



03062  
3  
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado  
del C.C.H.  
Instituto de Fisiología Celular

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

SINTESIS Y DEGRADACION DE GLUTAMINA: UN MECANISMO DE REGULACION  
COORDINADA DE LA ASIMILACION DE AMONIO Y EL METABOLISMO DE  
CARBONO EN *Saccharomyces cerevisiae*.

TESIS  
Que para obtener el grado de  
MAESTRA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA  
presento

Beatriz Flores Samaniego.

México, D.F. , marzo de 1992.

[992



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

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

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

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

# CONTENIDO

INTRODUCCION .....	1
ASIMILACION DE AMONIO .....	1
CATABOLISMO DE GLUTAMINA .....	2
CATABOLISMO DE CARBONO .....	3
CICLOS FUTILES .....	5
INTERACCION DEL METABOLISMO DE CARBONO Y NITROGENO .....	6
OBJETIVO .....	7
MATERIAL Y METODOS .....	8
MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO .....	8
DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS .....	9
RESULTADOS Y DISCUSION .....	12
CARACTERIZACION FENOTIPICA DE LA MUTANTE CN10 .....	12
A) UTILIZACION DE FUENTES DE NITROGENO .....	13
B) UTILIZACION DE FUENTES DE CARBONO .....	15
C) DETERMINACION DE LA CONCENTRACION INTRACELULAR DE ATP Y ADP .....	19
EFECTO DE LA PRESENCIA DE GLUTAMINA EN CULTIVOS DE UNA CEPA SILVESTRE .....	22
A) EVALUACION DE LA DEGRADACION DE GLUCOSA HASTA CO <sub>2</sub> .....	23
B) DETERMINACION DE LAS POZAS INTRACELULARES DE ATP Y ADP .....	24
C) UTILIZACION DE GLUTAMINA COMO FUENTE DE CARBONO .....	25
PAPEL DE LA SINTESIS Y DEGRADACION DE GLUTAMINA EN LA UTILIZACION DE FUENTES DE CARBONO NO FERMENTABLES .....	27
DISCUSION FINAL Y CONCLUSIONES .....	29
REFERENCIAS .....	32

## INTRODUCCION

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo ascomicelo unicelular cuyo ciclo de vida, en el que se alternan fases haploides, facilita su estudio genético; además de que ha constituido un modelo biológico importante para el estudio de una variedad de fenómenos fisiológicos.

Este microorganismo puede cultivarse fácilmente, ya que es capaz de crecer en medios sintéticos que contengan sales, vitaminas, elementos traza, una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno.

La glucosa constituye una de las principales fuentes de carbono y se oxida durante la glucólisis hasta ácido pirúvico, produciéndose energía y poder reductor. En presencia de oxígeno, el ácido pirúvico se oxida hasta CO<sub>2</sub> y agua. *S. cerevisiae* es un organismo facultativo; es decir, es capaz de crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. En este último caso, el ácido pirúvico se degrada hasta CO<sub>2</sub> y etanol.

Por otra parte, este microorganismo es capaz de utilizar amonio y una gran variedad de moléculas orgánicas nitrogenadas como únicas fuentes de nitrógeno celular. La utilización tanto de nitrógeno orgánico como inorgánico, da como resultado la síntesis de ácido glutámico y glutamina; intermediarios metabólicos que distribuyen su nitrógeno en la síntesis de otros aminoácidos, aminoazúcares, vitaminas, purinas y pirimidinas.

### ASIMILACION DE AMONIO.

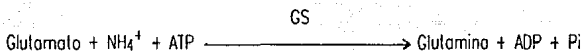
La asimilación de amonio es un proceso mediante el cual, el amonio proveniente del medio de cultivo o del catabolismo de compuestos nitrogenados, es incorporado a esqueletos de carbono. En organismos procariontes como *E. coli* y en eucariontes sencillos como *Neurospora*, *Aspergillus*, *Saccharomyces* y *Candida*, este proceso está mediado por dos enzimas: la deshidrogenasa glutámica dependiente de NADP (GDH-NADP) (1- 5) y la glutamino sintetasa (GS).

La GDH-NADP, cataliza la aminación reductiva del 2-oxoglutarato, dando como producto ácido glutámico:



En levadura, se ha reportado que la actividad de GDH-NADP está regulada por la concentración intracelular de 2-oxoglutarato (6), que a su vez, depende directamente de la fuente de carbono y la vía por la que ésta sea metabolizada.

