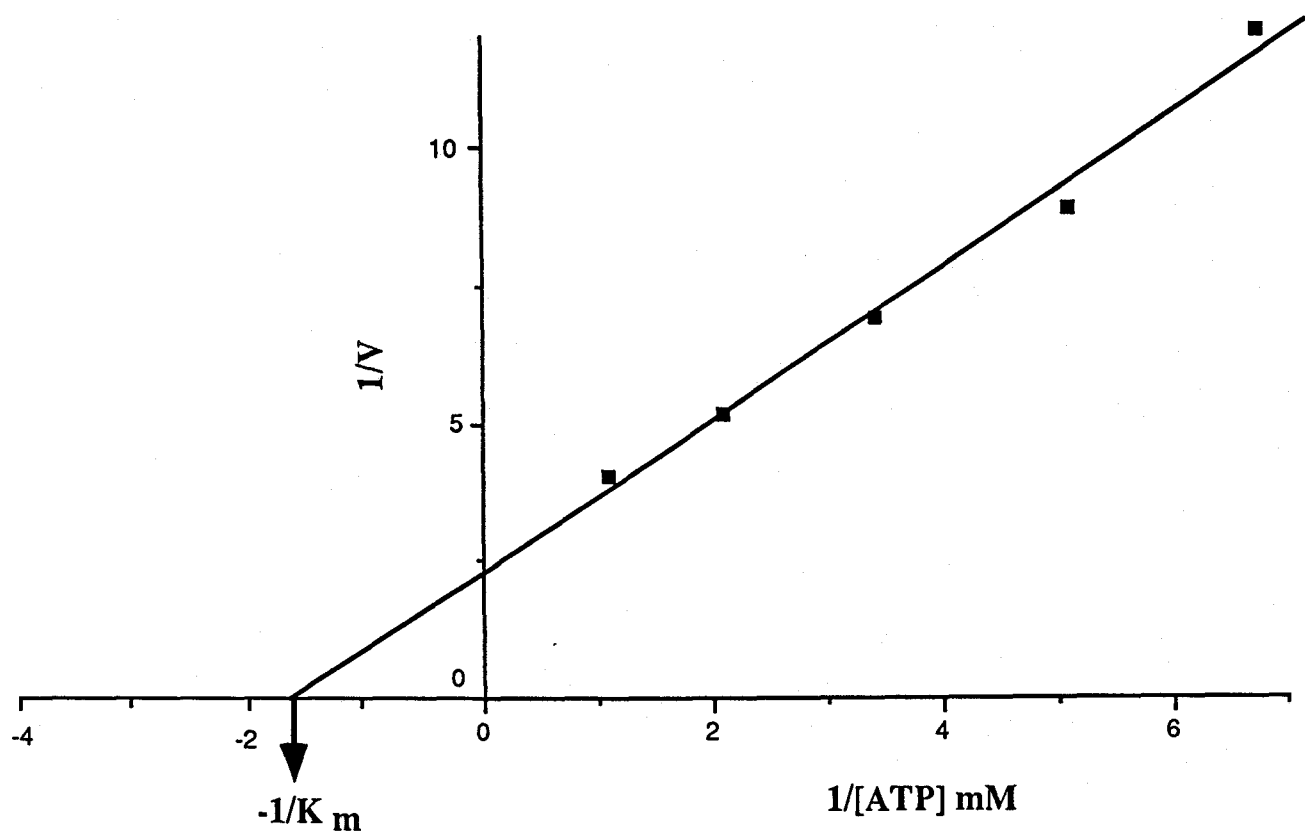


Figura 8. Variación de la actividad homoserina quinasa de la cepa X2180-1A con la concentración de ATP. V: velocidad inicial ($-\Delta D.O.340_{nm}/min.$). La concentración de L-homoserina se mantuvo constante a 1 mM.

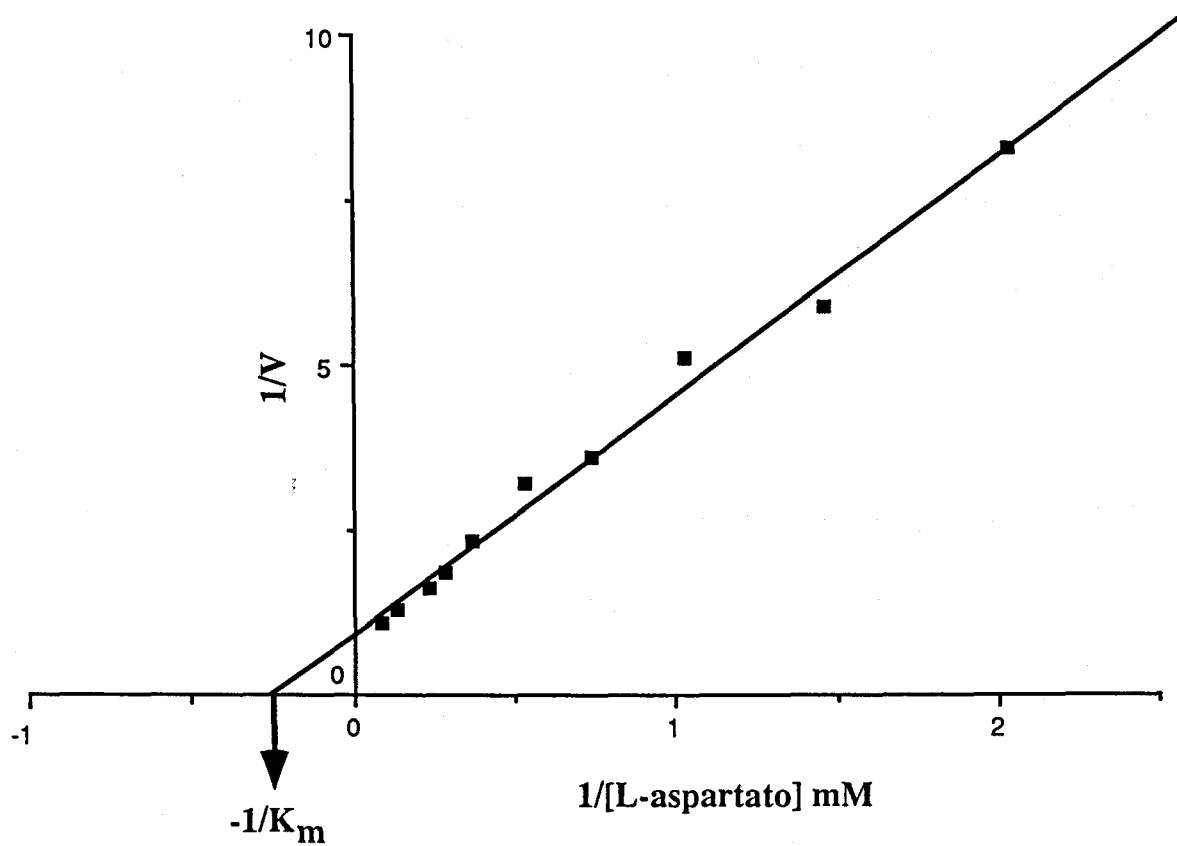


Figura 9. Variación de la actividad aspartato quinasa de la cepa X2180-1A con la concentración de L-aspartato. V: velocidad inicial ($-\Delta D.O.340\text{nm}/\text{min.}$). La concentración de ATP se mantuvo constante a 10 mM.

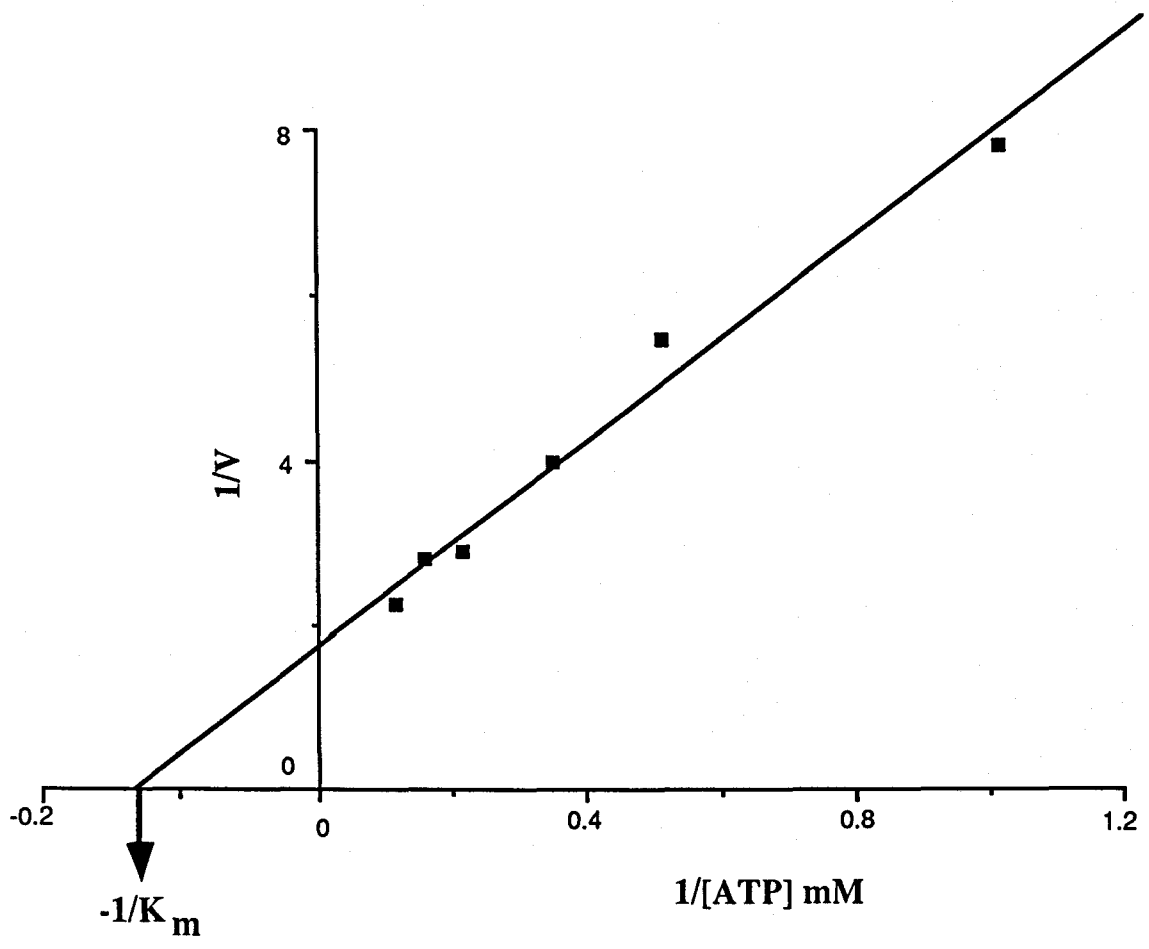


Figura 10. Variación de la actividad aspartato quinasa de la cepa X2180-1A con la concentración de ATP. V: velocidad inicial ($-\Delta D.O.340\text{nm}/\text{min.}$). Cada valor es la media de los obtenidos en dos experimentos independientes, la desviación típica fue siempre inferior al 11%. La concentración de L-aspartato se mantuvo constante a 10 mM.

sustratos, L-aspartato y ATP siendo las K_m calculadas de 4 mM y 3.6 mM respectivamente.

3. Regulación de las actividades enzimáticas

3.1. Aminoácidos relacionados con la ruta de biosíntesis de la treonina.

Con el fin de estudiar *in vitro* el efecto de distintos aminoácidos sobre las actividades homoserina quinasa y aspartato quinasa, se llevaron a cabo los experimentos que se describen a continuación. Se probaron aminoácidos relacionados con la ruta de biosíntesis de la treonina a más de hidroxinorvalina, α -amino- β -hidroxivalerato, un análogo tóxico de la treonina (ver Tabla XI). Se preparaban mezclas de reacción según se ha descrito en apartados anteriores a las cuales se añadía el aminoácido en cuestión a diferentes concentraciones finales y se medía en ellas la velocidad inicial de cada una de las enzimas. El sustrato específico de cada enzima se añadía a concentración final igual a la K_m de la enzima para dicho sustrato (0.25 mM de L-homoserina para ensayar la actividad homoserina quinasa y 4mM de L-aspartato para la aspartato quinasa). El ATP se usaba a concentración saturante (5 mM o 10 mM para ensayar la homoserina quinasa o la aspartato quinasa respectivamente). La velocidad en presencia de un aminoácido, se comparaba con la obtenida en ausencia del mismo a la cual se asignaba el 100% de actividad.

Ambas enzimas se obtuvieron a partir de la cepa X2180-1A, pero para estudiar el efecto de la L-homoserina sobre la actividad aspartato quinasa, se consideró adecuado utilizar además una cepa carente de actividad homoserina quinasa, F15 (*thr1 HOM3*).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XI. Según se desprende de ellos, de los aminoácidos naturales, únicamente la L-treonina afecta significativamente tanto la actividad homoserina quinasa, cómo la aspartato quinasa. La hidroxinorvalina a concentración 50 mM, inhibe la actividad aspartato quinasa en aproximadamente un 90% no ejerciendo un efecto significativo sobre la actividad homoserina quinasa. La inhibición descrita por L-

Tabla XI. Inhibición de las actividades homoserina quinasa y aspartato quinasa por aminoácidos relacionados con la ruta de biosíntesis de la treonina. nd: no determinado.

aminoácido	concentración mM	% Inhibición		
		homoserina quinasa		aspartato quinasa
		X2180-1A <i>THR1 HOM3</i>	X2180-1A <i>THR1 HOM3</i>	F15 <i>thr1HOM3</i>
L-treonina	20 2	62 34	94 nd	70 nd
Hidroxinorvalina	50 5	11 nd	93 29	83 nd
L-metionina	20	13	15	0
L-isoleucina	20	17	25	0
L-valina	20 2	24 0	5 nd	0 nd
L-serina	20 2	17 0	1 nd	0 nd
L-homoserina	20	27	2	0
L-lisina	20	nd	nd	0

homoserina y L-lisina sobre la actividad aspartato quinasa (de Robichon-Szulmajster y Corrivaux, 1963) no fue observada.

3.2. Inhibición por L-treonina e hidroxinorvalina

Para estudiar más en detalle las inhibiciones ejercidas por la L-treonina y la hidroxinorvalina sobre las actividades homoserina quinasa y aspartato quinasa, se prepararon mezclas de reacción a las que se añadían distintas concentraciones de dichos aminoácidos. Se utilizaron concentraciones comprendidas entre 1 a 40 mM para la L-treonina y entre 1 a 50 mM para la hidroxinorvalina. La velocidad inicial de cada una de las enzimas se midió utilizando las condiciones descritas en el apartado anterior.

Los resultados se muestran en la Figura 11. De ellos se extrajeron las constantes de inhibición (K_i) de la L-treonina sobre ambas actividades y de la hidroxinorvalina sobre la actividad aspartato quinasa que resultaron ser:

K_i de la L-treonina sobre la aspartato quinasa: 4 mM

K_i de la L-treonina sobre la homoserina quinasa: 14 mM

K_i de la hidroxinorvalina sobre la aspartato quinasa: 8.5 mM

Según estos resultados, la actividad aspartato quinasa tiene un papel más importante que la homoserina quinasa en la regulación de la biosíntesis de treonina.

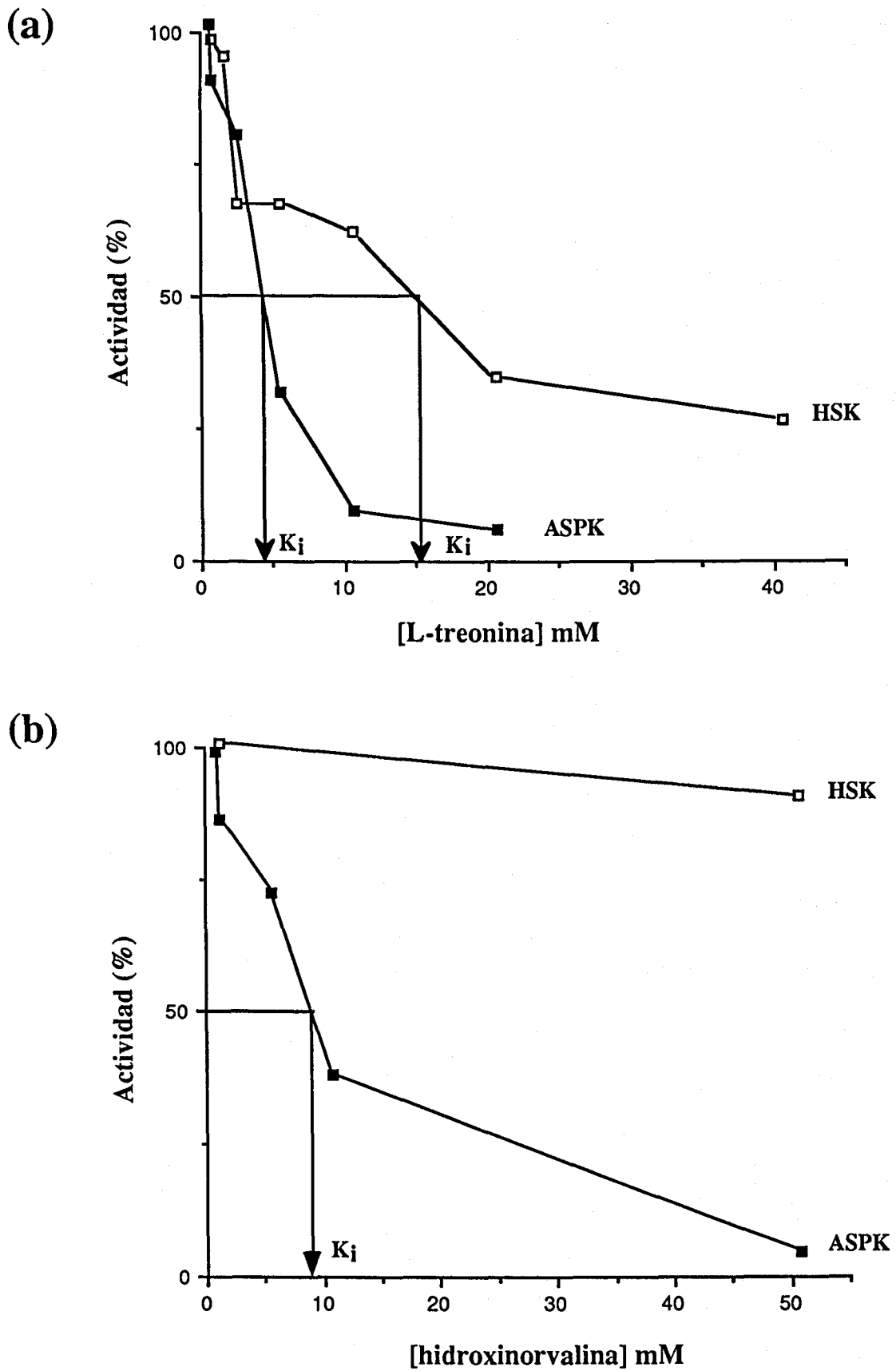


Figura 11. Inhibición por L-treonina (a) e hidroxinorvalina (b) sobre las actividades homoserina quinasa (HSK) y aspartato quinasa (ASPK) de la cepa X2180-1A.

ACTIVIDAD TREONINA SINTETASA

En este apartado se describe la puesta a punto de un método para la medida de la actividad treonina sintetasa, actividad que, hasta el momento, no había sido nunca ensayada en levaduras. Esta actividad enzimática había sido asignada al gen *THR4* por no existir ninguna otra auxotrofia satisfecha por sólo treonina (de Robichon-Szulmajster *et al.*, 1966).

1. Obtención y purificación de homoserina-fosfato

En primer lugar fue necesario sintetizar *in vitro* homoserina-fosfato, precursor no comercial de la treonina-sintetasa. Este compuesto se preparó a partir de DL-homoserina y ATP utilizando homoserina quinasa de *Sacch. cerevisiae*. La purificación se llevó a cabo mediante precipitación con bario-etanol seguida de cromatografía de intercambio iónico según se describe en el apartado 4.2.1. de Métodos.