La GS cataliza la producción de glutamina a partir de ácido glutámico y amonio. En esta reacción se utiliza una molécula de ATP:



El ácido glutámico y la glutamina obtenidos durante la asimilación de amonio, son precursores en la formación de todos los compuestos nitrogenados celulares, a través de donar sus grupos amino y amido, mediante reacciones de transaminación y transamidación, respectivamente.

La utilización de aminoácidos como fuente de nitrógeno, implica su degradación hasta amonio y el correspondiente esqueleto de carbono. En este proceso participan diversas enzimas catabólicas, que están sujetas a un sistema de regulación denominado represión catabólica nitrogenada (7-9). Este mecanismo, previene la expresión de estas enzimas catabólicas en presencia de amonio o de los productos primarios de su asimilación (glutamato y glutamina) (10). En algunos microorganismos, se ha reportado que la glutamina es el efector de la represión catabólica nitrogenada (7,9 y 11). En levadura, esto no se ha demostrado.

En *Neurospora crassa* y *Saccharomyces cerevisiae* se ha encontrado que la actividad de GS es alta cuando el microorganismo se cultiva en ácido glutámico como única fuente de nitrógeno, intermedia cuando se cultiva en amonio y baja cuando se utiliza glutamina como única fuente de nitrógeno (12,13). La actividad enzimática de esta proteína se regula modulando la síntesis de las subunidades y por un proceso de inactivación dependiente de glutamina (14-16). La síntesis de la glutamina sintetasa, por otra parte, se modula por tres sistemas de control independientes que responden a diferentes señales metabólicas (14). Se ha demostrado que los cambios en la expresión de la glutamina sintetasa como respuesta a los tres sistemas regulatorios, se deben a cambios en los niveles de mRNA.

## CATABOLISMO DE GLUTAMINA

En *S. cerevisiae*, el catabolismo de glutamina procede principalmente por acción de la glutaminasa y de la vía de la W-amidasa. (17,19).

Esta levadura posee dos glutaminasas (A y B), que presentan diferente pH óptimo. La

glutaminosa A se recupera en la fracción insoluble de extractos crudos, mientras que la glutaminosa B es citoplásmica y se regula negativamente por ácidos orgánicos como piruvato, glioxalato y 2-oxoglutarato (17). La degradación de glutamina via glutaminasa, resulta en la producción de amonio y ácido glutámico.

La vía de la W-amidasa, constituye una ruta alternativa para el catabolismo de glutamina, donde este aminoácido es transaminado por medio de la glutamino aminotransferasa, obteniéndose diferentes aminoácidos y 2-oxoglutarato; posteriormente, este compuesto se hidroliza por la W-amidasa, obteniéndose 2-oxoglutarato y amonio. Estas dos vías de degradación de glutamina se regulan de manera inversa; esto es, bajo condiciones de microaerofilia en donde se acumula piruvato, la glutaminasa B se inhibe y la glutamina se degrada via W-amidasa (18). En condiciones aeróbicas, la concentración de piruvato disminuye y la glutamina se cataboliza por la glutaminasa B (19,20). En cuanto a la actividad de glutaminasa A, sólo se ha reportado que está unida a membrana y que presenta un pH óptimo de 7.5, a diferencia del pH óptimo de la glutaminasa B, cuyo pH óptimo es de 8.3.

## CATABOLISMO DE CARBONO

**FERMENTACION ALCOHOLICA.** La glucólisis anaerobia, que da etanol y CO<sub>2</sub> como productos finales, es característico de levaduras, aunque algunas plantas inferiores y algunos metazoarios son capaces de llevarla a cabo (21).

La utilización de glucosa por levaduras requiere, como primer paso, su transporte a través de la membrana (22), mismo que ocurre bajo condiciones de equilibrio y no es acumulativo. Una vez que la glucosa ha sido transportada al interior de la célula, se fosforila a glucosa 6-fosfato por acción de una hexocinasa constitutiva (23). El mecanismo de esta reacción fisiológicamente irreversible ha sido ampliamente estudiado; al contrario de hexocinasas de organismos superiores, la enzima de levadura no es sensible a inhibición alostérica por glucosa 6-fosfato (24).