1.1. Identificación de aminoácidos en las fracciones procedentes de la cromatografía de intercambio iónico.

1.1.1. Aminoácidos totales

Mediante el método de la ninhidrina (apartado 5.1.1.1. de Métodos) se determinó la cantidad de aminoácidos presente en alícuotas de las 70 fracciones recogidas de la cromatografía. En la Figura 12 se representa la concentración de aminoácidos presente en cada una de estas fracciones. Las 24 primeras fracciones, correspondientes a la entrada de la muestra en la columna, desarrollaron el color púrpura indicador de la presencia de grupos α -amino en las mismas. La D.O._{570nm} desarrollada por dichas fracciones fue superior a 1.7. Este valor correspondía a la máxima concentración de aminoácidos utilizada para la realización de la curva patrón (1 μ mol/ml) y está en el límite de la resolución del espectrofotómetro. Se podría deducir, pues, que la concentración de

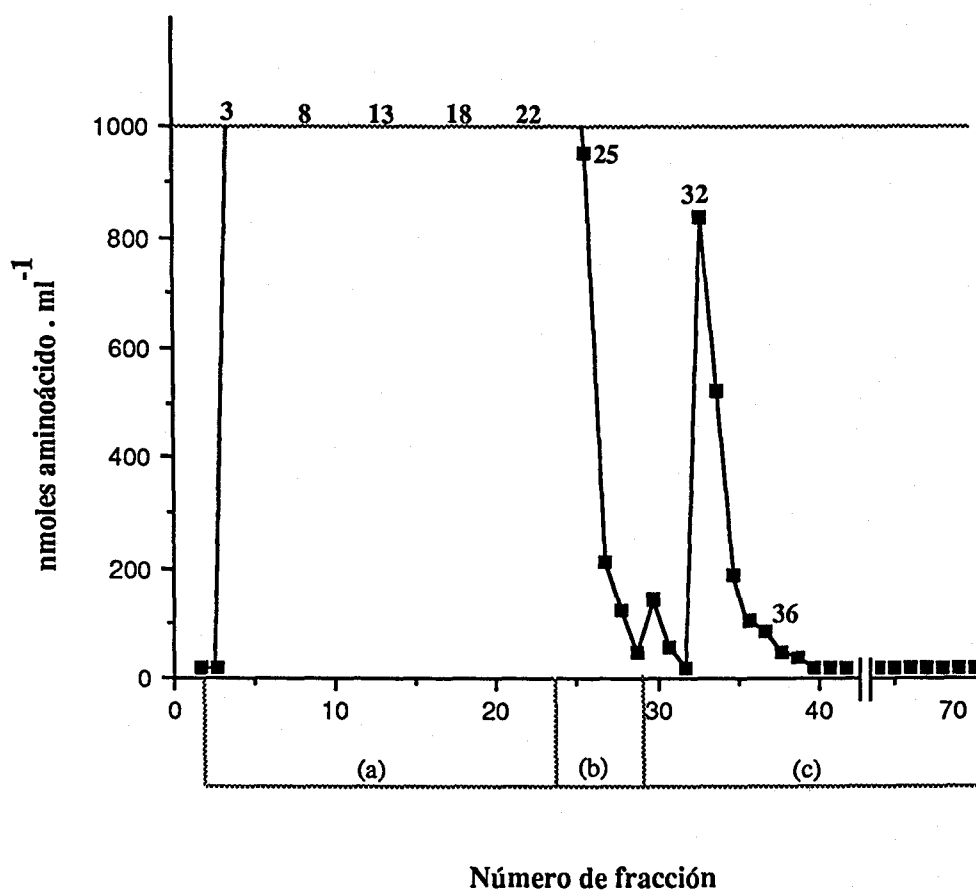


Figura 12. Purificación de homoserina-fosfato. Concentración de aminoácidos en las fracciones procedentes de la cromatografía de intercambio iónico. (a) Fracciones recogidas durante la entrada de muestras en la columna. (b) Fracciones recogidas durante el lavado con ácido fórmico 10 mM. (c) Fracciones recogidas durante el lavado con ácido fórmico 0.5 M.

aminoácido/s presente en las fracciones anteriormente descritas es superior a $1\mu\text{mol/ml}$.

Las fracciones 25 a 28, recogidas durante el lavado de la columna con ácido fórmico 10 mM presentaban una concentración decreciente de aminoácido/s. Durante el lavado con ácido fórmico 0.5M apareció un pico entre las fracciones 31 a 39 correspondiente a $5.6\mu\text{moles de aminoácido/ml}$. El resto de las fracciones recogidas no desarrolló color.

Así pues, mediante la cromatografía de intercambio iónico, los aminoácidos presentes en la mezcla utilizada para la síntesis de homoserina-fosfato se han separado en dos fracciones: de la 3 a la 28 y de la 32 a la 36.

1.1.2. Homoserina-fosfato y homoserina

Para identificar la composición en aminoácido/s de las fracciones descritas en el apartado anterior, se utilizaron dos métodos diferentes: cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

(1) Fracciones correspondientes a la entrada de muestras

Alicuotas de las fracciones 3, 8, 13, 18 y 22 se sometieron a ambos métodos de cromatografía. Como control se utilizaron soluciones que contenían distinta concentración de DL-homoserina.

Cromatografía en capa fina

Se realizó según se describe en Métodos. Según se muestra en la Figura13, en todas las fracciones analizadas existía un aminoácido cuyo desplazamiento coincidía aproximadamente con el descrito por Watanabe y Shimura (1956) para la homoserina-fosfato en las mismas condiciones ($R=0.04$). Además, en todas ellas existía una pequeña cantidad de otro aminoácido cuyo desplazamiento coincidía exactamente con el de la DL-homoserina ($R=0.43$).

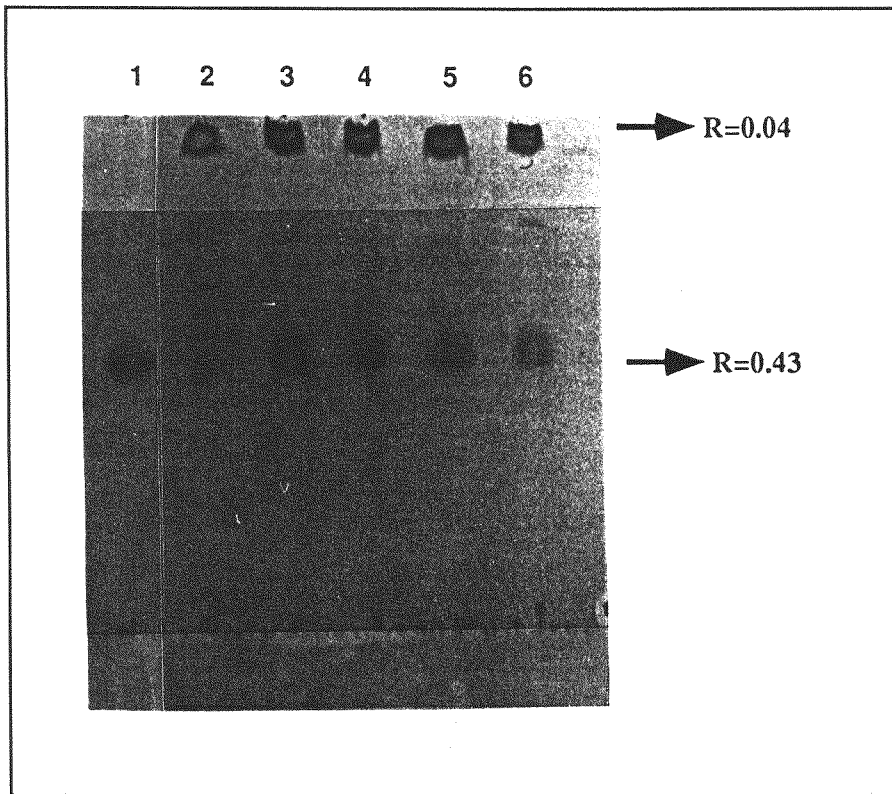


Figura 13. Identificación de aminoácidos mediante cromatografía en capa fina de fracciones procedentes de la cromatografía de intercambio iónico. Solvente utilizado: 1 (fenol : agua destilada, 80:20). Carril 1, 10 nmoles de DL-homoserina; carril 2, fracción 3; carril 3, fracción 8; carril 4, fracción 13; carril 5, fracción 18; carril 6, fracción 22.

HPLC

Los cromatogramas de todas las fracciones presentaban 3 picos, 2 de ellos solapados con tiempos de retención (t_r) de aproximadamente 0.78 y 1.10 minutos, y otro con $t_r=8.31$ minutos. La retención de este último pico coincide exactamente con el de la DL-homoserina. Un ejemplo de este tipo de cromatograma aparece en la Figura 15a.

(2) Fracción 32-36

Esta fracción se obtuvo mezclando las fracciones 32 a 36 que corresponden al pico aparecido tras la elución de la columna con ácido fórmico 0.5 M.

Cromatografía en capa fina

La Figura 14 muestra los resultados de someter a la fracción 32-36 a cromatografía en capa fina utilizando el solvente 1 (Figura 14a, carriles 5, 6 y 7) o el solvente 2 (Figura 14b, carriles 5, 6 y 7).

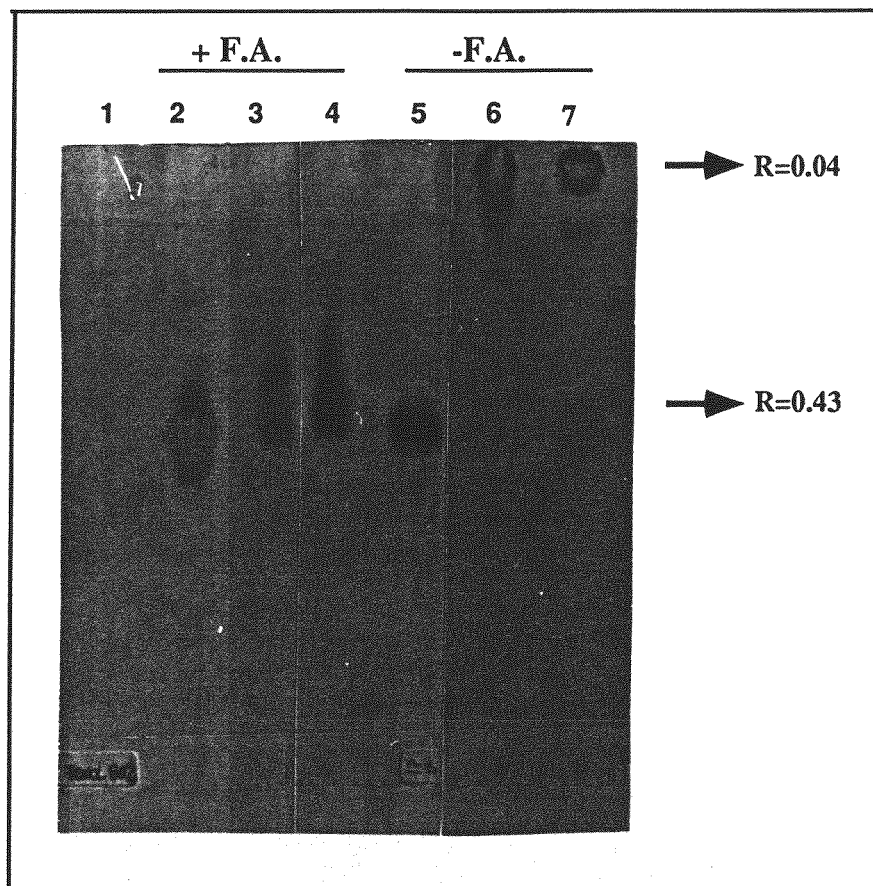
La fracción 32-36 contiene únicamente un aminoácido cuyo desplazamiento con el solvente 1 fue idéntico al del componente mayoritario existente en las fracciones correspondientes a la entrada de muestras en la columna ($R=0.04$). Con el solvente 2 el desplazamiento obtenido para dicho aminoácido fue de $R=0.48$. El desplazamiento de este compuesto no coincide con el de la DL-homoserina (carril 5 en ambas figuras).

HPLC

El cromatograma de esta fracción presentaba los mismos 3 picos presentes en los correspondientes a las fracciones recogidas durante la entrada de muestras en la columna.

De todos estos resultados se concluye que todas las fracciones analizadas presentan los mismos componentes:

(a)



(b)

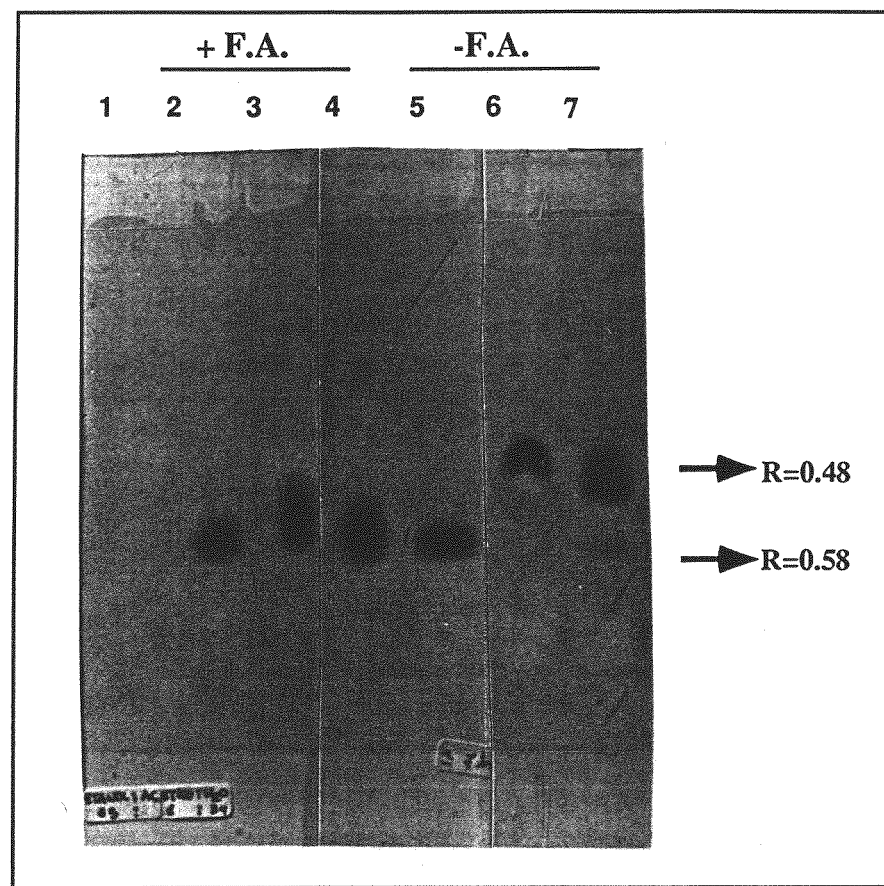


Figura 14. Identificación de aminoácidos tras cromatografía en capa fina de fracciones procedentes de la cromatografía de intercambio iónico. (a) Solvente 1 (fenol : agua destilada, 80:20). (b) Solvente 2 (etanol : ácido acético : agua destilada, 65:1:34). Carril 1, 85 mU de fosfatasa alcalina; carriles 2 y 6, fracción 32-36; carriles 3 y 7, fracción 8; carriles 4 y 5, 10 nmoles de DL-homoserina. +F.A. y -F.A., fracciones tratadas y sin tratar con fosfatasa alcalina. El pH de todas las muestras se ajustó a 7 con KOH.

- Un componente minoritario que se trata muy probablemente de homoserina, no eliminada totalmente en la precipitación con bario-etanol. Este componente no fue detectado en la fracción 32-36 mediante cromatografía en capa fina, sin embargo, aparece cuando la misma se analiza mediante HPLC, método de mayor sensibilidad que el anterior.

- Un componente mayoritario, detectable por ambos métodos en todas las fracciones analizadas, que se trata probablemente de homoserina-fosfato pues su desplazamiento en cromatografía de capa fina coincide con el descrito para éste compuesto.

Tratamientos con fosfatasa alcalina

Para identificar el componente mayoritario antes descrito, se trataron las fracciones 8 y 32-36 con fosfatasa-alcalina y se sometieron a cromatografía en capa fina. Como control se cromatografiaron 10 nmoles de DL-homoserina y 83 mU de fosfatasa-alcalina. Las Figuras 14a y 14b muestran los resultados obtenidos utilizando los solventes 1 y 2 respectivamente.

Según los resultados de la cromatografía en capa fina, la fracción 8 presentaba 2 aminoácidos antes del tratamiento, uno mayoritario ($R=0.04$ con el solvente 1 y $R=0.48$ con el solvente 2) y otro minoritario ($R=0.43$ y $R=0.58$ con los solventes 1 y 2 respectivamente), mientras que la fracción 32-36 presentaba únicamente un aminoácido correspondiente al mayoritario de la fracción 8.

Con el tratamiento enzimático desaparecía el componente mayoritario de todas las muestras presentando éstas sólo un aminoácido cuyo desplazamiento coincidía con el de la DL-homoserina ($R=0.43$ con el solvente 1 y $R=0.58$ con el solvente 2). Se puede así concluir que el componente mayoritario es homoserina-fosfato que se transforma en homoserina mediante la eliminación del grupo fosfato llevada a cabo por la fosfatasa-alcalina.

Respecto de los resultados de las cromatografías por HPLC, está claro que el pico minoritario corresponde a homoserina. Los picos solapados tienen dos posibles orígenes:

1- Que se trate de dos aminoácidos diferentes: homoserina-fosfato y otro aminoácido indetectable mediante cromatografía en capa fina en las condiciones utilizadas.

2- Que se trate de un solo aminoácido, presumiblemente homoserina-fosfato, retenido a dos tiempos diferentes.

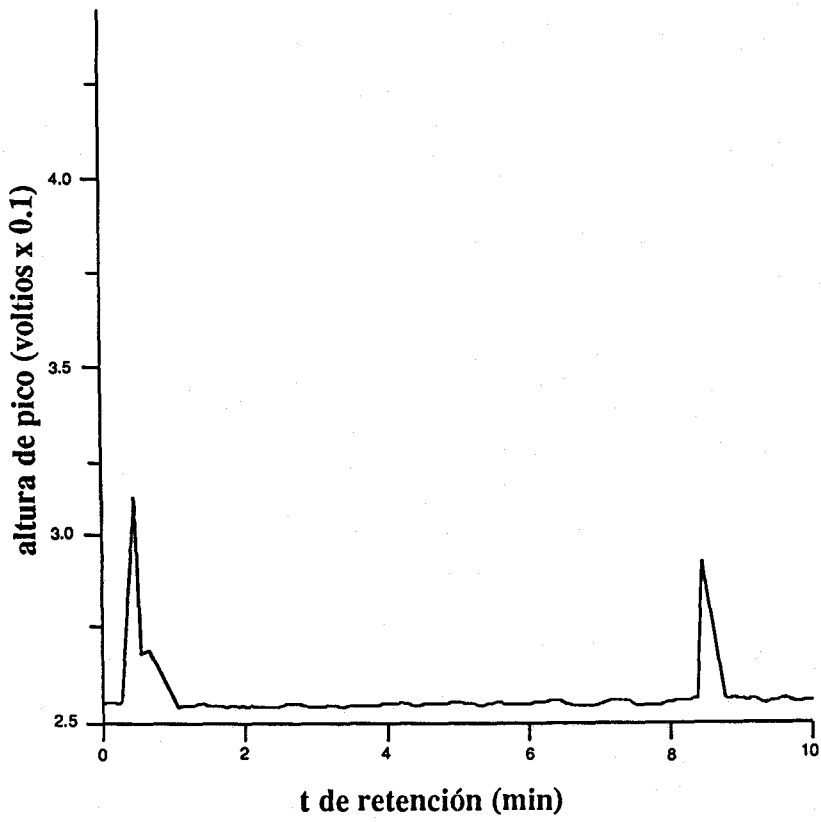
Para probar estas dos hipótesis se realizó un tratamiento con fosfatasa alcalina de una muestra que contenía una mezcla de las fracciones 8, 13, 18 y 22 (fracción 8-22). La fracción antes y después del tratamiento se sometió a cromatografía por HPLC. Como control se utilizaron soluciones de Tris y fosfatasa-alcalina a la misma concentración utilizada para la realización del tratamiento enzimático. No se observó interferencia alguna de los derivados de estos compuestos con ninguno de los 3 picos de interés para este ensayo ($t_r=0.79$, 1.10 y 8.31 minutos).

Según se muestra en la Figura 15, con el tratamiento enzimático de la fracción 8-22 desaparecieron simultáneamente los picos con $t_r=0.78$ y 1.10 minutos aumentando el área del pico correspondiente a homoserina ($t_r=8.31$). De estos resultados se deduce que ambos picos se corresponden a un solo aminoácido, homoserina-fosfato, que es transformado por la fosfatasa alcalina en homoserina.

Cuantificación de homoserina-fosfato y homoserina

La cantidad de homoserina de la fracción 8-22, que resultó ser de 363 nmoles/ml, se calculó realizando una curva patrón con DL-homoserina; la de homoserina-fosfato, que resultó ser de 1497 nmoles/ml, se calculó utilizando el pico correspondiente a homoserina después del tratamiento con fosfatasa-alcalina previa sustracción del área del pico de homoserina antes del tratamiento.

(a)



(b)

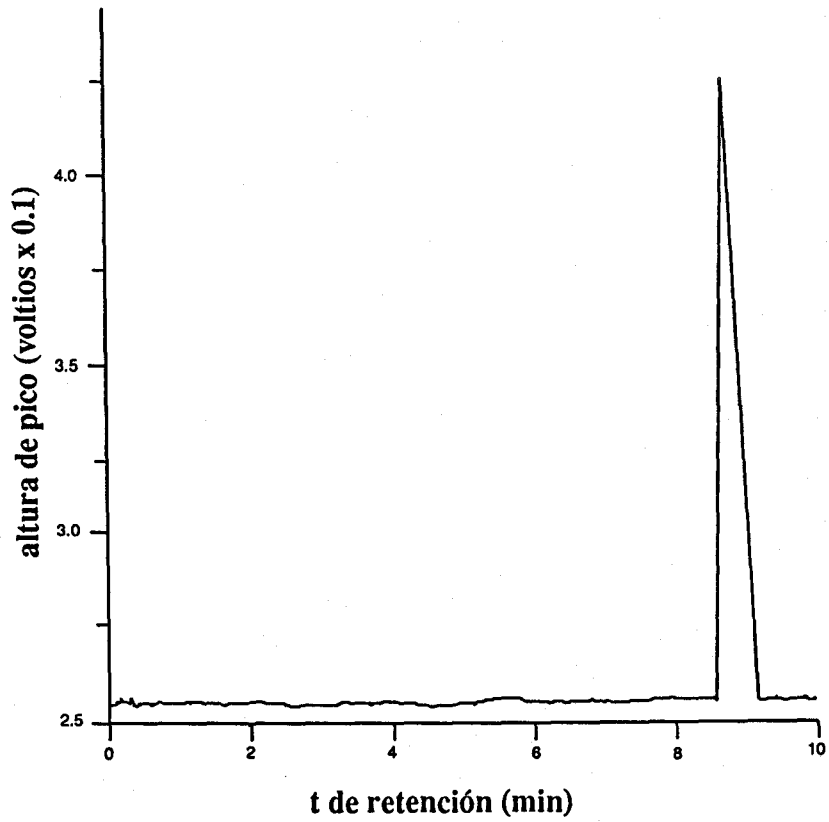


Figura 15. Análisis por HPLC de la Fracción 8-22 antes (a) y después (b) de ser tratada con fosfatasa alcalina.

para posteriores medidas de homoserina-fosfato y homoserina se utilizó la fracción 8-22 como patrón.

La cantidad total de homoserina-fosfato obtenida en todo el proceso se calculó midiendo por HPLC el contenido en aminoácidos de las siguientes fracciones:

- fracción 3-25: obtenida mezclando las fracciones 3 a 25.
- fracción 32-36: obtenida mezclando las fracciones 32 a 36.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XII.

Tabla XII. Cuantificación de homoserina-fosfato y homoserina

Fracción	μmoles de aminoácido	
	Homoserina-P	Homoserina
3-25	888.32	196.48
32-36	0.76	0.06

2. Ensayo de la actividad treonina-sintetasa

La fracción 3-25 descrita en el apartado anterior se utilizó para poner a punto un método de medida de la actividad treonina sintetasa. El método, descrito en el apartado 4.2.3. de Métodos, se basa en cuantificar por HPLC la desaparición con el tiempo de los picos correspondientes a homoserina-fosfato y el aumento del pico correspondiente a treonina ($t_r=9.04$ minutos).

La solución concentrada de homoserina-fosfato se preparó tomando 10 ml de la fracción 3-25, evaporando el solvente y resuspendiendo el residuo seco resultante en 5 ml de agua destilada. Esta solución contenía homoserina-fosfato y homoserina a una concentración de 22.59 y 5.28 mM respectivamente, lo que implica que en el proceso no se pierde homoserina-fosfato.

La actividad treonina sintetasa se ensayó en mezclas de reacción preparadas según se describe en el apartado 4.2.3. de Métodos, utilizando extractos crudos de una cepa Thr⁺ (X2180-1A) y otra Thr⁻ (F4), portadora de una mutación en el gen *THR4* que determina para dicha enzima. Como control se midió también la variación con el tiempo de la cantidad de homoserina-fosfato y treonina en una mezcla de reacción carente de extracto. Para preparar las mezclas de reacción se utilizaron volúmenes iguales de los extractos de cada una de las cepas, los cuales contenían cantidades equivalentes de proteínas (24.4 y 30.0 mg/ml para las cepas X2180-1A y F4 respectivamente).

Según se muestra en la Figura 16a, en la mezcla de reacción preparada con el extracto de la cepa Thr⁺, la homoserina-fosfato había desaparecido por completo al cabo de 60 minutos. La desaparición fue equimolar con la aparición de treonina a lo largo del tiempo. Por el contrario, durante este tiempo, no se observó aparición de treonina ni disminución significativa de la concentración de homoserina-fosfato en la mezcla de reacción preparada con el extracto de la cepa Thr⁻ (Figura 16b). No se produjo variación alguna de la concentración de aminoácidos en la mezcla de reacción preparada en ausencia de extracto (Figura 16c).

De estos resultados se concluye que el método utilizado es específico para la medida de la actividad treonina sintetasa, actividad que, hasta el momento, no había sido medida en levaduras y que, efectivamente, está determinada por el gen *THR4*.

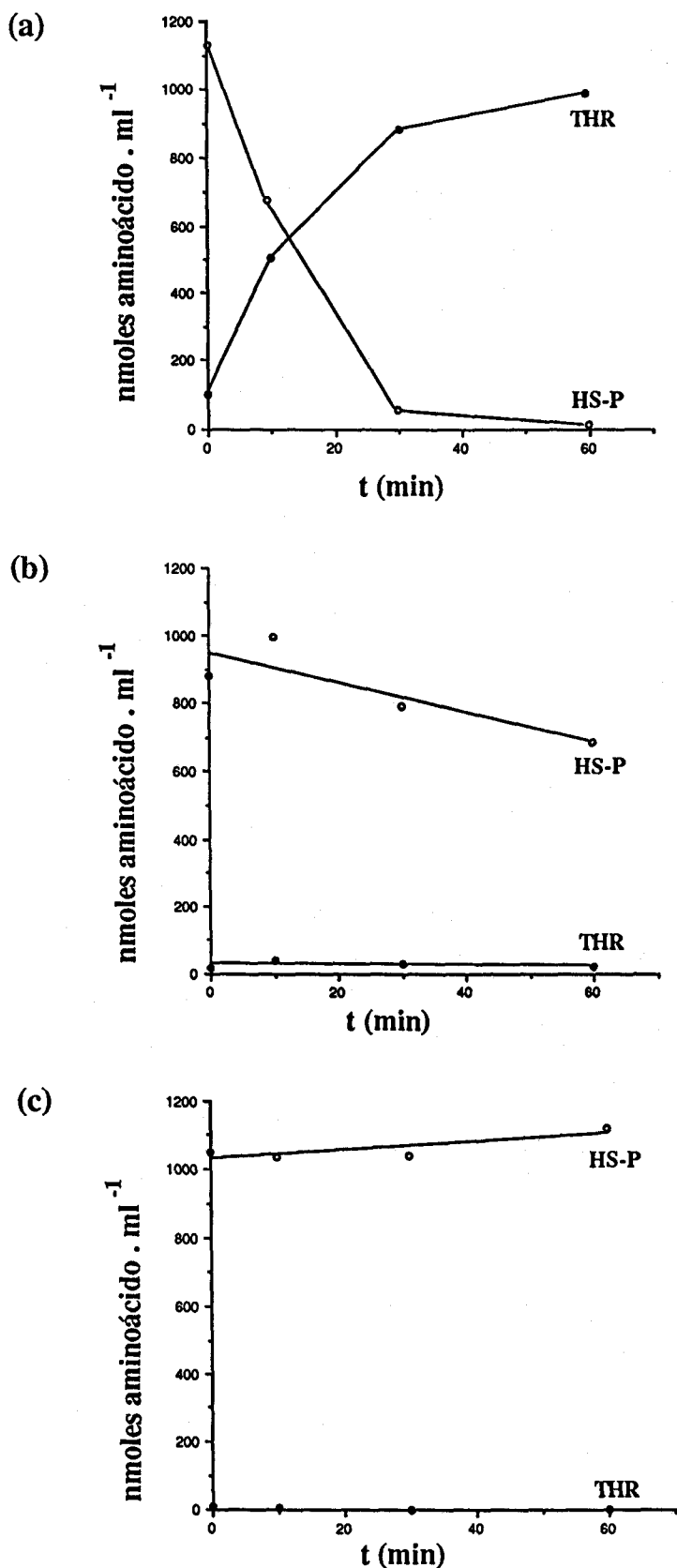


Figura 16. Conversión de homoserina-fosfato (HS-P) en treonina (THR) por la treonina sintetasa en: (a) extracto de la cepa X2180-1A, (Thr⁺); (b) extracto de la cepa F4, (Thr⁴⁻); y (c) en ausencia de extracto.

OBTENCION DE MUTANTES SUPERPRODUCTORES DE TREONINA

Según se mencionó en la Introducción, el aislamiento y estudio de mutantes superproductores de un aminoácido resulta muy instructivo para establecer cuales son los puntos de control de la ruta biosintética correspondiente. En esta Tesis se han utilizado dos estrategias diferentes para obtener mutantes de *Sacch. cerevisiae* desregulados en la síntesis de treonina:

- Reversión de cepas *thr1* y búsqueda, entre los revertientes, de superproductores de treonina.
- Aislamiento de mutantes resistentes a hidroxinorvalina, un análogo tóxico de la treonina.

1. Reversión de cepas *thr1*

Como se ha demostrado anteriormente la treonina inhibe la actividad homoserina quinasa, producto del gen *THR1*. Según lo descrito en la Introducción para la búsqueda de mutantes desregulados, se podría esperar que alguno de los revertientes de una mutación *thr1*, tuvieran una homoserina quinasa insensible a retroinhibición por treonina.

Debido a la especificidad de la alteración en la homoserina quinasa buscada, se consideró adecuado obtener los revertientes Thr^+ a partir de diferentes alelos *thr1*. Para ello, se obtuvo, en primer lugar, una colección de cepas portadoras de mutaciones en dicho gen.

Las mutaciones de fin de mensaje no eran deseables pues, dada la alta frecuencia de aparición de ARN_t supresores, la mayor parte de los revertientes lo serían por supresión intergénica y no por mutación en el propio *THR1*. Por este motivo se consideró adecuado obtener las cepas *thr1* en una portadora de auxotrofías debidas a mutaciones de fin de mensaje de los tres tipos: ámbar, ocre y ópalo. En esta cepa los alelos suprimibles del gen *thr1* correvertirían a prototrofia junto con alguno de los otros

marcadores. Con este objetivo se construyó la cepa XCR13-5A (*MATa trp1-1a lys1-1o ura4o leu2u*).

Presumiblemente una homoserina quinasa con la alteración buscada tendría modificada la estructura terciaria respecto de la enzima silvestre. Este tipo de alteración es frecuente en las proteínas termosensibles. Para tratar de obtener mutaciones termosensibles en el gen *THR1*, la selección de las cepas Thr⁻ se realizó a 37°C, la de revertientes Thr1⁺ a 22°C.

1.1. Obtención de mutantes auxótrofos para la treonina

Por mutagénesis con nitrosoguanidina, descrita en Métodos, de la cepa XCR13-5A, se aislaron 11 mutantes Thr⁻. Por los motivos anteriormente expuestos la selección de los mismos se realizó a 37°C para tratar de obtener también auxotroffias termosensibles. En la Tabla XIII se describen los resultados de cada una de las 3 mutagénesis realizadas.

Tabla XIII. Obtención de cepas Thr⁻ por mutagénesis con nitrosoguanidina de la cepa XCR13-5A.

Mutagénesis	Tiempo (min) tratamiento	Superv.	Frecuencia auxótrofos	Nº de mutantes Thr ⁻
I	10	48%	9×10^{-5}	1
II	12	3%	5×10^{-4}	1
III	12	5%	4×10^{-4}	9

La detección de auxótrofos Thr⁻ entre los supervivientes al tratamiento con nitrosoguanidina se realizó probando el crecimiento de los mismos en cajas de medio mínimo que contenían todos los

requerimientos de XCR13-5A pero sin treonina. La mutación *thr* de las cepas seleccionadas debía encontrarse en los genes *THR1* ó *THR4* puesto que mutantes en el resto de los genes de la ruta requieren simultaneamente treonina y metionina.

1.2. Determinación del genotipo (*thr1* ó *thr4*) de los auxótrofos para la treonina

Se realizó cruzando los mutantes obtenidos por las cepas F15 (*thr1*) y S2068-B (*thr4*). La persistencia en el diploide del fenotipo Thr⁻ era indicativo de la pertenencia de ambos parentales al mismo grupo de complementación. Así, se pudo identificar que 8 de los mutantes eran *thr1* y 3 eran *thr4*.

Para detectar la posible existencia de auxotrofías termosensibles entre las obtenidas se analizó, a 22°C y 37°C, el crecimiento de todas las cepas Thr⁻ en medio sin treonina; las capaces de crecer a 22°C pero no a 37°C se clasificaron como *thr-ts*. Las cepas obtenidas se denominaron:

- CJ1 a CJ7: *thr1*
- CJ8: *thr1-ts*
- CJ9 a CJ11: *thr4*

1.3. Identificación de mutaciones de fin de mensaje en los alelos *thr1* y *thr4*

A partir de las cepas CJ1 a CJ11 se obtuvieron, por mutagénesis con luz ultravioleta, según se describe en Métodos, revertientes protótrofos para: triptófano (ámbar), uracilo (ocre) y leucina (ópalo). Para comprobar la posible correversión de cada marcador con el marcador *thr*, se probó el crecimiento de los revertientes obtenidos en medios que contenían los requerimientos necesarios, pero carentes de treonina. Como control interno también se probó la correversión con el marcador *ura*. En la Tabla XIV se muestran los resultados obtenidos. De ellos se deduce que la correversión con el marcador *thr* se dio únicamente en 10 de los 15 revertientes Lys⁺ obtenidos a partir de la cepa CJ11. Siendo el

Tabla XIV. Identificación de mutaciones de fin de mensaje en los alelos *thr1* de las cepas CJ1 a CJ18 y *thr4* de las cepas CJ9 a CJ11.

Cepa	<u>Nº de revertientes</u>			Correvertientes
	Trp ⁺	Leu ⁺	Lys ⁺	
CJ1	3	7	42	42 Lys ⁺ Ura ⁺
CJ2	2	1	4	1 Leu ⁺ Ura ⁺ 3 Lys ⁺ Ura ⁺
CJ3	2	3	6	-
CJ4	24	14	0	-
CJ5	3	40	16	-
CJ6	3	1	14	-
CJ7	4	2	0	-
CJ8	4	27	15	-
CJ9	0	4	0	-
CJ10	0	1	0	-
CJ11	3	9	15	10 Lys ⁺ Thr ⁺



marcador *lys1-1* de tipo ocre, podría concluirse que el marcador *thr4* presente en esta cepa sería del mismo tipo. Ninguno de los revertientes protótrofos obtenidos a partir de los mutantes *thr1* eran, además, protótrofos para la treonina. En congruencia con los resultados obtenidos, para la obtención de revertientes protótrofos Thr⁺ y búsqueda de excretores de treonina entre los mismos se utilizaron las cepas CJ1 a CJ8 que parecen contener mutaciones *thr1* no suprimibles.

1.4. Obtención de revertientes Thr⁺ a partir de las cepas CJ1 a CJ8

A partir de las cepas CJ1 a CJ8 se obtuvieron revertientes Thr⁺ tanto espontáneos, cómo inducidos con luz ultravioleta. El tratamiento realizado fue de 30 segundos. Por los motivos anteriormente expuestos, las auxotrofías termosensibles eran deseables; para tratar de obtenerlas la selección se realizó a 22°C. En la Tabla XV se resumen los resultados obtenidos. En total se obtuvieron 2824 revertientes.

1.5. Caracterización de los revertientes Thr⁺

Con el objetivo de detectar alelos termosensibles del gen *THR1* se analizó a 37°C, el crecimiento de 911 revertientes Thr⁺ de los 2538 obtenidos en medios con y sin treonina. Las cepas incapaces de crecer en medio sin treonina (20 cepas) se clasificaron como termosensibles. De ellas 14 crecían en medio con treonina, por tanto, debían el fenotipo termosensible a un marcador *thr* (presumiblemente *thr1-ts*). Las 6 cepas restantes eran incapaces de crecer a 37°C tanto en medio suplementado como sin suplementar con treonina, por tanto, no debían el fenotipo termosensible al marcador *thr1*. En la Tabla XV se detalla el número de mutantes termosensibles de cada uno de los tipos que se encontraron entre los revertientes procedentes de cada una de las cepas analizadas.

Todos los revertientes obtenidos se sometieron a la prueba de alimentación cruzada, descrita en el apartado 5.2.1. de Métodos, para detectar entre ellos los posibles excretores de treonina. Dado

Tabla XV. Obtención de revertientes Thr⁺ a partir de cepas *thr1* mediante irradiación con luz ultravioleta. n.d., no determinado; *no-thr1*, cepas cuyo fenotipo termosensible no se debe al marcador *thr1*. Los datos de supervivencia y frecuencia de revertientes son la media de los resultados obtenidos en el número de experimentos indicado en cada caso.

Cepa	Tratamiento		Superv. (%)	Frecuencia de Reversión		Nº revertientes			Termosensibles(Nº)		
	t	Nº		Espontánea	Inducida	Espont.	Inducid.	Total	Analizados	<i>thr1-ts</i>	<i>no-thr1</i>
CJ1	30"	3	8.2	9.0×10^{-9}	1.6×10^{-6}	23	1616	1639	43	0	0
CJ2	30"	2	n.d.	n.d.	n.d.	3	80	83	83	10	1
CJ3	30"	3	15.0	$<10^{-8}$	2.8×10^{-8}	0	45	45	14	0	0
CJ4	30"	1	0.5	4.2×10^{-7}	3.2×10^{-5}	115	38	153	153	3	0
CJ5	30"	2	12	7.0×10^{-10}	10^{-8}	1	88	89	89	0	0
CJ6	30"	5	10.7	10^{-9}	1.3×10^{-6}	3	82	85	85	0	1
CJ7	30"	2	8.1	1.2×10^{-8}	5.52×10^{-6}	10	434	444	444	1	4
CJ8	30"	1	n.d.	n.d.	n.d.	81	205	286	0	n.d.	n.d.

que, como se verá en el próximo apartado algunas cepas superproductoras de treonina son resistentes a hidroxinorvalina, se probó también la capacidad de los revertientes de crecer en medio que contenía este análogo de treonina. Ninguna de las cepas resultó ser excretora de treonina ni resistente a hidroxinorvalina. En consecuencia, se decidió abandonar esta estrategia y buscar mutantes desregulados sólo por la vía de la resistencia a hidroxinorvalina.