Una glucosa-fosfato isomerasa muy activa, mantiene un equilibrio entre glucosa 6-fosfato y fructosa 6-fosfato. La fosforilación de fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-difosfato, catalizada por una fosfofructocinasa, es virtualmente irreversible *in vivo*, lo que hace a esta enzima particularmente importante en la regulación de la glucólisis. En levadura, esta enzima es fuertemente inhibida por ATP (25) y se ha demostrado que la concentración de fosfofructocinasa puede variar ampliamente dependiendo de la fuente de carbono y energía (26).

La ruptura de fructosa 1,6-difosfato en dihidroxiacetona-fosfato y gliceraldehído 3-fosfato, es catalizada por una aldolasa. La interconversión entre los dos productos finales de la ruptura de fructosa 1,6-difosfato, es catalizada por una triosa-fosfato

isomerasa; esta reacción favorece la formación de gliceraldehído 3-fosfato. El siguiente paso, catalizado por la gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa, da como producto 1,3-difosfoglicerato; posteriormente, una fosfoglicerato cinasa que toma ADP, cataliza la síntesis de 3-fosfoglicerato más ATP. El 3-fosfoglicerato es convertido a 2-fosfoglicerato por acción de la fosfoglicerato mutasa. Este último producto se deshidrata hasta fosfoenolpiruvato por una enolasa.

El rompimiento de fosfoenolpiruvato a piruvato, acoplado a la producción de ATP, es catalizado por la piruvato cinasa. Esta enzima actúa irreversiblemente en condiciones fisiológicas. Se han descrito dos diferentes mecanismos de regulación de esta enzima (27): la concentración de piruvato cinasa varía con la fuente de carbono y su actividad depende de la concentración de fructosa 1,6-difosfato (28). En ciertas levaduras, los dos mecanismos pueden co-existir (29). En *S. cerevisiae*, la piruvato cinasa es dispensable en condiciones gluconeogénicas (30) y necesaria para mantener los pozos de ATP, ADP y AMP cuando este microorganismo es cultivado en limitación de fuente de carbono y energía (30).

El piruvato formado en la reacción precedente, es decarboxilado hasta acetaldehído por la piruvato decarboxilasa. El acetaldehído formado se reduce a etanol en una reacción catalizada por una alcohol dehidrogenasa. Se ha reportado la presencia de dos isoenzimas de alcohol dehidrogenasa en levadura (31,32). Una de ellas es constitutiva y pudiera estar relacionada con la fermentación de glucosa; mientras que la otra, inducida por oxígeno y reprimida por glucosa, pudiera tener el papel de oxidar el etanol cuando la levadura se cultiva en presencia de este compuesto como fuente de carbono. Ambas enzimas dependen de NAD pero difieren en termoestabilidad y especificidad por sustrato. El rendimiento energético de la fermentación alcohólica es aproximadamente de un 25%.

**METABOLISMO AEROBICO.** La vía final para la oxidación de nutrientes en condiciones aeróbicas, es el ciclo de Krebs. Carbohidratos, aminoácidos y derivados de lípidos, se oxidan hasta  $\text{CO}_2$  y agua en este ciclo; el cual, acoplado a la cadena respiratoria, actúa como el principal productor de energía de la célula. Por otra parte, varios de sus intermediarios sirven como precursores de la síntesis de numerosos constituyentes celulares. En levaduras y otros organismos eucariontes, las enzimas que participan en el ciclo de Krebs están localizadas en la mitocondria.

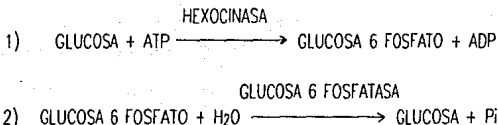
En el ciclo completo, ocurren cuatro dehidrogenaciones y dos decarboxilaciones. Las primeras, son las reacciones clave desde el punto de vista energético del ciclo, mientras que las últimas liberan los residuos de acetato en forma de  $\text{CO}_2$ .

El resultado neto de una vuelta completa del ciclo, es la síntesis de un enlace fosfato rico en energía y la producción de co-enzimas reducidas, tres moléculas de  $\text{NADH}_2$  y un enlace proteico  $\text{FADH}_2$ . Posteriormente, la transferencia de electrones a oxígeno molecular, a través de la cadena respiratoria, se acopla a la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato.

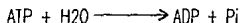
Este proceso se conoce como fosforilación oxidativa y su mecanismo está ampliamente estudiado. En levaduras del género *Saccharomyces* existen sólo dos sitios de fosforilación, con la consecuente síntesis de sólo dos moléculas de ATP por cada molécula de  $\text{NADH}_2$  oxidado (33,34).

## CICLOS FÚTILES

Durante la vía glucolítica, se presentan dos casos en que, reacciones reversibles, funcionando simultáneamente en ambos sentidos, conducirían a la hidrólisis de una molécula de ATP. Este tipo de vías, se han denominado ciclos fútiles. Ejemplo de ello es la reacción catalizada por la hexocinasa y su contraparte, catalizada por la glucosa 6 fosfatasa:



La suma de ambas reacciones, en caso de funcionar simultáneamente, sería:



El otro caso en que ocurre este tipo de reacción, son las reacciones catalizadas por la fosfofructocinasa, en un sentido, para dar una molécula de fructosa 1,6 difosfato fosforilando a la fructosa 6 fosfato, mediante el gasto de una molécula de ATP y su contraparte, catalizada por la fructosa 1,6 difosfatasa, que produce fructosa 6 fosfato y fosfato a partir de fructosa 1,6 difosfato. En este caso, también el resultado neto, si proceden simultáneamente ambas reacciones, es la hidrólisis de una molécula de ATP.

Otros ciclos fútiles que operan en organismos superiores involucran productos como adenosina y AMP (48), triglicéridos y ácidos grasos (49) y glutamato y glutamina (50).

Tradicionalmente, se pensó que los ciclos fútiles no ocurrían en células intactas, considerándose que bajo cualquier circunstancia metabólica, una de las reacciones procedería a muy baja velocidad y la contraria a alta velocidad. Sin embargo, estudios hechos con células de hígado de mamíferos, mostraron que la glucólisis y la gluconeogénesis pueden funcionar simultáneamente, a veces a velocidades muy parecidas; evidenciando que, bajo ciertas condiciones metabólicas, los ciclos fútiles pueden funcionar en células normales. Actualmente, existe controversia acerca de la función de los ciclos fútiles. Una corriente de pensamiento, considera que los ciclos fútiles participan en la



regulación de vías metabólicas opuestas, suplementando el control alostérico mediante la hidrólisis de excesos de ATP. (51, 52). Otro idea, es que los ciclos fútiles pudieran constituir un mecanismo para producir color. (53).

En cuanto a microorganismos, se ha demostrado en *E. coli*, la existencia de un ciclo que involucra la reconversión de fructosa 6 fosfato a fructosa 1,6 difosfato, durante el crecimiento de células cultivadas bajo condiciones gluconeogénicas (54). Sin embargo, no existen otros estudios que asocien ciclos fútiles durante el metabolismo de glucosa en células de microorganismos en cultivo. En *N. crassa*, se ha descrito el ciclo de la glutamina (34), proponiéndose que funciona como un mecanismo de disipación de energía. En este ciclo, se encuentran involucrados el amonio y los productos de su asimilación, glutámico y glutamina. La única otra evidencia de ciclaje del nitrógeno en microorganismos, son experimentos que muestran que amonio marcado sufre un recambio, en cultivos de *B. megaterium* y *E. coli* (55).

## INTERACCION DEL METABOLISMO DE CARBONO Y NITROGENO.

El metabolismo de carbono interactúa con el de nitrógeno en primera instancia, durante el proceso de asimilación de amonio descrito; ya que, para la biosíntesis de glutamato y glutamina, se requieren esqueletos de carbono, energía y poder reductor. Por otra parte, la distribución del nitrógeno, a través de los donadores glutamato y glutamina, implica un recambio de esqueletos de carbono.

La interconversión entre amonio, glutamato y glutamina, constituye la línea divisoria entre la biosíntesis y degradación de compuestos nitrogenados, generándose un ciclo de síntesis y degradación de glutamina.

En este estudio, tratamos de demostrar que, dadas las condiciones de operación de este ciclo, es decir:

- 1) el gasto de ATP durante la síntesis de glutamina a partir de amonio y glutamato,
- 2) el gasto de poder reductor durante la síntesis de glutamato a partir de 2-oxoglutarato y amonio y
- 3) el recambio de esqueletos de carbono durante el proceso de asimilación de amonio; su funcionamiento resulta determinante para una eficiente utilización del carbono, convirtiéndose en un punto clave de la regulación coordinada del metabolismo de carbono y la asimilación y distribución del amonio.