2. Resistencia a hidroxinorvalina

La hidroxinorvalina (ahv), ha sido utilizado en bacterias para el aislamiento de mutantes superproductores de treonina (Nakaromi, 1986). Hasta el momento, este análogo no había sido utilizado en levaduras. Por ello, en primer lugar, se realizaron experimentos para determinar su efecto tóxico sobre *Sacch. cerevisiae*.

2.1. Efecto de la hidroxinorvalina

2.1.1 Sobre el crecimiento

Por ser un análogo de la treonina, la hidroxinorvalina podría entrar en las células de levaduras por las mismas permeasas, es decir, mayoritariamente a través de la permeasa general de aminoácidos (GAP) y minoritariamente por alguna de las permeasas específicas (Martín-Rendón *et al.*, en preparación). El amonio regula negativamente tanto la actividad, cómo la síntesis de la GAP (Grenson *et al.*, 1970). Para asegurar síntesis y actividad de la permeasa general de aminoácidos, los medios con hidroxinorvalina se prepararon utilizando prolina (medio SDP), en lugar de sulfato amónico como fuente de nitrógeno.

Concentración mínima inhibitoria

En medio sólido

Se sembró un césped de la cepa X2180-1A sobre cajas que contenían medio SDP con hidroxinorvalina a concentraciones de 0, 0.15, 0.2, 0.3, 1 y 2.5 mM. Tras 5 días de incubación a 30°C se observó que el crecimiento del césped en todas las cajas que contenían hidroxinorvalina fue inferior al observado en las cajas control sin el tóxico. La ausencia de crecimiento era más patente en las cajas que contenían hidroxinorvalina a una concentración de 2.5 mM por lo que, en adelante se usó esta concentración.

Para establecer las condiciones óptimas a las cuales la hidroxinorvalina inhibe el crecimiento en medio sólido, se sembraron células de la cepa X2180-1A sobre cajas con 2.5 mM de hidroxinorvalina y se variaron los siguientes parámetros:

- densidad de siembra: entre 10^1 y 10^7 células por caja.
- fuente de nitrógeno: sulfato amónico (medio SD) ó prolina (medio SDP).

El efecto inhibitorio del tóxico resultó ser más patente cuando la densidad de siembra era alta (10^6 - 10^7 células/caja). Las colonias o céspedes crecieron de forma similar en medio SD con o sin hidroxinorvalina. Por tanto, a la concentración probada, la hidroxinorvalina no ejerce efecto aparente sobre el crecimiento de la cepa X2180-1A en presencia de amonio.

Para la posterior búsqueda de mutantes resistentes a hidroxinorvalina se decidió sembrar entre 10^6 y 10^7 células sobre cajas de medio mínimo con prolina como fuente de nitrógeno conteniendo hidroxinorvalina a una concentración mínima de 2.5 mM.

En medio líquido

Se calculó el tiempo de generación de la cepa X2180-1A creciendo a 30°C en medio SDP con hidroxinorvalina a

concentraciones comprendidas entre 0 y 5 mM. Los resultados, representados en la Figura 17, indican que la hidroxinorvalina no inhibe totalmente el crecimiento de *Sacch. cerevisiae* a las concentraciones probadas. Hasta una concentración de 1 mM, el tiempo de generación aumentaba con la concentración; a partir de esa concentración los tiempos de generación medidos fueron similares y aproximadamente 3 veces superior al calculado en ausencia del tóxico. La concentración mínima que produce la máxima inhibición del crecimiento observada en medio líquido es, por tanto, 1 mM.

Efecto en presencia de aminoácidos

Como ya se comentó en la Introducción, la hidroxinorvalina parece actuar en bacterias sustituyendo a la treonina en procesos de retroinhibición, lo que da lugar a una disminución de la tasa de crecimiento celular. La adición al medio de cultivo de aminoácidos relacionados con la ruta de biosíntesis de la treonina (treonina, metionina e isoleucina) revierte este efecto.

Para comprobar si también en *Sacch. cerevisiae* se produce esta reversión, se cultivaron células de la cepa X2180-1A en medio SDP, sólido y líquido, con hidroxinorvalina a la concentración mínima inhibitoria para cada tipo de medio, y diferentes combinaciones de aminoácidos. Se probaron aminoácidos relacionados con la ruta de biosíntesis de la treonina en levaduras (treonina, metionina, isoleucina y valina) y no relacionados (citrulina y asparagina).

Las células cultivadas en medio sólido se incubaron a 30°C durante 3 días, tras los cuales, se observó el crecimiento del césped sembrado. En medio líquido, el crecimiento se determinó calculando el tiempo de generación y la tasa de crecimiento según se indica el apartado 1.2. de Métodos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XVI. De ellos se desprende que sólo la adición de treonina, metionina, isoleucina y valina, o bien, asparagina es capaz de contrarrestar la inhibición ejercida por la hidroxinorvalina, a pesar de que esta última no esté relacionada con la ruta de biosíntesis de la treonina. Según se

Tabla XVI. Efecto de la hidroxinorvalina sobre el crecimiento de la cepa X2180-1A en presencia de distintos aminoácidos. τ : tiempo de generación (horas), % μ : tasa de crecimiento respecto de la obtenida en el medio sin adiciones, n.d.: no determinado.

Aminoácido(1) añadido	Medio líquido		Medio sólido
	τ (horas)	% μ	Crecimiento
-	5.99	100	+
ahv	21.49	30	-
ahv+thr	10.64	56	+
ahv+met	n.d.	n.d.	-
ahv+ile	n.d.	n.d.	-
ahv+hom	7.89	76	n.d.
ahv+cit	13.01	46	n.d.
ahv+asn	4.96	121	n.d.
ahv+thr+met	8.10	74	+
ahv+thr+ile	n.d.	n.d.	+
ahv+thr+hom	8.73	68	n.d.
ahv+met+ile	n.d.	n.d.	-
ahv+thr+met+ile	6.57	91	+
ahv+thr+met+ile+val	5.51	109	n.d.

(1) En los medios líquidos la concentración final de cada aminoácido fue de 1 mM excepto la de homoserina que se añadió en forma DL- a concentración 2 mM. En los medios sólidos la hidroxinorvalina se añadió a concentración 2.5 mM; el resto de los aminoácidos, a la concentración usada cuando los mismos se añaden como requerimientos (Tabla IV de Materiales). thr, treonina; met, metionina; ile, isoleucina; Cit, citrulina; asn, asparagina; hom, homoserina; ahv, hidroxinorvalina.

discutirá más tarde, otros fenómenos tales como la liberación de amonio fruto del catabolismo del aminoácido ó la competencia del mismo con el tóxico por su entrada en la célula podrían estar implicados en este efecto.

2.1.2. En ausencia de crecimiento

Se recogieron por centrifugación las células de un cultivo exponencial ($D.O._{660nm}=0.54$) en medio SDP de la cepa X2180-1A y, tras lavarlas 2 veces con agua desionizada esteril, se resuspendieron en el mismo volumen de medio carente de fuente de nitrógeno (SDN⁻). El nuevo cultivo se dividió en dos partes iguales, a una de las cuales se añadió hidroxinorvalina a una concentración final de 1 mM. Las células se incubaron durante 87 horas a 30°C con agitación. A diferentes tiempos se determinó el número de células viables en cada una de ellas. La Tabla XVII muestra los resultados obtenidos.

Tabla XVII. Efecto de la hidroxinorvalina sobre la viabilidad celular en ausencia de crecimiento. t: tiempo (horas).

Medio	Viables . ml ⁻¹ . 10 ⁷		
	t=0 h	t=16 h	t=81 h
SDN ⁻	3.2	3.4	1.1
SDN ⁻ +ahv	3.0	3.5	1.0

La Tabla muestra que la viabilidad de las células en ambas suspensiones fue similar incluso a tiempos de incubación muy largos. Se concluye que, en ausencia de crecimiento, la hidroxinorvalina no ejerce efecto alguno sobre la viabilidad celular.

2.2. Aislamiento de mutantes resistentes a hidroxinorvalina

Una vez determinadas las condiciones a las cuales la hidroxinorvalina inhibe el crecimiento de *Sacch. cerevisiae*, se procedió al aislamiento de cepas resistentes a este análogo (Ahv^R). Para ello, células de la cepa XCR13-5A procedentes de un cultivo estacionario en YPD se sembraron bien directamente, o tras tratamiento mutagénico con nitrosoguanidina, sobre cajas de medio SDP con los requerimientos de la cepa e hidroxinorvalina (10 mM). Tras incubar las cajas a 37°C durante 5 días, se contaron las colonias resistentes aparecidas.

En la Tabla XVIII se detallan las frecuencias de resistencia espontánea e inducida, así como el número de mutantes resistentes obtenidos.

Tabla XVIII. Aislamiento de mutantes resistentes a hidroxinorvalina a partir de la cepa XCR13-5A.

	Frecuencia	Colonias resistentes
Resistentes espontáneos	1.5×10^{-6}	22
Resistentes inducidos	5.0×10^{-5}	128

2.3. Selección de excretores de treonina

Todos los mutantes Ahv^R obtenidos, se sometieron a la prueba de alimentación cruzada de una cepa Thr^- , según se describe en el apartado 5.2.1. de Métodos realizada a 30°C. De entre las 128 resistentes obtenidas por mutagénesis con nitrosoguanidina 60

resultaron ser excretoras de treonina. Ninguna de las cepas resistentes espontáneas excretaba treonina. Para análisis posteriores se continuó con las 60 cepas Ahv^R y excretoras de treonina (Thr^E).

2.3.1. Análisis de dominancia/recesividad

Con el fin de tratar de clasificar a las cepas seleccionadas en grupos diferentes, se analizó la relación de dominancia/recesividad de los alelos que confieren los fenotipos Ahv^R y Thr^E respecto de los silvestres. Para ello se seleccionaron por complementación, diploides procedentes del cruzamiento de cada una de las cepas por la MMY1 y se analizó su resistencia a hidroxinorvalina 10 mM y la excreción de treonina. Ambos fenotipos se determinaron tras 4 días de incubación a 30°C en los medios apropiados.

De los 60 diploides, todos resultaron ser Ahv^R, 19 eran también Thr^E y 41 no excretoras (Thr^{NE}). Para análisis posteriores se seleccionaron las siguientes cepas:

- 5 cepas que se denominaron AHV-1 a AHV-5, cuyos diploides, procedentes del cruzamiento por la MMY1, excretaban treonina en las condiciones anteriormente citadas.

- 6 cepas que se denominaron AHV-6 a AHV-11, cuyos diploides, procedentes del cruzamiento por la MMY1, no excretaban treonina.

Dado que, como se comenta en el apartado 5.2.1. de Métodos, el tiempo de aparición del halo de excreción depende de la temperatura de incubación, se trató de clasificar en subgrupos a las 11 cepas seleccionadas determinándoles a todas ellas y a los diploides, obtenidos como se describió anteriormente, la resistencia a 10 mM de hidroxinorvalina y el tiempo al cual aparecía el halo de excreción. Ambas determinaciones se realizaron a 22°C y 37°C. Como control se utilizaron las cepas XCR13-5A, parental de todas las demás, y el diploide obtenido del cruzamiento de la misma la MMY1.

Todas las cepas analizadas, haploides y diploides, con excepción de la XCR13-5A y su diploide, resultaron ser resistentes a hidroxinorvalina tanto a 22°C como a 37°C. Se concluye, por tanto, que la resistencia a hidroxinorvalina de las cepas AHV-1 a AHV-11 es un carácter dominante en heterocigosis independientemente de la temperatura de incubación.

La Tabla XIX muestra los resultados de la incubación a 37°C, todas las cepas, excepto la XCR13-5A y su diploide, mostraron halo de excreción tras 110 horas de incubación, lo que implica que el fenotipo excretor en las 11 cepas analizadas es dominante en heterocigosis a esta temperatura.

A 22°C todas las cepas haploides, excepto la XCR13-5A, excretaban treonina. Las cepas se clasificaron en grupos diferentes, numerados del I al IV, según el tiempo al cual aparecía el halo de excreción alrededor de los diploides respectivos.

Para análisis posteriores se seleccionaron de cada grupo las cepas que se especifican a continuación:

- Grupo I: AHV-1
- Grupo II: AHV-2, AHV-3 y AHV-4
- Grupo III: AHV-5
- Grupo IV: AHV-6.

2.4. Caracterización bioquímica de las cepas $Ahv^R Thr^E$

En *Sacch. cerevisiae*, la excreción de un aminoácido indica generalmente superproducción del mismo como consecuencia de una desregulación en la ruta de biosíntesis del mismo.

De los resultados obtenidos en esta Tesis sobre la caracterización de actividades enzimáticas susceptibles a retroinhibición por treonina, se concluyó que la aspartato quinasa es regulada por treonina más fuertemente que la homoserina quinasa.

Una alteración en la aspartato quinasa que permitiese la actividad enzimática pero impidiese la retroinhibición por treonina podría explicar simultáneamente los fenotipos de resistencia a hidroxinorvalina y excreción de treonina. Para comprobar esta hipótesis se determinó en cinco de las cepas seleccionadas

Tabla XIX. Excreción de treonina por las cepas AHV-1 a AHV-11 y los respectivos diploides obtenidos del cruzamiento de las mismas por MMY1 incubados a distintas temperaturas y tiempos. (+), aparición del halo de excreción; (-), no aparición del halo de excreción; XCR13-5A, cepa parental control.

Cepa	37°C		22°C			Grupo
	110h	110h	168h	212h	268h	
AHV-1	+	+	+	+	+	I
" /MMY1	+	-	+	+	+	
AHV-2	+	+	+	+	+	
" /MMY1	+	-	-	+	+	
AHV-3	+	+	+	+	+	II
" /MMY1	+	-	-	+	+	
AHV-4	+	-	+	+	+	
" /MMY1	+	-	-	+	+	
AHV-5	+	+	+	+	+	III
" /MMY1	+	-	-	-	+	
AHV-6 a AHV-11	+	+	+	+	+	IV
" /MMY1	+	-	-	-	-	
XCR13-5A	-	-	-	-	-	Control
" /MMY1	-	-	-	-	-	

anteriormente (AHV-1, AHV-2, AHV-3, AHV-5 y AHV-6) el efecto de la treonina e hidroxinorvalina sobre sus actividades aspartato quinasa, así como las cantidades de treonina y otros aminoácidos acumuladas intracelularmente y excretadas al medio de cultivo.

2.4.1. Efecto de la treonina y la hidroxinorvalina sobre la actividad aspartato quinasa

Tras purificar parcialmente la aspartato quinasa de cada una de las cepas como se describe en el apartado 4.1.1. de Métodos, se determinó *in vitro* el efecto de la L-treonina y la hidroxinorvalina sobre cada una de ellas. Como control se utilizó la cepa parental XCR13-5A.

De los resultados, mostrados en la Tabla XX, se concluye que, efectivamente, la aspartato quinasa de los mutantes es parcial o totalmente insensible a la inhibición por treonina e hidroxinorvalina, al contrario de lo que ocurre a la enzima silvestre (cepa XCR13-5A).

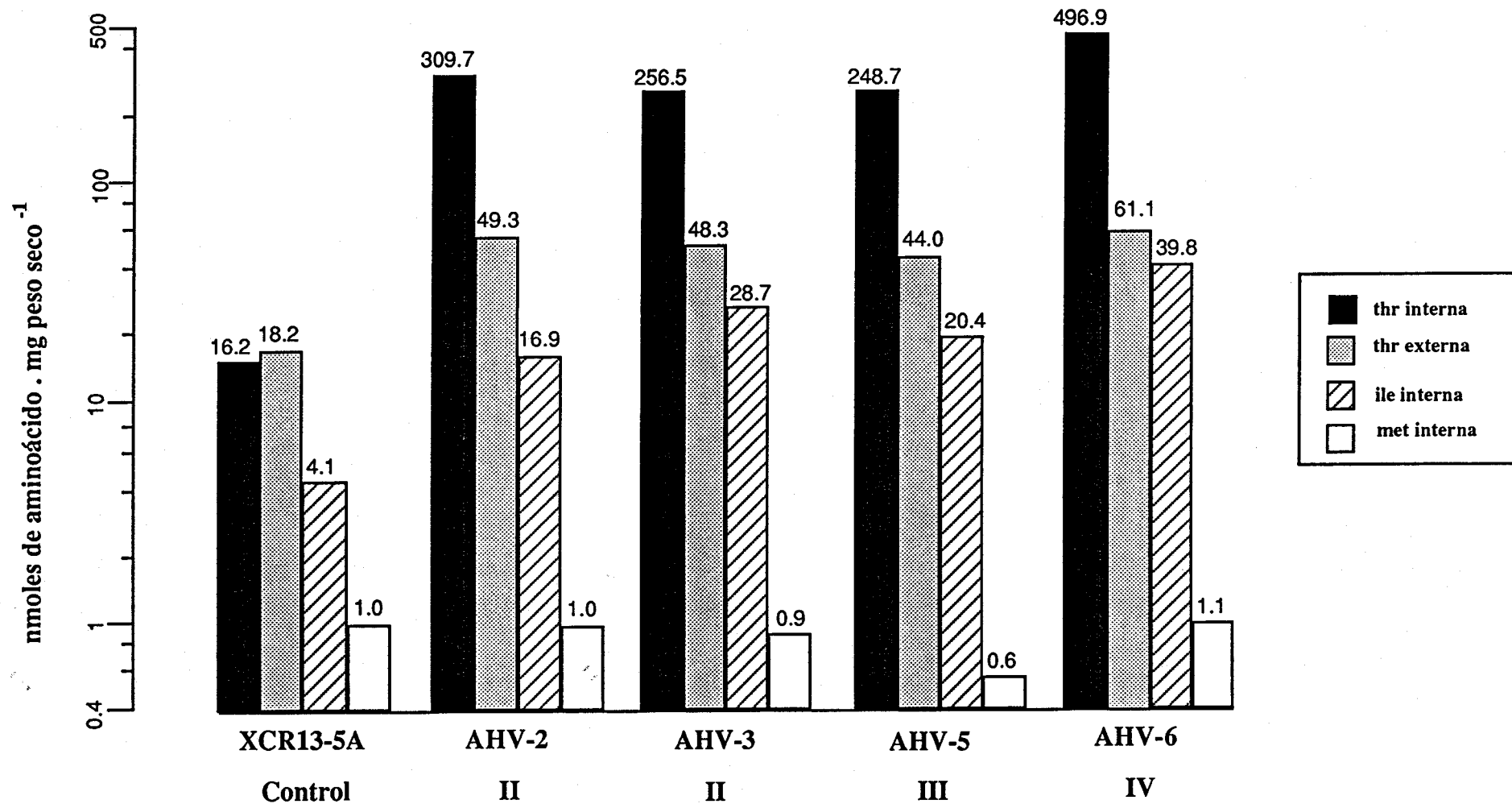
2.4.2. Cuantificación de treonina y otros aminoácidos en el interior celular y en el medio de cultivo

Mediante HPLC y como se indica en Métodos, se cuantificaron la treonina, metionina e isoleucina (aminoácidos relacionados con la ruta biosintética de la treonina) acumuladas intracelularmente, así como la treonina excretada por cepas Ahv^R Thr^E. Como control se utilizó la cepa parental XCR13-5A.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 18. De ellos se deduce que los mutantes acumulan de 15 a 30 veces más treonina en el interior y 3 veces más en el exterior que la cepa silvestre. Los mutantes superproducen también isoleucina si bien en menor grado. Las cepas que acumulan una mayor cantidad de treonina producen también una mayor cantidad de isoleucina. Sorprendentemente, la cantidad de metionina producida por los mutantes no es significativamente distinta a la del silvestre.