## OBJETIVO

Cuando una levadura se cultiva en aerobiosis, el ciclo de ácidos tricarboxílicos constituye la etapa final de la oxidación de esqueletos de carbono. Este ciclo, cumple el papel dual de proporcionar energía e intermediarios metabólicos. El 2-oxoglutarato es uno de los intermediarios más importantes que se producen durante la operación de este ciclo. Como se mencionó en la introducción, la deshidrogenasa glutámica dependiente de NADP, cataliza la síntesis de ácido glutámico a partir de amonio y 2-oxoglutarato. Por lo tanto, la asimilación de amonio constituye el proceso metabólico en donde convergen el metabolismo de nitrógeno y el de carbono.

El objetivo de este trabajo, ha sido determinar el papel de la glutamino sintetasa, enzima que también es capaz de asimilar amonio, como modulador del metabolismo de carbono en *Saccharomyces cerevisiae*.

## MATERIAL Y METODOS

CEPAS: Se utilizaron las siguientes cepas:

CEPA	GENOTIPOS	REFERENCIA
S288C	Silvestre, MAT $\alpha$ mal1 gal2	Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.
CN10	Glutaminasa B <sup>-</sup> derivado de la S288C	M. Soberón, et.al. (17)
CN1	MAT $\alpha$ inol-13 ino2-8 gal2 can2 qln	A. González, et.al. (40)
CN6	lys2 GLN <sup>+</sup> LEU2 <sup>+</sup>	A. González, et.al. (40)
CN20	Transaminasa de glutamina <sup>-</sup> . Derivada de la S288C.	M. Soberón, et.al. (18)
AH22	MAT $\alpha$ leu2-3 leu2-112, his 3, can1,	Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.
D286-A	MAT $\alpha$ ode 1, his 1	Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.
MC3	MAT $\alpha$ inol-13, ino 2-8 gal2 can1	Culbertson, et.al. (41)

## MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

**MEDIO RICO (YPD):** Se preparó con Extracto de Levadura al 1%, Peptona de Caseína al 2% y Dextrosa al 2%. Este medio se utilizó para el crecimiento de precultivos.

**MEDIO MINIMO (MM):** Se preparó con sales, vitaminas y elementos traza; según la fórmula de Difco Yeast Base. Se utilizó Dextrosa al 2% como fuente de Carbono y Sulfato de Amonio 40mM como fuente de Nitrógeno.

**MEDIO SIN NITROGENO (SN):** Se preparó igual que el Medio Mínimo pero sin Sulfato de Amonio; suplementándose la fuente de nitrógeno con el Aminoácido indicado a una concentración de 1 mg/ml.

CONDICIONES DE CRECIMIENTO: Las células se cultivaron a 30°C y 250 rpm. El crecimiento se determinó midiendo la densidad óptica a 600nm.

## DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE PIRUVATO CINASA: Las células se colectaron pasando el cultivo por filtros millipore tipo RA 1.2µm. La pastilla se resuspendió en un amortiguador de extracción que contiene:

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM  
EDTA 2mM  
β-mercaptoetanol 2mM

a un pH de 7.4. Posteriormente se rompieron por agitación con perlas de vidrio, con cinco pulsos de un minuto cada uno en un Vortex. La suspensión se centrifugó a 15,000 rpm durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. El extracto se mantuvo todo el tiempo a 4°C. Para medir la actividad enzimática se preparó la siguiente mezcla de reacción:

MOPS 1M pH=6.5	100ul
MgCl <sub>2</sub> 1M	24ul
KCl 1M	100ul
Fructosa 1,6 difosfato	10ul
NADH (10 mg/ml)	12ul
LDH	16ul
ADP 100mM	100ul

Se puso la mezcla de reacción en una celda de cuarzo y se añadió el extracto más agua bidestilada hasta aforar a 900ul. Se inició la reacción con 100ul de PEP (0.02 gr/ml), siguiendo la absorbancia a 340nm en un espectrofotómetro.

Paralelamente, se corrió un control sin ADP y un blanco sin extracto, ya que la preparación comercial de LDH tiene una pequeña contaminación por Piruvato Cinasa.

DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE GDH-NAD: Se preparó un extracto de igual manera que para actividad de piruvato cinasa, cuyo amortiguador de extracción contiene:

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1M  
EDTA 1mM  
β-mercaptoetanol 2mM

a un pH de 7.0. La mezcla de reacción para ensayo de actividad contiene:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M pH=7.0	1ml
2-oxoglutarato 0.1M	300ul
NADH 3mM	120ul
NH <sub>4</sub> Cl 1M	500ul
Agua bidestilada	8ml

Se puso 1ml de mezcla de reacción en una celda de cuarzo y se inició la reacción con el extracto, midiendo la absorbancia a 340nm en un espectrofotómetro. Paralelamente, se corrió un control sin 2-oxoglutarato y uno sin cloruro de amonio.

**DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE GLUTAMINO SINTETASA:** Se preparó un extracto igual a los anteriores cuyo amortiguador de extracción contiene:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5mM
EDTA 5mM
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50mM

a un pH= 7.2. Se determinó la actividad siguiendo el método de transferasa de Ferguson y Sims (1974). (42).

**DETERMINACION DE POZAS DE AMINOACIDOS:** Se llevó a cabo de acuerdo al método descrito (43). En todos los casos, se llevaron a cabo tres determinaciones y se presenta un promedio.

**DETERMINACION DE GLUCOSA INTRACELULAR:** Se colectaron las células por filtración y la pastilla se resuspendió en 2 ml de agua desionizada. Se hirvió la suspensión durante 10 minutos y posteriormente se rompieron las células por agitación en un Vortex, con perlas de vidrio, durante 4 minutos. Se centrifugó la preparación a 15,000 rpm durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante.

La poza de glucosa se determinó con el reactivo Kit 510 de Sigma, para determinación de glucosa en sangre. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado y se presenta un promedio.

**DETERMINACION DE POZA INTRACELULAR DE ATP:** Se llevó a cabo de acuerdo al método de Lamprecht y Trautshold (1965). (44). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado y se presenta un promedio.

DETERMINACION DE POZA INTRACELULAR DE ADP: Se llevó a cabo de acuerdo al método de Adam (1965). (45). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado y se presenta un promedio.

MEDICION DE EVOLUCION DE  $^{14}\text{CO}_2$ : Se incubaron 10 ml de cultivo en presencia del metabolito radioactivo y con un suministro de aire por burbujeo, filtrado a través de una trampa de NaOH 2.5N. El aire que salió del cultivo, se desplazó por medio de trampas y el  $\text{CO}_2$  se atrapó en tres matraces conectados en serie, que contenían NaOH 2.5N. Una vez carbonatada la sosa, se precipitaron los carbonatos con concentraciones equivalentes de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y  $\text{BaCl}_2$ . Se recuperó el carbonato de bario formado por filtración y se contó en un contador de centelleo a fin de determinar la cantidad de radioactividad incorporada como  $\text{CO}_2$  y precipitada como carbonato.

DETERMINACION DE PROTEINA: La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (46). Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

TRANSFORMACION GENETICA: Lo mutante CN1 se transformó de acuerdo al método de Hinnen et. al. (1978). (47).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Caracterización fenotípica de la mutante CN10

A partir de la cepa silvestre S288C, se seleccionaron mutantes incapaces de crecer en presencia de glutamina como única fuente de nitrógeno y se aisló la mutante CN10 (17). El análisis bioquímico de esta mutante, reveló que presentaba una disminución en la actividad de Glutaminasa B (17).

Con el fin de analizar si el fenotipo de la mutante CN10 se debía a la presencia de una sola mutación, se intentó hacer un estudio de segregación. Para esto, se cruzó a la cepa CN10 con los auxótrofos AH22 y D286-A (ver material y métodos). Con ambas cepas se obtuvieron diploides capaces de crecer en glutamina como única fuente de nitrógeno, lo que indica que la mutación de la cepa CN10 es recesiva; sin embargo, los diploides formaron esporas aberrantes, esto es, ascas con sólo dos o tres productos. En los esporádicos casos en que la esporulación llevó a la obtención de cuatro productos, las esporas formadas fueron incapaces de germinar, por lo que no fué posible llevar a cabo un análisis de segregación. Esta incapacidad para esporular que presenta el diploide se debe, muy probablemente, a la concentración intracelular elevada de glutamina que presenta uno de los parentales. Evidencia de esto, son los experimentos realizados con una mutante afectada en la actividad de transaminasa de glutamina: esta cepa (CN20), aislada en nuestro grupo (18), es incapaz de degradar glutamina vía transaminasa y, en consecuencia, presenta pozos intracelulares de glutamina de tres y cuatro veces mayores a los que presenta la cepa silvestre. La mutante CN20, al igual que la mutante CN10, produce esporas aberrantes y no viables cuando se cruza con el auxótrofo AH22, aún cuando el diploide es capaz de crecer en presencia de glutamina como única fuente de nitrógeno (18).