Tabla XX. Efecto de la L-treonina (L-thr) y la hidroxinorvalina (ahv) sobre la actividad aspartato quinasa de cepas Ahv^R y Thr^E. Para calcular la inhibición se consideró 100% de actividad a la medida en ausencia de aminoácidos. Cada medida de actividad se realizó por duplicado y se calculó la media entre los valores obtenidos.

Grupo	Cepa	Actividad específica (mU . mg proteína ⁻¹)	Inhibición (%)	
			L-thr 20mM	ahv 50mM
Control	XCR13-5A	188	90	91
I	AHV-1	38	0	0
II	AHV-2	45	0	0
	AHV-3	135	0	32
III	AHV-5	37	0	0
IV	AHV-6	44	50	21



Cepa y grupo

Figura 18. Concentración de aminoácidos intra y extracelular en las cepas resistentes a hidroxinorvalina y excretoras de treonina. thr: treonina, ile: isoleucina, met: metionina.

2.5. Caracterización genética de las cepas Ahv^R Thr^E

Según se describió anteriormente, mutaciones que confieren resistencia a hidroxinorvalina son dominantes respecto del alelo silvestre a todas las temperaturas probadas (22, 30 y 37°C); por el contrario, la excreción de treonina lo es únicamente a 37°C.

Para realizar una caracterización genética más exhaustiva de los mutantes, se llevaron a cabo cruzamientos con los que se pretendía:

1. Determinar el número de genes que intervienen en la superproducción.
2. Estudiar el ligamiento del/los alelo/s que determinan la superproducción de treonina con los loci *THR1* u *HOM3*.

Al realizar el análisis de los productos de estos cruzamientos se observó que el grado de resistencia a hidroxinorvalina de las esporas derivadas de un mismo cruzamiento era muy variable. Esta variabilidad dificultaba de tal forma el análisis genético que hacía que los resultados fueran erráticos. La excreción de treonina, sin embargo, segregaba de forma muy constante y fiable, siempre que se probase a 37°C. Como se mostró anteriormente, el efecto de la hidroxinorvalina puede ser contrarrestado por la presencia de otros aminoácidos. Dado que la resistencia a hidroxinorvalina debía probarse en cajas que contenían otros aminoácidos, parecía lógico que se produjesen estas interferencias. Consecuentemente con estos resultados se decidió:

1. Tomar en estos cruzamientos la excreción de treonina (carácter Thr^E) como indicativo de superproducción.
2. Construir cepas Ahv^R Thr^E y *hom3* con un número bajo de auxotrofías con el fin de comprobar el ligamiento entre la resistencia a hidroxinorvalina y la superproducción.

En la Figura 19 se resumen los cruzamientos realizados.

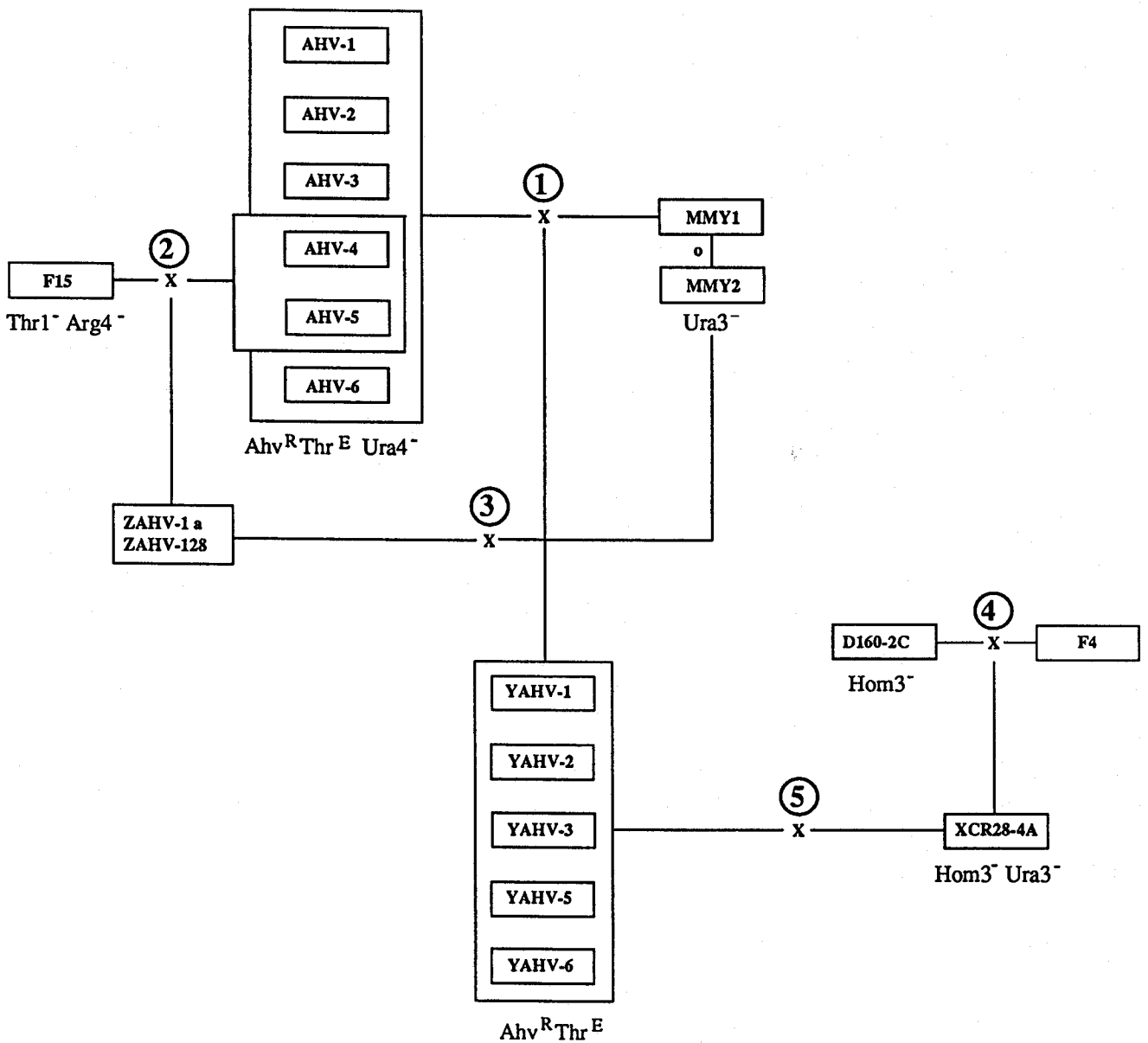


Figura 19. Caracterización genética de cepas *Ahv^R Thr^E*. Cruzamientos realizados y procedencia de cada una de las cepas.

2.5.1. Segregación de la superproducción de treonina respecto del gen *THR1*

Con el fin de determinar si la superproducción de treonina y resistencia a hidroxinorvalina dependen del mismo alelo se analizó la meiosis de los diploides obtenidos del cruzamiento de las cepas AHV-4 y AHV-5 por la F15: *MAT α arg4 thr1*, (cruzamiento 2). Adicionalmente este cruzamiento serviría para confirmar los resultados bioquímicos en el sentido de que si únicamente la actividad aspartato quinasa es la afectada en los mutantes *Ahv^R Thr^E*, no esperaríamos ligamiento entre los marcadores *Thr1* y *Thr^E*.

Como era de esperar, el marcador *thr1* segregó 2 *Thr⁺* : 2 *Thr⁻*. El fenotipo excretor de treonina no podía analizarse en las cepas *Thr⁻* mediante la prueba de alimentación cruzada utilizada en este Tesis puesto que la adición de treonina al medio de cultivo provocaría el crecimiento del césped auxótrofo. Por este motivo, y puesto que el fenotipo excretor es dominante a 37°C, dicho carácter se analizó a esta temperatura en los diploides obtenidos del cruzamiento entre cada uno de los productos meióticos, que se denominaron ZAHV-1 a ZAHV-128, y las cepas MMY1 (*MAT α ura3 Δ 52 Cyh^R*) o MMY2 (*MAT α ura3 Δ 52 Cyh^R*) (cruzamiento 3).

La Tabla XXI muestra el resultado del análisis de ligamiento *Thr1-Thr^E* y *Thr1-Arg4* es este cruzamiento. Se analizaron 14 y 18 tétradas procedentes de la esporulación de los diploides AHV-4/F15 y AHV-5/F15 respectivamente. En todas ellas la excreción de treonina segregaba 2 *Thr^E* : 2 *Thr^{NE}* lo que indica que, en ambas cepas, la superproducción de treonina depende de un solo gen.

La mayoría de las tétradas procedentes de uno u otro diploide fueron tetratipos para los marcadores *Thr1-Thr^E*, por tanto, en ambas cepas la segregación de la superproducción de treonina es independiente del gen *THR1*. De los cruzamientos AHV-4 x F15 y AHV-5 x F15 se extrajo como control la distancia media entre los genes *THR1* y *ARG4* (8.1 cM) la cual coincide aproximadamente con la descrita por Mortimer y Schild (1980), 13.4 cM.

Tabla XXI. Segregación de los marcadores Thr1, ThrE y Arg4 en los cruzamientos AHV-4 x F15 y AHV-5 x F15. d: distancia (cM).

Cruzamiento	Fenotipo más relevante	Marcadores	Nº de tétradas			Ligamiento d
			DP	DR	T	
AHV-4	Thr1 ⁺ Arg4 ⁺ Ahv ^R Thr ^E	Thr1-Thr ^E	1	2	11	NO
x						
F15	Thr1 ⁻ Arg4 ⁻	Thr1-Arg4	11	0	3	SI 10.7
AHV-5	Thr1 ⁺ Arg4 ⁺ Ahv ^R Thr ^E	Thr1-Thr ^E	3	1	14	NO
x						
F15	Thr1 ⁻ Arg4 ⁻	Thr1-Arg4	16	0	2	SI 5.5

2.5.2. Segregación de la superproducción de treonina respecto del gen *HOM3*

La caracterización bioquímica de cepas resistentes a hidroxinorvalina y excretoras de treonina había revelado que en todas ellas la aspartato quinasa, determinada por el gen *HOM3*, es insensible a inhibición por L-treonina e hidroxinorvalina, al contrario de lo que ocurre a la enzima silvestre. Sería lógico pensar que exista ligamiento entre el gen *HOM3* y el responsable de la superproducción de treonina.

Como se mencionó anteriormente la determinación del fenotipo de resistencia a hidroxinorvalina se dificulta por la presencia de otros aminoácidos en el medio de cultivo. Por este motivo, antes de realizar el análisis de ligamiento anteriormente descrito dada la importancia crucial de los resultados que se

esperaban obtener, se consideró adecuado eliminar algunas de las auxotrofías para los mismos presentes tanto en las cepas Ahv^R Thr^E como en la cepa *hom3* que se disponía (D160-2C: *MAT α ilv1 ura3 hom3 his1 arg6 trp2 adel met1 gal2*). Para ello se realizaron los siguientes pasos:

1. Se aisló por complementación un diploide procedente del cruzamiento 4 entre las cepas D160-2C y F4 (*MAT α thr4*). De este diploide y por micromanipulación, se seleccionó un descendiente meiótico de sexo α y portador de un alelo *hom3*. A esta cepa se denominó XCR28-4A (*MAT α ura3 arg6 hom3 his1*).

2. De los diploides que se obtuvieron del cruzamiento de cada una de las cepas AHV-1, AHV-2, AHV-3, AHV-5 y AHV-6 por la MMY1 (cruzamiento 1) se seleccionó un descendiente meiótico de sexo α , Ahv^R, Thr^E y carente de auxotrofías para aminoácidos. Estas cepas se denominaron YAHV-1, YAHV-2, YAHV-3, YAHV-5 e YAHV-6 respectivamente.

Los parentales usados en estos cruzamientos eran todos auxótrofos para uracilo: la cepa MMY1 es portadora de un alelo *ura3* y las cepas AHV1 a AHV-6 uno *ura4*. De los descendientes meióticos seleccionados, 3 (YAHV-1, YAHV-5 e YAHV-6) resultaron ser también Ura⁻. El genotipo de cada una de ellas con respecto a este carácter se dedujo de la segregación para el mismo (DP, 0 Ura⁺ : 4 Ura⁻; DR, 2 Ura⁺ : 2 Ura⁻; T, 1 Ura⁺ : 3 Ura⁻) en las tétradas a la cuales pertenecían las cepas seleccionadas, así como del que se diese o no complementación para el marcador Ura en un cruzamiento por la cepa XCR28-4A (*ura3*) (cruzamiento 5). De esta forma se pudo establecer el genotipo de cada una de las cepas con respecto a este marcador que resultó ser:

-YAHV-1: *MAT α ura4 Ahv^R Thr^E*

-YAHV-2: *MAT α Ahv^R Thr^E*

-YAHV-3: *MAT α Ahv^R Thr^E*

-YAHV-5: *MAT α ura3 Ahv^R Thr^E*

-YAHV-6: *MAT α ura3 Ahv^R Thr^E*

El análisis de ligamiento entre el marcador que determina la superproducción de treonina y el gen *HOM3* se llevó a cabo realizando el análisis meiótico de los diploides procedentes del cruzamiento de las cepas YAHV-1, YAHV-2 e YAHV-5 con la XCR28-4A (cruzamiento 5).

Según se indica en la Tabla XXII, la superproducción de treonina segregó 2 esporas excretoras : 2 esporas no excretoras a partir de los diploides YAHV-1/XCR28-4A e YAHV-2/XCR28-4A. A partir de la cepa YAHV-5/XCR28-4A, la mayor parte (21) de las tétradas segregaron también 2:2 y 3 tétradas 1 Thr^E : 3 Thr^{NE}. Se concluye que en todas ellas la superproducción de treonina depende de un solo gen.

Las esporas excretoras provenientes de cualquiera de los tres diploides resultaron ser todas Hom3⁺. Todas las esporas no excretoras fueron Hom3⁻ salvo 3 descendientes del diploide YAHV-5 x XCR28-4A. Se concluye que en las tres cepas analizadas la superproducción de treonina está ligada al gen *HOM3*.

La determinación de la resistencia a hidroxinorvalina en las esporas descendientes de estos cruzamientos se vio dificultada por:

1. Únicamente podía determinarse en las esporas protótrofas para la homoserina puesto que, según se demostró anteriormente, la adición de homoserina al medio con hidroxinorvalina evitaría el efecto de la misma sobre el crecimiento.

2. El 15% de las esporas Hom3⁺ fueron incapaces de crecer en medio SDP suplementado con los requerimientos adecuados y sin hidroxinorvalina.

3. El crecimiento en medio con hidroxinorvalina de las cepas Hom3⁺ capaces de crecer en medio SDP fue muy variado. Solamente algunas esporas eran claramente resistentes, el resto, mostraban crecimientos intermedios entre el observado en las claramente resistentes y los controles sensibles.

Tabla XXII. Análisis de ligamiento entre el gen *HOM3* y el marcador que determina la excreción de treonina.

Cepa	Nº de tétradas		Esporas Thr ^E		Esporas Thr ^{NE}	
	2 Thr ^E :2 Thr ^{NE}	1 Thr ^E :3 Thr ^{NE}	Hom3 ⁺	Hom3 ⁻	Hom3 ⁺	Hom3 ⁻
YAHV-1/XCR28-4A	18	0	36	0	0	36
YAHV-2/XCR28-4A	29	0	58	0	0	58
YAHV-5/XCR28-4A	21	3	45	0	3	48

Por todo ello no pudo determinarse en todos los casos si la resistencia a hidroxinorvalina y superproducción de treonina dependen del mismo alelo ni la existencia o no de ligamiento entre la primera y el gen *HOM3*.

Como control, se extrajeron de este cruzamiento las distancias medias entre los genes *ARG6-HIS1* ($d= 5.6$ cM), *ARG6-HOM3* ($d= 8.3$ cM) e *HIS1-HOM3* ($d=3.3$ cM); las cuales coinciden aproximadamente con las descritas por Mortimer y Schild (1980) ($d=7.8$ cM, $d=12.0$ cM y $d=2.5$ cM respectivamente). Los genes *URA3* y *URA4* segregaron independientemente de los anteriores (datos no mostrados).

DISCUSSION

DISCUSION

Uno de los objetivos de esta Tesis consistió en poner a punto métodos de medida de algunas actividades enzimáticas implicadas en la ruta biosintética de la treonina en *Sach. cerevisiae*. Por un lado interesaban las dos actividades pertenecientes a la ruta específica de la treonina, homoserina quinasa y treonina sintetasa, por ser las menos estudiadas; por otro, la actividad aspartato quinasa cuya regulación por treonina era conocida y podía ser de gran utilidad en la caracterización de cepas desreguladas.

Actividad homoserina quinasa

Purificación

Las primeras medidas de la actividad homoserina quinasa de levaduras fueron realizadas por Flavin y Slaughter (1960) en un extracto de cepas panaderas. El método que utilizaron consiste en la medida de la formación de ester fosfato ácido-estable tras incubar el extracto a 30°C con homoserina, ATP e iones Mg^{++} como cofactor. La cantidad de ester fosfato estable a ácido se obtiene restando a la cantidad total de fosfato la de fosfato ácido-labil más fosfato inorgánico determinadas mediante el método de Fiske y Subbarow (1925). Para determinar la cantidad de ester fosfato formado a partir de homoserina es necesario preparar mezclas de reacción con y sin este sustrato. Este método resulta muy laborioso para realizar el número de medidas que los estudios cinéticos requieren.

En *Sacch. cerevisiae* la única medida de la actividad homoserina quinasa descrita en la literatura fue realizada por de Robichon-Szulmajster *et al.* (1967). El método utilizado consiste en la determinación de la cantidad de ^{32}P no eliminable mediante carbón activo tras incubar un extracto celular con homoserina y $^{32}\gamma$ -ATP. El protocolo seguido se basaba en resultados obtenidos por J. C. Patte y nunca publicados.

Por todo lo expuesto resultaba muy conveniente poner a punto un método sencillo y repetitivo para la medida de la homoserina quinasa en *Sacch. cerevisiae*. Para ello nos basamos en

un método descrito por Thèze *et al.* (1974) y modificado por Burr *et al.* (1976) para la medida de esta actividad en *E. coli*. El método consiste en la determinación de la formación de ADP dependiente de homoserina mediante acoplamiento del sistema piruvato quinasa/ láctico deshidrogenasa. En primer lugar se determinó, en extractos crudos, la actividad dependiente de homoserina, resultando esta ser de aproximadamente un 60% de la actividad total (Tabla VI). Utilizando este método de medida, Thèze *et al.* (1974) describieron que esta actividad constituía un 10% en un extracto crudo de *E. coli*. La actividad no dependiente de sustrato medida por nosotros se debe probablemente a liberación de ADP llevada a cabo por ATPasas y/u oxidación del NADH realizada por NADH oxidasas presentes en el extracto. En levaduras, existen varias actividades ATPasas localizadas en la membrana plasmática o mitocondrial (Serrano, 1984); las actividades NADH oxidasas se localizan en la membrana mitocondrial (Duell *et al.*, 1964). A pesar de ello, ambas deben estar presentes en los extractos crudos.

La actividad dependiente de sustrato no aumentó cuando las células se cultivaban en presencia de metionina. Este hecho podría explicarse si la inducción por metionina de la síntesis de la homoserina quinasa fuera muy pequeña como ocurre con la aspartato semialdehído deshidrogenasa que sólo aumenta de 1.5 a 2 veces en estas condiciones (de Robichon-Szulmajster *et al.*, 1973). Esta actividad tampoco disminuía en la fracción P45 cuando ésta se obtenía directamente a partir de un extracto crudo ni cuando se añadía KCN y FNa a las mezclas de reacción preparadas con esta fracción (Tabla VII). Resultados similares fueron obtenidos por Flavin (1962), utilizando un extracto crudo de levadura panadera.

Sin embargo, la actividad dependiente de sustrato aumentó hasta un 90% en la fracción P45 si previamente se eliminaban del extracto crudo ácidos nucleicos y otros componentes celulares, mediante ultracentrifugación y precipitación con sulfato de protamina (Tabla VIII).

Caracterización

La caracterización de la actividad homoserina quinasa se realizó en la fracción P45 obtenida como se describe en el apartado 4.1.1. de Métodos. Esta actividad aumentaba proporcionalmente con la temperatura entre 27°C y 52°C (Figura 6). En este experimento se calculaba la velocidad inicial de la enzima a cada temperatura siguiendo la reacción durante tiempos siempre inferiores a 5 minutos. Probablemente este tiempo es muy pequeño para que la desnaturalización por calor que la enzima podría sufrir se haga patente. Por otro lado, el tampón utilizado para la purificación de esta enzima contiene 1 mM de L-treonina, la cual, podría protegerla de la desnaturalización por calor como ocurre con la de *E. coli* (Thèze *et al.* 1974).

A continuación se estudió la variación de la actividad homoserina quinasa con la concentración de cada uno de sus sustratos así como el efecto de aminoácidos relacionados con la ruta de la treonina sobre esta actividad. La homoserina quinasa de levaduras sigue una cinética normal de tipo Michaelis Menten a concentraciones subsaturantes de cada uno de sus sustratos, L-homoserina y ATP (Figuras 7 y 8 respectivamente). Por el contrario, concentraciones de L-homoserina superiores a 0.5 mM producen una inhibición parcial de la actividad. La constante de inhibición de la homoserina quinasa de *Sacch. cerevisiae* por la L-homoserina calculada en este trabajo (2 mM) coincide exactamente con la descrita por Shames *et al.* (1984) para la de *E. coli*. Ensayos cinéticos realizados con homoserina quinasa de *E. coli* purificada hasta homogeneidad parecen indicar que la enzima presenta dos sitios diferentes de interacción con la L-homoserina, uno para la actividad catalítica y otro para la inhibición. Dado que el contenido interno de homoserina en *E. coli* es 10 veces menor a la constante de inhibición (Szczeniul y Wampler, 1976) el sitio de inhibición no parece tener sentido fisiológico. Por el contrario, la cantidad de homoserina acumulada por cepas silvestres de *Sacch. cerevisiae* cultivadas en sulfato amónico, aproximadamente 3 mM (Seibold *et al.*, 1981), es muy aproximada a la constante de inhibición de la homoserina quinasa por la homoserina. A pesar de que la

distribución de este aminoácido entre los distintos compartimentos celulares es desconocida no puede descartarse el que en levaduras esta inhibición sí tenga importancia en la regulación de la síntesis de la treonina.

Hasta el momento los únicos estudios realizados sobre la actividad homoserina quinasa de levaduras, llevadas a cabo por de Robichon-Szulmajster *et al.* (1966), se habían limitado a la asignación de la misma al gen *THR1*, por estar ausente en un mutante *Thr1*⁻. Resultados de este mismo grupo (de Robichon-Szulmajster, 1967) indicaban que esta actividad parecía inhibirse por treonina. Sin embargo no se especificaban ni la concentración de treonina utilizada, ni el grado de inhibición obtenido. En esta Tesis se ha comprobado que, en efecto, la treonina inhibe la actividad homoserina quinasa (Tabla XI y Figura 11). Esta inhibición no parece ser muy potente si se considera que la constante de inhibición por treonina calculada (14 mM) es aproximadamente 11 veces mayor al contenido de treonina libre en el citoplasma de las células de *Sacch. cerevisiae* (Messenguy *et al.*, 1980) cuando estas han sido cultivadas en sulfato amónico. Al igual que en *E. coli*, (Thèze *et al.*, 1974) la inhibición por treonina parece ser competitiva respecto de la ejercida por la homoserina (resultados no mostrados) por lo que podría pensarse que ambas compiten por el mismo sitio en la enzima. A diferencia de lo que ocurre en *E. coli* (Burr *et al.*, 1976) análogos estructurales de la treonina y homoserina no parecen inhibir la actividad homoserina quinasa de *Sacch. cerevisiae* (Tabla XI).

Por todo lo expuesto, en condiciones fisiológicas, la inhibición por treonina de la actividad homoserina quinasa no parece ser muy relevante en la regulación de la síntesis de la treonina. Como se discutirá más adelante esta inhibición sí podría tener importancia en cepas con un fondo genético superproductor de treonina.

Actividad aspartato quinasa

Purificación

Al igual que ocurre en extractos de *E. coli* (Thèze *et al.* 1974), la fracción utilizada para la medida de actividad homoserina quinasa contiene también actividad aspartato quinasa (Tabla IX). Ambas actividades pueden, pues, ensayarse mediante el mismo método y al mismo pH cambiando únicamente el sustrato específico de cada enzima, homoserina o aspartato respectivamente. La especificidad de los ensayos puestos a punto se deduce de la carencia de actividad aspartato quinasa u homoserina quinasa en cepas *hom3 THR1* y *HOM3 thr1* respectivamente (Tabla X).

Las medidas de actividad aspartato quinasa realizadas hasta el momento en *Sacch. cerevisiae* se han basado en la cuantificación de la formación de aspartohidroxamato por extractos crudos incubados con los sustratos de la enzima (aspartato y ATP), iones Mg^{++} como cofactor e hidroxilamina. El aspartohidroxamato se forma por reacción entre la hidroxilamina y el aspartil-fosfato producido por la aspartato quinasa. Este método, descrito por S. Black y N. H. Wright en 1955 y modificado por Stadman *et al.* (1961), no es muy específico para la actividad aspartato quinasa cuando ésta se mide en extractos crudos o parcialmente purificados debido a la formación de otros ácidos hidroxámicos distintos al aspartohidroxamato (Black, 1962). Otros dos métodos han sido utilizado para medir la aspartato quinasa de procariontas:

- acoplamiento de la reacción a la aspartato semialdehido deshidrogenasa, la cual reduce el aspartil-fosfato a β -aspartato-semialdehido con NADPH (Black, 1962).

- acoplamiento del sistema piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa (Wampler y Westhead, 1968 modificado por Thèze *et al.* 1974).

En ambos métodos la actividad aspartato quinasa se mide mediante acoplamiento de una reacción enzimática secundaria. En

esta Tesis se utilizó la segunda reacción que, sobre la primera, tiene las siguientes ventajas: 1) La piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa son enzimas comerciales y, por tanto, no es necesario purificarlas previamente y, 2) no están implicadas en la ruta de biosíntesis de la treonina.

Caracterización

Según los resultados expuestos en la Tabla XI, la aspartato quinasa de levaduras se inhibe por treonina y no por metionina. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por de Robichon-Szulmajster y Corrivaux (1963) utilizando el método del hidroxamato. Sin embargo, no se ha observado la inhibición por 10 mM de lisina y 10 mM de homoserina descrita por estos autores y que era del 28% y 40 % respectivamente. Teniendo en cuenta que la desviación típica de las medidas de actividad aspartato quinasa realizadas mediante el método del hidroxamato es del 15 % consideramos que las inhibiciones descritas no son significativas. La inhibición por lisina tampoco fue detectada por Stadman *et al.* (1961). La inhibición por homoserina tampoco se ha detectado en una cepa Thr1⁻, carente de actividad homoserina quinasa. En la mezcla de reacción preparada con un extracto de esta cepa sólo está presente la actividad aspartato quinasa y, por tanto, se evita la interferencia que podría tener la actividad homoserina quinasa en este ensayo.

La constante de inhibición de la aspartato quinasa por la L-treonina calculada en esta Tesis, 4 mM, coincide aproximadamente con la descrita por de Robichon-Szulmajster *et al.* (1967), 3 mM. Según estos autores, la inhibición por treonina es de tipo alostérico. La hidroxinorvalina, análogo estructural de la treonina, también inhibe esta actividad (Figura 11).

Como ya se mencionó en la Introducción, en levaduras, la regulación de la biosíntesis de aminoácidos se realiza principalmente a nivel de actividad enzimática. A este nivel, la treonina es la que ejerce el papel principal en la regulación de su biosíntesis; tres enzimas de esta ruta se inhiben por treonina: aspartato quinasa, homoserina quinasa y homoserina

deshidrogenasa. La constante de inhibición por treonina de la actividad homoserina deshidrogenasa, 30 mM (Karassevitch y de Robichon-Szulmajster, 1963), es superior a las calculadas en este Trabajo para las otras dos actividades retroinhibibles por treonina, por tanto, probablemente esta enzima tiene un papel menos importante que las otras dos en la regulación de la síntesis de treonina. De los resultados obtenidos sobre la caracterización de las actividades homoserina quinasa y aspartato quinasa y de lo anteriormente expuesto para la actividad homoserina deshidrogenasa se desprende que la aspartato quinasa es la enzima clave en el control del flujo metabólico a través de esta ruta.

Actividad treonina sintetasa

Obtención y purificación de homoserina-fosfato

Como ya se mencionó en Resultados, la puesta a punto un método para la medida de la actividad treonina sintetasa de *Sacch. cerevisiae* requería, en primer lugar, sintetizar *in vitro* y purificar homoserina-fosfato, precursor de esta enzima. Distintos autores han descrito la síntesis de homoserina-fosfato a partir de homoserina y ATP, utilizando homoserina quinasa de levadura de panadería (Watanabe y Shimura, 1956; Flavin, 1962; Schilkraut y Greer, 1973), *B. subtilis* (Skarstedt y Greer, 1973; Daniel, 1976) y *E. coli* (Szczesniul y Wampler, 1976). En este trabajo se utilizó homoserina quinasa parcialmente purificada procedente de una cepa de *Sacch. cerevisiae* que contiene un plásmido multicopia portador del gen *THR1* que determina para esta enzima. Esta cepa tiene la ventaja de presentar una actividad homoserina quinasa 10 veces superior a la de una silvestre (Martín-Rendón y Calderón, resultados no publicados).

La reacción catalizada por la homoserina quinasa que se seguía midiendo la cantidad de ADP producida en la mezcla de reacción, alcanzó sólo un 23% tras tres horas de incubación a 30°C (Figura 3). La velocidad inicial de la homoserina quinasa en las mismas condiciones utilizadas en el ensayo y calculada previamente al mismo, era de 12 $\mu\text{moles de ADP} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ (resultados no

mostrados). Dado que la concentración de L-homoserina en la mezcla de reacción era de 50 μ moles/ml, se esperaba que, transcurridas las tres horas, la reacción hubiese finalizado. Este bajo rendimiento no se puede explicar por la inhibición que la homoserina ejerce sobre la actividad homoserina quinasa puesto que la concentración de homoserina utilizada tanto en la mezcla de reacción como en el ensayo previo eran idénticas. Si se considera que una preparación de homoserina quinasa de levadura de panadería mantiene el 100% de actividad tras tres horas de incubación a 30°C (resultados no mostrados), la disminución de la actividad no parece deberse tampoco a la desnaturalización térmica que la homoserina quinasa podría sufrir durante la incubación. Además podría ocurrir que, como en *E. coli* (Thèze *et al.*, 1974), la homoserina protegiera a la enzima de la desnaturalización por calor. La explicación más plausible que resta es que la actividad homoserina quinasa sea inhibida por alguno de sus productos, homoserina-fosfato ó ADP. En el caso de que el ADP fuese el responsable de la inhibición este fenómeno podría evitarse añadiendo a la mezcla de reacción un sistema regenerador de ATP como por ej. el de la creatina quinasa.

En la literatura se describen varios métodos para separar la homoserina-fosfato del resto de los componentes de la mezcla de reacción: precipitación con bario-etanol (Watanabe y Shimura, 1956), cromatografía de intercambio catiónico seguida de otra de intercambio aniónico (Skarstedt y Greer, 1973) y una combinación de los dos anteriores (Szczeniul y Wampler, 1976). En este trabajo y con el mismo objetivo se realizó una precipitación con bario-etanol seguida de una cromatografía de intercambio aniónico (apartado 4.2.1.2. de Métodos). La prueba de la ninhidrina aplicada a las fracciones procedentes de la cromatografía de intercambio iónico, reveló la existencia de aminoácidos tanto en las fracciones correspondientes a la entrada de muestra en la columna como en algunas de las obtenidas durante la elución con fórmico 50 mM (Figura 12). Mediante cromatografía en capa fina y HPLC llevadas a cabo antes y después de tratar las fracciones con fosfatasa alcalina, se demostró que en los dos grupos de fracciones estaban presentes dos componentes: uno mayoritario, que resultó ser homoserina-

fosfato, y otro minoritario, que podría ser homoserina no eliminada totalmente mediante la precipitación con bario-etanol (Figuras 13, 14 y 15). Probablemente las condiciones utilizadas para la separación de homoserina-fosfato (pH, fuerza iónica, volúmen de muestra y componentes presentes en la misma) no son las más adecuadas. La columna utilizada parece saturarse con la pequeña cantidad de homoserina-fosfato existente en la fracción 32-36 y, por tanto, el resto de este compuesto no quedaría retenido en la columna. No se descarta la posibilidad de que existan dos conformaciones diferentes de la molécula de homoserina-fosfato con diferente afinidad por la matriz de la columna utilizada y que cada fracción contenga uno de ellos.

En total se recuperaron 889 μ moles de homoserina-fosfato que suponen aproximadamente un 12% de la cantidad total de L-homoserina utilizada para la síntesis (Tabla XII). Considerando que, como se indicó anteriormente, la reacción de la homoserina quinasa había transformado sólo un 23% de la homoserina, se concluye que se ha recuperado aproximadamente la mitad de la cantidad total de homoserina-fosfato obtenida.

Medida de la actividad

Para la medida de la actividad treonina sintetasa de microorganismos se describen en la literatura métodos basados en la determinación de la liberación de fosfato desde la homoserina-fosfato (Flavin y Slaughter, 1960; Szczesiul y Wampler, 1976), o bien, de la formación de treonina (Flavin, 1962; Schildkraut *et al.*, 1973; Skarstedt y Greer, 1973). La liberación de fosfato se determina mediante el método de Fiske y Subbarow (1925) que, como ya se indicó anteriormente, resulta muy laborioso para realizar el número de medidas que los ensayos cinéticos requieren. La cantidad de treonina se determina midiendo el acetaldehído que se libera desde la misma al oxidarse con periodato mediante acoplamiento de la reacción de la alcohol deshidrogenasa. Este método no ha resultado ser repetitivo ni específico cuando se aplica a extractos crudos de *Neuróspora* o levaduras de panadería (Flavin, 1962). Por todo lo expuesto, resultaba conveniente poner a punto

un método sencillo, específico y repetitivo para la medida de la actividad treonina sintetasa en levaduras.

Utilizando la homoserina-fosfato presente en la fracción 3-25 descrita en Resultados, se ha puesto a punto un método para la medida de esta actividad en *Sach. cerevisiae*. Este método se basa en la medida de aminoácidos mediante HPLC (apartado 5.1.1.2. de Métodos) y tiene la ventaja, sobre los métodos anteriormente descritos, de que permite la determinación simultánea tanto de la desaparición del sustrato de la enzima, homoserina-fosfato, como de la aparición del producto, treonina, sin la necesidad de una reacción enzimática secundaria. La cromatografía por HPLC es, además, un método muy repetitivo y de gran sensibilidad.

De la medida de la desaparición de homoserina-fosfato y de la aparición de treonina en mezclas de reacción preparadas con extractos crudos procedentes de una cepa Thr4⁺ y otra Thr4⁻ (Figuras 16a y 16b respectivamente) se concluyó que el método utilizado es específico para la medida de la actividad treonina sintetasa y que, efectivamente, esta enzima está determinada por el gen *THR4*. En la mezcla de reacción preparada con el extracto de la cepa Thr4⁻ se observa una pequeña disminución de la cantidad de homoserina-fosfato. Puesto que la cantidad de treonina no aumentó proporcionalmente, no parece probable que el alelo *thr4* presente en la cepa utilizada (F4) determine una treonina sintetasa con actividad rezumante. La hidrólisis del fosfato debida a la incubación no parece tampoco ser la causa de este fenómeno ya que, no se produce cuando la mezcla de reacción se incuba en ausencia de extracto (Figura 16c). Además, el enlace éster formado entre el grupo fosfato y la homoserina es de gran estabilidad y sólo se hidroliza mediante tratamiento con ácido (Watanabe y Shimura, 1956). La existencia en el extracto de una fosfatasa inespecífica si que podría explicar la desaparición de homoserina-fosfato. En este sentido, entre las enzimas con actividad fosfatasa existentes en *Sacch. cerevisiae* se encuentra la fosfatasa alcalina, enzima de actividad inespecífica y localización intracelular (Suomalainen *et al.*, 1960); además al pH utilizado en el ensayo de la treonina sintetasa (pH= 8) la velocidad de esta enzima es muy cercana a la velocidad máxima (Gorman y Hu, 1969). Este fenómeno podría también

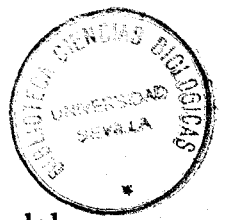
explicarse si la treonina sintetasa de *Sacch. cerevisiae*, al igual que la de *B. subtilis* (Skarstedt y Greer, 1973; Schildkraut y Greer, 1973) realizara, mediante una reacción deshidratasa secundaria, la transformación directa de homoserina-fosfato en α -cetobutirato sin pasar por treonina.

Búsqueda de mutantes desregulados

Reversión de cepas *thr1*

La primera estrategia seguida para la búsqueda de mutantes desregulados no dio los frutos esperados pero proporcionan algunos datos respecto de cómo tiene lugar la regulación de la ruta. Por los motivos ya expuestos se obtuvieron mutaciones Thr⁻ en una cepa portadora de otras auxotrofías debidas a mutaciones fin de mensaje de los tres tipos: ámbar (*trp1-1*), ocre (*lys1-1* y *ura4o*) y ópalo (*leu2u*). En total se obtuvieron 11 cepas Thr⁻ de las cuales 8 (CJ1 a CJ8) resultaron ser *thr1* y 3 (CJ9 a CJ11), *thr4* (Tabla XIII).

Se trataba en primer lugar de detectar mutaciones de fin de mensaje para descartar las cepas correspondientes de estudios posteriores. Cuando la supresión de un marcador se produce por alteraciones en el ARN_t, la eficiencia de la misma depende de varios factores: tipo de mutación fin de mensaje (ámbar, ocre u ópalo), localización de la mutación dentro del locus que determina el marcador, grado de expresión del supresor y aminoácido insertado por el mismo (Sherman, 1982). Por estos motivos, marcadores diferentes son suprimidos en distinto grado por un mismo supresor y viceversa (Hawthorne y Leupold, 1979). Además, al igual que en bacterias, en levaduras la supresión puede producirse mediante otros mecanismos diferentes a la alteración de ARN_t. Entre ellos se encuentran alteraciones en algunos genes determinantes de los componentes ribosómicos y alteraciones extracromosómicas (factor ϕ^+). También se ha descrito inducción de la supresión debida a ciertas condiciones experimentales: supresión fenotípica (Sherman, 1982). Por todo lo expuesto, el fondo genético de la cepa parece tener gran relevancia en la eficiencia con que un marcador puede ser suprimido.



En principio, sólo en la cepa CJ11 se produjo correversión del marcador *thr* con alguno de los otros, concretamente con el marcador *lys* (Tabla XIV). Dado que la mutación que tiene *lys1-1* es un fin de mensaje ocre, la mutación presente en este alelo *thr4* debe ser también de este tipo. Así, los 10 revertientes $Lys^+ Thr^+$ podrían deber este fenotipo a la aparición de supresores capaces de suprimir ambas mutaciones. El hecho de que 5 de los 15 Lys^+ obtenidos continúen siendo Thr^- podría deberse bien a mutación directa en el gen *LYS1*, o bien a la aparición de un supresor capaz de suprimir eficientemente la mutación ocre del alelo *lys1-1* pero no la del *thr4*.

También requiere una explicación la aparición de otros tipos de correvertientes. En primer lugar y teniendo en cuenta que las cepas Thr^- se obtuvieron mediante mutagénesis con nitrosoguanidina, un mutágeno muy potente, podría predecirse que, además de la alteración Thr^- seleccionada, han podido producirse otras modificaciones genéticas secundarias. La existencia en las cepas CJ1 y CJ2 de un fondo genético que permitiese una mayor eficacia en la supresión podría explicar el que la correversión $Lys^+ Ura^+$ se diese únicamente en estas dos cepas y no en las restantes.

Algunas de las alteraciones ribosómicas mencionadas anteriormente, son capaces de suprimir simultáneamente marcadores de fin de mensaje diferentes (Sherman, 1982). Este hecho podría explicar el que el revertiente Leu^+ obtenido a partir de la cepa CJ2 (marcador de tipo ópalo) lo fuese también para el uracilo (marcador de tipo ocre).

Como se demostró en Resultados, la homoserina quinasa se inhibe por treonina. No se sabe si la treonina sintetasa también es regulable. Dado que esto es poco probable, por tratarse de la última enzima de la ruta, para la búsqueda de revertientes Thr^+ se utilizaron sólo las cepas CJ1 a CJ8, ninguna de las cuales parecía deber el fenotipo Thr^- a una mutación de fin de mensaje en *THR1*. Esta hipótesis parece confirmarse por las bajas frecuencias de reversión espontánea (mayor de 4.2×10^{-7}) e inducida mediante irradiación con luz ultravioleta (mayor de 3.2×10^{-5}) que se obtuvieron (Tabla XV).

Según se mencionó en Resultados, se probaron 2538 revertientes de las distintas cepas pero ninguno resultó ser excretor de treonina ni resistente a hidroxinorvalina. El protocolo seguido para inducir la reversión, irradiar con luz ultravioleta un césped de células inmediatamente después de ser sembrado (apartado 6.1.2. de Métodos), aseguraba que los revertientes obtenidos fuesen independientes. Además, como se comprobó posteriormente, entre ellos, algunos resultaban ser termosensibles, bien para el marcador *thr1*, bien para otro diferente (Tabla XV), lo que es indicativo de la existencia de variabilidad genética.

Como se demostró en Resultados, la cepa a partir de la cual se obtuvieron los auxótrofos para treonina, XCR13-5A, es portadora de al menos un alelo que permite la excreción de treonina. Por este motivo no parece probable que entre los revertientes se encontrasen cepas que superprodujesen treonina pero no pudiesen excretarla al medio de cultivo.

Delgado *et al.* (1982) demostró que de cada 100 revertientes Hom3⁺ obtenidos a partir de una cepa de *Sacch. cerevisiae* Hom3⁻, uno resultó ser superproductor y excretor de treonina. La actividad aspartato quinasa presente en estas cepas era insensible a retroinhibición por treonina. Por todo lo expuesto anteriormente y en concordancia con los resultados obtenidos sobre la caracterización de la actividad homoserina quinasa, podría concluirse que la inhibición que la treonina ejerce sobre esta actividad enzimática no parece tener gran relevancia en la regulación de la biosíntesis de treonina o, al menos, la tiene en menor grado que la que se produce sobre la aspartato quinasa. No se descarta la posibilidad de que, en el caso de la homoserina quinasa, la insensibilización a inhibición por treonina no implique superproducción de treonina, o bien que la cantidad producida sea insuficiente para ser detectada mediante la prueba de alimentación cruzada. También podría ocurrir que los marcadores *thr1* utilizados no fuesen adecuados para que la alteración buscada se diese por reversión del marcador. De cualquier forma, creemos que este resultado negativo no implica que el método no sea efectivo sino que puede estar limitado a aquellos casos en que la regulación de la

enzima correspondiente sea muy importante en la regulación general de la ruta.

Resistencia a hidroxinorvalina

Efecto de la hidroxinorvalina

La otra estrategia utilizada para obtener mutantes desregulados se basaba en la búsqueda de mutantes resistentes a hidroxinorvalina. Este compuesto ya había sido utilizado en bacterias para el aislamiento de mutantes superproductores de treonina pero no había sido utilizado en levaduras. Por tanto, en primer lugar, se realizaron algunos experimentos para determinar su efecto sobre *Sacch. cerevisiae*.

En *E. coli*, la inhibición del crecimiento producida por hidroxinorvalina se contrarresta por la adición al medio de cultivo de aminoácidos relacionados con la ruta de biosíntesis de la treonina (Cohen *et al.*, 1965). Este efecto se ha achacado a que dado que la hidroxinorvalina induce "hambre" de aminoácidos de la ruta de la treonina, la adición de dichos aminoácidos al medio paliaría esa deficiencia. En *Sacch. cerevisiae*, el efecto de la hidroxinorvalina no se contrarresta exclusivamente por los aminoácidos relacionados con la ruta de biosíntesis de la treonina (Tabla XVI). Según se muestra en Resultados, el efecto antagonista de distintos aminoácidos se probó en medios sólido y líquido con resultados similares. En medio sólido se probaron únicamente treonina, metionina e isoleucina a las concentraciones utilizadas habitualmente cuando estos aminoácidos se añaden como requerimientos para cepas auxótrofas. Entre ellos, la treonina parece contrarrestar el efecto de forma más patente que la metionina o la isoleucina, si bien, es preciso señalar que este aminoácido se usa a una concentración mayor que la de los otros dos.

En medio líquido todos los aminoácidos probados, relacionados o no con la ruta de la biosíntesis de la treonina, fueron capaces de contrarrestar parcial o totalmente el efecto de la hidroxinorvalina sobre el crecimiento (Tabla XVI). Se puede así concluir que este

efecto no se evita exclusivamente cuando se palia el "hambre" de aminoácidos a que las células podrían estar sometidas en presencia de hidroxinorvalina. Una explicación alternativa sería que se diera competencia a nivel de las permeasas de aminoácidos. Algunos análogos de aminoácidos, como por ej. los D-aminoácidos, son transportados únicamente a través de la GAP, sin utilizar las permeasas "específicas" que transportan sus aminoácidos naturales análogos (Rytka, 1975). El amonio regula negativamente tanto la síntesis, como la actividad de la GAP (Grenson, 1970). Por tanto, en presencia de amonio, estos análogos no pueden acceder al interior de la célula. En medio SD, que contiene sulfato amónico como fuente de nitrógeno, la hidroxinorvalina no ejerce efecto aparente sobre el crecimiento de un césped de *Sacch. cerevisiae*. De aquí podría deducirse que la hidroxinorvalina utiliza mayoritariamente la permeasa general de los aminoácidos para entrar en la célula. Así lo confirman experimentos en los que se determinó que la hidroxinorvalina compite con la treonina para entrar en la célula, siendo así que este aminoácido utiliza preferentemente la GAP (Martín-Rendón *et al.*, en preparación). Por otro lado, algunos mutantes aislados como resistentes a hidroxinorvalina eran, además, resistentes a D-histidina, lo cual, indica la carencia de permeasa general de aminoácidos (mutantes *gap1*. Rytka, 1975) o la incapacidad de activación de la misma (mutantes *npr1*. Grenson, 1983). Además, y según se ha podido demostrar (resultados no mostrados) las cepas *gap1* son resistentes a hidroxinorvalina.

Así pues, la minoración del efecto tóxico de la hidroxinorvalina ejercida por otros aminoácidos podría deberse a competencia entre ellos por la permeasa GAP. De los aminoácidos relacionados con la ruta de biosíntesis de la treonina, la homoserina parece contarrestar en mayor grado el efecto de la hidroxinorvalina. Este fenómeno podría explicarse por el hecho de que la homoserina se añadía en forma DL- y a una concentración final de 2 mM mientras que el resto de los aminoácidos se usaron en su forma L- y a la mitad de concentración. Según lo mencionado anteriormente, la forma D de la homoserina podría también competir con la hidroxinorvalina por la entrada en la célula a través de la GAP. No se conocen la/s vía/s de entrada de la L-homoserina.

Si la competencia por la GAP fuese el único mecanismo responsable del efecto descrito, sería lógico pensar que cuanto mayor fuese la afinidad de la permeasa por un aminoácido, mayor sería la atenuación por este aminoácido del efecto tóxico de la hidroxinorvalina. Las constantes de transporte a través de la GAP son: para la L-asparagina de 350 μ M (Gregory *et al.*, 1982), para la L-treonina de 40 μ M (Martín-Rendón *et al.*, en preparación) y de 8 μ M para la L-citrulina (Grenson *et al.*, 1970). Los resultados obtenidos (Tabla XVI) indican que la asparagina contrarresta el efecto de la hidroxinorvalina en mayor grado que la treonina o la citrulina. Por tanto, debe existir un tercer mecanismo, además de los dos anteriormente mencionados, implicados en este fenómeno.

La permeasa general de los aminoácidos, está sujeta a represión por catabolismo del nitrógeno (Cooper, 1982b). Siendo la asparagina una de las "mejores" fuentes de nitrógeno (Cooper, 1982a) y la prolina una de las más "pobres", cuando las dos se suministran simultáneamente la GAP se sintetizaría en menor grado que cuando se suministra sólo prolina. El que células creciendo en presencia de asparagina e hidroxinorvalina crezcan a tasa de crecimiento normal podría explicarse por el hecho de que en estas condiciones la síntesis de la GAP estaría reprimida y, por tanto, la hidroxinorvalina no podría acceder al interior de las células.

Adicionalmente la atenuación del efecto de la hidroxinorvalina podría deberse a transinhibición, inhibición del transporte de un compuesto por otro que no guarda similitudes estructurales con él ni es transportado por el mismo sistema (Cooper, 1982b).

Aislamiento de mutantes resistentes a hidroxinorvalina y excretores de treonina

Según se describió en Resultados, a partir de la cepa XCR13-5A se han obtenido numerosos mutantes resistentes a hidroxinorvalina aparecidos tanto de forma espontánea, cómo tras mutagénesis con nitrosoguanidina. En total se han estudiado 150 mutantes Ahv^R. De los 128 inducidos por nitrosoguanidina 60, además, excretaban treonina, mientras que ninguno de los 22

mutantes espontáneos que se obtuvieron resultaron ser excretores (Tabla XVIII).

Las colonias Ahv^R aparecidas tras tratamiento con nitrosoguanidina eran muy heterogéneas en cuanto a tamaño y grado de resistencia a hidroxinorvalina. Este efecto es frecuente y puede atribuirse a que al ser la nitrosoguanidina un mutágeno muy potente, induce no sólo las mutaciones que se desean obtener, sino también otras que afectan al crecimiento de las células. Como consecuencia, el fondo genético de los mutantes inducidos puede diferir ligeramente y esta diferencia puede afectar a la expresión fenotípica de las mutaciones. Entre unas 400 colonias Ahv^R inducidas, se seleccionaron únicamente aquellas que mostraban un fenotipo más claro. Si el grado de resistencia a hidroxinorvalina estuviese relacionado con la producción de treonina y ésta con la mutación inducida y/o el fondo genético, las cepas desechadas serían en su mayoría no excretoras y, por tanto, se estaría sobreestimando la frecuencia de mutantes Thr^E entre los Ahv^R. Por el contrario, los resistentes espontáneos que se obtuvieron eran bastantes homogéneos; todos ellos fueron analizados para el carácter Ahv^R.

Relación superproducción-temperatura

Como se indicó en la Introducción, cepas con un fondo genético superproductor de treonina que presenten al menos uno de los alelos *tex1-1* o *tex2-1* excretan este aminoácido al medio de cultivo. Así pues, en la cepa parental, XCR13-5A, debe existir al menos uno de estos alelos según se deduce de la relativamente alta frecuencia con la que se generan cepas excretoras de este aminoácido.

Del análisis de dominancia/recesividad de los alelos que confieren los fenotipos Ahv^R y Thr^E respecto de los silvestres se concluye que la resistencia a hidroxinorvalina es un carácter dominante en heterocigosis, independientemente de la temperatura de incubación. Puesto que los diploides de las cepas AHV-6 a AHV-11 no excretaban treonina a 22°C y si lo hacían a 37°C (Tabla XIX), se concluye que la excreción es dominante únicamente a esta última

temperatura. Estas diferencias podrían deberse simplemente a que a 22°C en ninguno de los casos se alcanza la concentración mínima de treonina requerida para que crezca la cepa Thr⁻ que se utiliza en la prueba de excreción pero sí a 37°C. En principio pueden darse tres explicaciones a este fenómeno: el que varíe con la temperatura la producción de treonina, la cantidad total de biomasa de levadura obtenida y/o la velocidad de excreción de la treonina al medio de cultivo.

La producción de treonina por célula podría aumentar con la temperatura de incubación, bien por influencia directa de ésta en la producción, o bien debido al aumento de la tasa de crecimiento. Cuando las levaduras se cultivan en medio mínimo a una tasa de crecimiento determinada, la producción de treonina por célula es idéntica a diferentes temperaturas de cultivo (22°C, 30°C y 37°C). Por tanto, la producción de treonina en sí misma no se afecta por la temperatura (Martinez-Force y Benítez, 1989). Mediante experimentos de cultivo continuo estos mismos autores han demostrado que, en levaduras, la producción de treonina y la tasa de crecimiento son dos fenómenos parcialmente ligados. La concentración intracelular de treonina aumenta únicamente a tasas de crecimiento menores de 0.04 h⁻¹ medidas en medio mínimo con amonio como fuente de nitrógeno. En esta Tesis se ha medido la tasa de crecimiento de los mutantes cultivados a 30°C en este mismo medio (aproximadamente de 0.18 h⁻¹). No puede descartarse el que a 22°C la tasa de crecimiento alcanzada por los mutantes estuviese ligada a la producción de treonina.

Con la temperatura debe aumentar la tasa de crecimiento tanto de la cepa Thr⁻ utilizada para la detección como de la cepa cuyo fenotipo excretor se quiere determinar que, por tanto, alcanzará antes una biomasa determinada. Consecuentemente a 37°C el halo de excreción se hace visible antes que a 22°C. No puede descartarse que la temperatura también influya en la cantidad de treonina excretada al medio de cultivo y/o en el transporte de treonina hacia el interior del césped auxótrofo.

Caracterización bioquímica de los superproductores

Debido a la dominancia en heterocigosis de los todos los alelos Ahv^R y de algunos Thr^E, no pudo realizarse la clasificación de los mismos en grupos de complementación. Por este motivo se trató de clasificar las cepas seleccionadas en grupos según el tiempo al cual aparecía el halo de excreción alrededor de los diploides (Tabla XIX). Se caracterizaron bioquímica y genéticamente representantes de cada uno de los 4 grupos resultantes de esta clasificación. De la caracterización bioquímica se concluyó que al contrario de lo que ocurre a la estirpe silvestre, la aspartato quinasa de los mutantes es parcial o totalmente insensible a la inhibición por treonina e hidroxinorvalina (Tabla XX), y que los mutantes superproducen treonina e isoleucina pero no metionina (Figura 18). Cepas de *Sacch. cerevisiae* superproductoras de treonina con el mismo tipo de alteración en la aspartato quinasa habían sido obtenidas anteriormente mediante reversión de un alelo *hom3* (mutantes *hom3^R*; Delgado *et al.* 1982) o resistencia a borrelidina (mutantes BOR1; Nass y Poralla, 1976; Seibold *et al.*, 1981).

La actividad específica aspartato quinasa en los mutantes AHV-1, AHV-2, AHV-5 y AHV-6 era inferior a la presente en la cepa control XCR13-5A (Tabla XX). Para medir la actividad aspartato quinasa es necesario realizar previamente una purificación parcial de la misma. Las enzimas mutantes de estas cepas deben tener una configuración tridimensional diferente a la de la enzima presente en la cepa parental. La disminución en la actividad específica mencionada podría explicarse si la configuración de las estas enzimas mutantes son menos adecuadas que la silvestre para la purificación de las mismas mediante el proceso seguido. Seibold *et al.* (1981) también describieron que la actividad específica aspartato quinasa presente en los mutantes BOR1, purificada parcialmente de manera muy similar a la utilizada en esta Tesis, era aproximadamente la mitad de la que se obtenía a partir de la cepa parental.

A continuación se trató de establecer una relación entre producción de treonina y excreción. Al contrario de lo esperado, no existe relación entre el tiempo al cual aparecía el halo de excreción alrededor de los diploides, la producción de treonina y el grado de sensibilidad a inhibición por hidroxinorvalina y treonina de la

aspartato quinasa. Así, el diploide construido a partir de la cepa AHV-6 no excretaba treonina a 22°C, siendo sin embargo, esta cepa la que acumula una mayor cantidad de treonina (Tabla XIX, Figura 18). Este hecho podría deberse a que su tiempo de generación fuese menor al de los diploides contruidos con el resto de los mutantes, como así lo es a 30°C en medio SD el de la cepa AHV-6 respecto al de los otros mutantes y el control (1.5 veces superior, resultados no mostrados). De hecho es posible que la acumulación de una gran cantidad de treonina unido a la sólo parcial insensibilidad a treonina de su aspartato quinasa pudiera tener un efecto inhibitor sobre el crecimiento de la cepa. La cepa AHV-1 es incapaz de alcanzar una D.O.₆₆₀ de 0.8 a la que se ha determinado que las demás cepas alcanzan la fase exponencial tardía, punto en el cual las células acumulan una mayor concentración de treonina (Seibold *et al.*, 1981). Dado que para medir la cantidad interna de aminoácidos, las células se recogían a esta D.O., la cantidad acumulada por la cepa AHV-1 no fue determinada.

Los fenómenos anteriormente descritos podrían explicar el que mutantes cuya aspartato quinasa es totalmente insensible a treonina e hidroxinorvalina no produzcan mayor cantidad de treonina que aquellos con una aspartato quinasa parcialmente sensible.

Las cepas Ahv^R Thr^E acumulan entre 249 y 497 nmoles de treonina/mg de peso seco. Estas cantidades son un poco más elevadas que las acumuladas por cepas *hom3^R* (entre 143 y 302 nmoles/mg de peso seco; Delgado *et al.*, 1982) o BOR1 (entre 100 y 262 nmoles/mg de peso seco; Seibold *et al.*, 1981). Los mutantes superproducen también isoleucina (entre 4 y 10 veces más que la acumulada por la cepa silvestre), pero no metionina. Resultados similares fueron descritos por Seibold *et al.* (1981) para los mutantes BOR1 los cuales, además, acumulan aproximadamente 15 veces más homoserina que las cepas silvestres. Estos resultados, unidos a los de esta Tesis, parecen indicar que en un fondo genético superproductor de treonina la regulación por homoserina y/o por treonina de la actividad homoserina quinasa parece tener cierta importancia. El aislamiento de mutantes insensibles a estos controles podría suponer la producción de una cantidad de treonina

aún mayor. El que los mutantes no acumulen metionina parece indicar que la ruta específica para la biosíntesis de la misma está fuertemente regulada. En este sentido, se ha descrito que la homoserina O-transacetilasa, primera enzima de esta ruta, se inhibe y su síntesis se reprime por metionina y S-adenosilmetionina (Robichon-Szulmajster *et al.*, 1967; Cherest *et al.*, 1969; Cherest *et al.*, 1971).

Caracterización genética de los superproductores

De la caracterización genética se concluye que la superproducción de treonina depende de un sólo gen en las cepas AHV-4 y AHV-5 (Tabla XXI) y en las YAHV-1, YAHV-2 e YAHV-5 (Tabla XXII). Se determinó también que en las cepas YAHV-1, YAHV-2 e YAHV-5 este carácter estaba ligado al gen *HOM3*; no se analizó este ligamiento en el resto de las cepas. No obstante, basándose en los datos disponibles tomados en conjunto, podría establecerse que, en los mutantes analizados, la superproducción de treonina depende de alelos del gen *HOM3* que determinan una aspartato quinasa insensible a retroinhibición por treonina.

Mención aparte merecen las segregaciones obtenidas a partir del diploide YAHV-5/XCR28-4A. Como se indicó anteriormente, la superproducción de treonina en la cepa AHV-5 también se comporta monogénicamente. Dado que esta cepa es la parental de la YAHV-5, se esperaba que este carácter segregara también monogénicamente en el cruzamiento YAHV-5 x XCR28-4A. Sin embargo tres tétradas procedentes del diploide YAHV-5/XCR28-4A segregaron 1 Thr^E : 3 Thr^{NE}. En estas tétradas, y en ninguna otra, aparecía una espora Hom3⁺ Thr^{NE}. Si el alelo *HOM3* presente en este diploide es el responsable de la superproducción de treonina, podría pensarse que las cepas derivadas de estas esporas la superproducen pero son incapaces de excretarla. Esta hipótesis se apoya por el hecho de que las tres son incapaces de crecer en medio mínimo suplementado con treonina siendo, por tanto, sensibles a treonina (Thr^S). Se han obtenido (resultados no mostrados) mutantes espontáneos resistentes a este efecto aislados a partir de estas cepas Thr^S. Estos mutantes excretan treonina al medio de

cultivo, por tanto, puede concluirse que en la cepa YAHV-5, al igual que en las otras, la superproducción de treonina depende de un alelo de *HOM3* que determina una aspartato quinasa insensible a retroinhibición por treonina. Por analogía con otros autores que también aislaron mutantes de este tipo (Delgado *et al.*, 1982), a los alelos responsables de la superproducción presentes en las cepas YAHV-1, YAHV-2 e YAHV-5 se denominaron *HOM3-R1*, *HOM3-R2* y *HOM3-R5* respectivamente.

Como se indicó en Resultados, el 15% de las esporas *Hom3*⁺ procedentes del cruzamiento número 5 (Figura 19), eran incapaces de crecer en medio con prolina como fuente de nitrógeno. En *Sacch. cerevisiae* se han aislado dos tipos de mutantes incapaces de catabolizar este aminoácido: los afectados en los genes determinantes de enzimas implicados en el catabolismo de la prolina (*PUT1* y *PUT2*) y mutantes "petite" (Brandriss y Magasanik, 1979). Existía la posibilidad de que alguna de las cepas utilizadas como parental en los cruzamientos realizados fuese portadora de alguna de estas alteraciones. Para comprobar esta hipótesis y puesto que las cepas "petite" son incapaces de crecer en medio con glicerol como fuente de carbono (Sherman *et al.*, 1979) se probó el crecimiento en este medio de todas las cepas implicadas en el cruzamiento 5. La cepa XCR28-4A, parental utilizado en todos los cruzamientos, no crecía en este medio. Se comprobó que el fenotipo "petite" de esta cepa se debía a una alteración nuclear monogénica ya que la capacidad de crecer en medio con glicerol, determinada en 10 tétradas procedentes del cruzamiento YAHV-2 x XCR28-4A, segregaba 2 + : 2 -. Este resultado es sorprendente por dos motivos; primero, porque no estaba descrito que las cepas parentales de las cuales desciende la XCR28-4A (cruzamiento 4, Figura 19) fuesen "petite"; segundo, porque si la mutación "petite" ha aparecido en esta cepa recientemente, es mucho más frecuente que lo sea por mutación mitocondrial que por mutación nuclear (Beck *et al.*, 1970). Sea cual sea su origen, lo cierto es que el hecho de que algunas de las cepas sea "petite" añade una dificultad inesperada al análisis de la resistencia a hidroxinorvalina y la superproducción de treonina debido, por un lado, a la imposibilidad de las cepas que lo portan de crecer en medio con prolina (medio en el que se prueba la

resistencia) y por otro lado, a la ralentización del crecimiento que estos mutantes presentan, incluso en el medio habitual. Para comprobar que, como cabría esperar, la resistencia a hidroxinorvalina y superproducción de treonina dependen del mismo alelo, *HOM3-R*, sería necesario realizar de nuevo el cruzamiento 5 utilizando como parental una cepa diferente carente de esta alteración.

El que todas las cepas *Ahv^R Thr^E* caracterizadas presenten una aspartato quinasa desregulada indica, en concordancia con los resultados obtenidos sobre la caracterización de actividades enzimáticas, que la enzima clave en la regulación de la biosíntesis de treonina en *Sacch. cerevisiae* es la aspartato quinasa.

CONCLUSIONES

1. Se ha puesto a punto un método específico y repetitivo para la medida de las actividades homoserina quinasa y aspartato quinasa en un extracto parcialmente purificado. En este ensayo se determina la liberación de ADP dependiente del sustrato específico de cada enzima, mediante acoplamiento del sistema piruvato quinasa/ lactato deshidrogenasa.
2. La actividad homoserina quinasa sigue una cinética de saturación normal con respecto al ATP ($K_m=0.6$ mM). Con respecto a la L-homoserina es hiperbólica sólo a concentraciones por debajo de 0.5 mM ($K_m=0.25$ mM); por encima de esta concentración, la L-homoserina produce una inhibición parcial de esta actividad ($K_i=2$ mM).
3. La actividad aspartato quinasa sigue una cinética de saturación normal con respecto a cada uno de sus sustratos, L-aspartato ($K_m= 4$ mM) y ATP ($K_m= 3.6$ mM).
4. La actividades homoserina quinasa y aspartato quinasa se inhiben por L-treonina ($K_i= 14$ mM y 4 mM respectivamente). La actividad aspartato quinasa se inhibe, además, por hidroxinorvalina ($K_i= 8.5$ mM). No se ha observado inhibición por L-homoserina de la actividad aspartato quinasa.
5. Se ha puesto a punto un método para ensayar la actividad treonina sintetasa basado en la medida, mediante HPLC, de la producción de treonina por un extracto crudo al que se ha añadido homoserina-fosfato. Esta actividad está determinada por el gen *THR4*.

6. La hidroxinorvalina inhibe parcialmente el crecimiento de *Sacch. cerevisiae* en medio con prolina como fuente de nitrógeno. Este efecto se atenúa cuando al medio de cultivo se añaden, además, otros aminoácidos.

7. Se han obtenido mutantes resistentes a hidroxinorvalina y excretores de treonina los cuales superproducen treonina e isoleucina. La superproducción depende de un alelo del gen *HOM3* que determina una aspartato quinasa insensible a retroinhibición por treonina.

BIBLIOGRAFIA

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.) 24:XXI-XXV

Arfin, S.M. y J. S. Gantt (1983). "Amino acids analogs as tools for the study of amino acid metabolism in mammalian cells". TIBS. Mayo:163-164

Atfield, G.N. y C.J.O.R. Morris (1961). "Analytical separations by high-voltage paper electrophoresis. Amino acids in protein hydrolysates". Biochem. J. 81:606-614

Bekerich, J. M.; M. Lambert y H. Heslot (1979). "Genetic control of lysine permease in *Saccharomycopsis lipolytica*" Arch. Microbiol. 122:201-205

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. 229-244

Black, S. (1962). "Conversion of aspartic acid to homoserine". En: "Methods in Enzymology" (Colowick S.P. y N.D. Kaplan, eds.). Academic Press, New York. 5:820-827.

Beck, J. C.; J. H. Parker, W. X. Balcavage y J. R. Mattoon (1970). En: "Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts" (Boardman, N. K.; A. W. Linnane y R. M. Smibe eds.). North Holland, Amsterdam. 194-204

Brandiss, M.C. y B. Magasanik. (1979). "Genetics and physiology of proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: mutations causing constitutive enzyme expression". J. Bacteriol. 140:504-507

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

Calderón, I.L. y E. Cerdá-Olmedo (1983). "Induction by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine of nuclear and cytoplasmic mutations in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mutat. Res.* 108:133-146

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, 18: 8787-8798

Cherest, H.; F. Eichler y H. Robichon-Szulmajster. (1969). "Genetic and regulatory aspects of methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* 97, 1:328-336

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

Cleland, W.W. (1970). "Steady state kinetics". En: "The Enzymes: kinetics and mechanism" (Boyer, P.D., ed.). Academic Press, New York and London. 2:1-45

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. Comm.* 19:546-550

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". Marseille, July. CNRS, París. 243-253

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

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

Cooper, T.G. (1982a). "Nitrogen Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*". En: "The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*. Metabolism and gene expression". 2:39-100

Cooper, T. G. (1982b). "Transport in *Saccharomyces cerevisiae*". En: "The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*. Metabolism and gene expression". 2:399-462

Daniel, J. (1976). "Azide-dependent mutants in *E. coli* K12". Nature. 264:90-93

Delforge, J.; F. Messenguy y J. M. Wiame (1985). "The regulation of arginine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. The specificity of arg R⁻ mutations and the general control of amino acid biosynthesis" Eur. J. Biochem. 57:231-239

Delgado, M. A. (1981). "Obtención y estudio de mutantes superproductores y excretores de aminoácidos en *Saccharomyces cerevisiae*". Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

Delgado, M.A.; J. Guerrero y J. Conde (1982). "Genetic and Biochemical study of threonine-overproducing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*". Mol. Cell. Biol. 2, 7:731-736

Demain, A.L.; M. Jackson, A.R. Vitali y D. Hendlin (1966). "Production of guanosine-5'-monophosphate and inosine-5'-monophosphate by fermentation". Appl. Microbiol. 14,5:821-825

de Robichon-Szulmajster, H. y D. Corrivaux (1963). "Régulations métaboliques de la biosynthèse de la méthionine et de la thréonine chez *Saccharomyces cerevisiae* I: Répression et rétro-inhibition 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. Karassevitch y D. Corrivaux (1965). "Régulations métaboliques chez *Saccharomyces cerevisiae*. Biosynthèse de la méthionine et de la thréonine". Colloq. Int. Cen. Natl. Rech. Sci. 124:255

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. (1967). "Régulation du fonctionnement de deux chaînes de biosynthèse chez *Saccharomyces cerevisiae*; thréonine-méthionine et isoleucine-valine" *Bull. Soc. Chim. Biol.* 49,11:1431-1462

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. 2:149-163

Duell, E. A.; S. Inove y M. F. Utter (1964). "Isolation and properties of intact mitochondria from spheroplasts of yeast". *J. Bacteriol* 88,6:1762-1773

Fiske, C.H. y Y. SubbaRow (1925). "The colorimetric determination of phosphorous". *J. Biol. Chem.* 66:375-400

Flavin, M. y C. Slaughter (1960). "Purification and properties of threonine synthetase of *Neurospora*". *J. Biol. Chem.* 235: 1103-1108

Flavin, M. (1962). "Threonine synthetase from *Neurospora*". En: "Methods in Enzymology" (Colowick S.P. y N.D. Kaplan, eds.). Academic Press, New York. 5:951-959

Fröhler, J.; A. Rechenmacher, J. Thomale, G. Nass y A. Böck (1980). "Genetic analysis of mutations causing borrelidin resistance by overproduction of threonyl-transfer ribonucleic acid synthetase". *J. Bacteriol.* 143,3:1135-1141

Gaillardin, C. M.; G. Sylvestre y H. Heslot (1975). "Studies on an unstable phenotype induced by UV irradiation. The lysine excreting (*lex*⁻) phenotype of the yeast *Saccharomycopsis lipolytica*". *Arch. Microbiol.* 104: 89-94

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.1:138-146

Gorman, J.A. y A.S.L. Hu (1969). "The separation and partial characterization of L-histidinol phosphatase and alkaline phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*". J. Biol. Chem. 244: 1645-1650

Gray, G. S. y J. K. Battacharjee (1976). "Biosynthesis of lysine in *Saccharomyces cerevisiae*: regulation of homocitrate synthase in analoge-resistant mutants". J. Gen. Microbiol. 97:117-120

Gregory, M.E.; M.H.J. Keenan y A.H. Rose (1982). "Accumulation of L-asparagine by *Saccharomyces cerevisiae* X-2180". J. General Microbiol. 128:2557-2562

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

Grenson, M. (1973). "Specificity and regulation of the uptake and retentions of amino acids and pyrimidines in yeast". En: "Genetics of industrial microorganisms" (Vanek, Z.; Z. Hostálek y J. Cudlín, eds.). Elsevier/North-Holland Publishing Co., Amsterdam. 2:179-183

Grenson, M. (1983). "Study of the positive control of the general amino-acid permease and other Ammonia-sensitive uptake systems by the product of the *NPR1* gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". Eur. J. Biochem. 133:141-144

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

Hawthorne, D.C. y U. Leupold (1974). "Suppressor mutations in yeast". Current Topics in Microbiology and Immunology. 64:1-45

Hinnebusch, A. G. y G. R. Fink (1983). "Repeated DNA sequences upstream from *HIS1* also occur at several other co-regulated genes in *Saccharomyces cerevisiae*". J. Biol. Chem. 258:5238-5247

Hinnebusch, A.G. (1988). "Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*". Microbiol. Rev. 52, 2:248-273

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

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". 2:181-299

Karassevitch, Y. y H. de Robichon-Szulmajster (1963). "Régulation métabolique de la biosynthèse de la méthionine et de la thréonine chez *Saccharomyces cerevisiae*". Biochim. Biophys. Acta 73: 414

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

Kitamoto, K.; K. Yoshizawa, Y. Ohsumi y Y. Anraku (1988a). "Dynamic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae*". J. Bacteriol. 170,6:2683-2686

Kitamoto, K.; K. Yoshizawa, Y. Ohsumi y Y. Anraku (1988b). "Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with defective vacuolar function". J. Bacteriol. 170,6:2687-2691

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. 16,20: 9859

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

Martínez-Force, E. y T. Benítez (1989). "Fermentación/respiración: influencia en la concentración intracelular de aminoácidos de *Saccharomyces*". XII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología. Pamplona.

Martínez-Force, E. y T. Benítez (1990). "Rapid separation of O-phthalaldehyde derivatives of amino acids of the internal pool of yeast by reverse-phase liquid chromatography". Enviado a Anal. Biochem.

Masselot, H. y de H. de Robichon-Szulmajster (1974a). "Methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mutations at the regulatory locus *eth2*. I. Genetic data". Mol. Gen. Genet. 129:339-348

Masselot, H. y de H. de Robichon-Szulmajster (1974b). "Methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mutations at the regulatory locus *eth2*. II. Physiological and Biochemical data". *Mol. Gen. Genet.* 129:349-362

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.* 15,9:3922

Mateos, L.M.; G. del Real, A. Aguilar, J.F. Martín (1987b). "Nucleotide sequence of the homoserine dehydrogenase (*thrA*) gene of *Brevibacterim lactofermentum*". *Nucleic Acids Res.* 15,24: 10598

Messenguy, F.; D. Colin, J.P. ten Have (1980). "Regulation of compartmentation of amino acids pool in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on metabolic control". *Europen J. Biochem.* 108: 439-437

Messenguy, F. (1987). "Multiplicity of regulatory mechanisms controlling amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*". *Microbiol. Sci.* 4,5:150-153

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

Nakamori, S. (1986). "Threonine and homoserine" En: "Biotechnology of amino acid production". (Aida, K.; I. Chibata, K. Nakayama, K. Takinami y H. Yamada, eds.) 24:173-182

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

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

- Paetz, W. y G. Nass (1973). "Biochemical and immunological characterization of threonyl-tRNA-synthetases of two borrelidin resistant mutants of *E. coli* K12". *Europ. J. Biochem.* 35:331-337
- 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
- Parsot, C. y D. Mazel (1987). "Cloning and nucleotide sequence of the *thrB* gene from the cyanobacterium *Calothrix* PCC 7601". *Mol. Microbiol.* 1,1:45-52
- 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
- Plummer, D.T. (1971). "Quantitative examination of proteins and amino acids". En: "An introduction to practical biochemistry" (Plummer, D.T. ed). Mc Graw-Hill, London (U.K.). 153-161
- Poralla, K. (1975). "Borrelidin". En: "Antibiotics" (Corcoran, J.W. y F.E. Hahn, eds.) Springer. Berlin-Heidelberg-New York. 3:365-369
- Rafalski, J.A. y S. C. Falco (1988). "Structure of the yeast *HOM3* gene which encodes aspartokinase". *J. Biol. Chem.* 263, 5:2146-2151
- Rytka, J. (1975). "Positive selection of general amino acid permease mutants in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* 121:562-570
- Sato, T.; Y. Ohsumi y Y. Anraku (1984). "Substrate specificities of active transport systems for amino acids in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Biol. Chem.* 259:11505-11508
- Schildkraut, I. y S. Greer (1973). "Threonine synthetase catalysed conversion of phosphohomoserine to α -ketobutyrate in *Bacillus subtilis*." *J. Bacteriol.* 115: 777-785
- 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

Serrano, S. (1984). "Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump". Current Topics in Cellular Regulation. 23:87-126

Shames, S. L. y F.C. Wedler (1984). "Homoserine kinase of *Escherichia coli*: kinetic mechanism and inhibition by L-aspartate semialdehyde". Arch. Biochem. Biophys. 235,2:359-370

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

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

Sherman, F. (1982). "Suppression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". En: "The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*. Metabolism and gene expression". 2:463-486

Skarstedt, M.T. y S. B. Greer (1973). "Threonine synthetase of *Bacillus subtilis*". J. Biol. Chem. 248,3:1032-1044

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. 235,2:359-370

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

Suomalainen, H.; M. Linko y E. Oura (1960). "Changes in the phosphatase activity of baker's yeast during the growth phase and location of the phosphatases in the yeast cells". *Biochim. Biophys. Acta.* 37:428

Szczesiul, M. y D.E. Wampler (1976). "Regulation of a metabolic system in vitro: synthesis of threonine from aspartic acid". *Biochem.* 15, 10:2236-2244

Thèze, J.; L. Kleidman y I. Saint-Girons (1974). "Homoserine Kinase from *Escherichia coli* K-12: properties, inhibition by L-threonine and regulation biosynthesis". *J. Bacteriol.* 118,2: 577-581

Truffa-Bachi, P. y G.N. Cohen (1966). "La β -aspartokinase sensible a la lysine d'*Escherichia coli*. Purification et propriétés". *Biochim. Biophys. Acta* 113:531-541

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.) 555-715

van Uden, N. (1971). "Kinetics and energetics of yeast growth". En: "The Yeast" (Rose, A.H. y J.J. Harrison, eds.). Academic Press, London. 2: 75-118

Wampler, D. E. y E. W. Westhead (1968). "Two aspartokinases from *Escherichia coli*. Nature of the inhibition and molecular changes accompanying reversible inactivation". *Biochemistry* 7:1661-1671

Watanabe, Y. y K.Shimura (1956). "Biosynthesis of threonine from homoserine V. Nature of an intermediary product". *J. Biochem.* 43, 3: 283-294

Wiemken, A. y M. Dürr (1974). "Characterization of amino acid pools in the vacuolar compartment of *Saccharomyces cerevisiae*". *Arch. Microbiol.* 101:45-57

Wolfner, M.; D. Yep, F. Messenguy y G. R. Fink (1975). "Integration of amino acids biosynthesis into the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Mol. Biol.* 96:273

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

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Doctor Juan Ramos Rodríguez
Regulación de la Biosíntesis de treonina
en Saccharomyces cerevisiae.

APTO CUM LAUDE
POR UNANIMIDAD.

16 mayo 90



500642650

FBI E TD-217

642650