Estos resultados sugieren que la sola presencia de glutamina intracelular acumulada impide la esporulación. Es decir, aún cuando los diploides CN10/AH22 y CN20/AH22 son capaces de crecer en glutamina como única fuente de nitrógeno (sugiriendo que tanto la mutación en la glutaminasa B como la mutación en transaminasa de glutamina son recesivas), la incapacidad de esporular indica que la presencia de un alelo silvestre, sea de glutaminasa B o de transaminasa de glutamina, no es suficiente para mantener una poza de glutamina intracelular de tipo silvestre. Esto indica que, si bien los diploides pueden crecer en presencia de glutamina como única fuente de nitrógeno, sugiriendo que

se trata de mutaciones recesivas, el hecho de que no puedan esporular eficientemente indica que pudiera tratarse de mutaciones semidominantes. Dado que el fenotipo que presenta la cepa CN10 es pleiotrópico, sería necesario hacer estudios con el diploide, para determinar qué aspectos del fenotipo se enmascaran en el diploide, dada la presencia de un alelo silvestre de glutaminasa.

Considerando que *B. cereus* constituye un excelente sistema para llevar a cabo análisis genético y dado que nuestra mutante no puede ser utilizada para estos fines, podría pensarse que una cepa como la mutante CN10 resulta de poca utilidad. Sin embargo, es importante considerar que, hasta ahora, no se han aislado en ningún microorganismo mutantes incapaces de degradar glutamina vía glutaminasa, por lo que el estudio del fenotipo que confiere esta mutación resulta interesante, aún cuando no es posible hacer un análisis genético de la misma.

Por otra parte, como se mencionó en la introducción, hemos demostrado que existen dos vías alternativas de degradación de glutamina, dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno (19). Así, cuando se cultiva a la mutante CN10 en condiciones de microaerofilia y en presencia de glutamina como única fuente de nitrógeno, esta cepa es capaz de degradar el aminoácido, dado que no presenta alteración en la vía de degradación utilizada en esta condición (transaminasa de glutamina), donde esta cepa presenta un fenotipo silvestre.

### A) Utilización de fuentes de nitrógeno

Como se mencionó anteriormente, se aisló la mutante CN10, seleccionándose por su incapacidad de crecer cuando se cultiva en glutamina como única fuente de nitrógeno. Esta mutante tampoco crece cuando el medio de cultivo contiene simultáneamente glutamina y amonio como fuentes de nitrógeno (Fig. 1A y B); esto sugiere, que la presencia e imposibilidad de degradar glutamina impide a la célula la utilización del amonio. Cuando se cultiva a esta mutante en amonio como única fuente de nitrógeno, presenta una fase lag de doce horas, después de la cual, crece con un tiempo de duplicación dos y media veces mayor al de la cepa silvestre cultivada en esta condición (Fig. 1C). Así, esta mutante, además de ser incapaz de utilizar glutamina, aparentemente presenta problemas en la utilización de amonio.

Por otra parte, debido a que esta cepa no degrada glutamina, este aminoácido se acumula intracelularmente (tabla 1); de modo que es posible observar una relación inversa entre la poza intracelular de glutamina y la capacidad de crecer, ya que en presencia de amonio como única fuente de nitrógeno, es la condición donde la cepa CN10 acumula menor cantidad de glutamina y mejor crece (fig. 1A, B y C) (tabla 1).



TABLA 1.- Pozas de glutamina intracelular y tiempo de duplicación de las cepas S288C y CN10.

Fuente de Nitrógeno	Glutamina <sup>a</sup>		Tiempo de duplicación <sup>b</sup>	
	S288C	CN10	S288C	CN10
NH <sub>4</sub>	0.07	0.32	3.0	7.0
Gln	N.D.	0.95	3.0	N.D.
Gln+NH <sub>4</sub>	0.18	0.88	5.0	N.D.

Ambas cepas se cultivaron en glucosa como fuente de carbono hasta una densidad óptica de 0.5 medida a 600nm. En las condiciones en que el mutante CN10 no crece, se incubó a esta cepa durante 18 horas.

<sup>a</sup>umol/mg de proteína.

<sup>b</sup>Horas

N.D. No detectable

Gln: glutamina

Por otra parte, cuando una cepa silvestre se cultiva en glutamina como única fuente de nitrógeno, la degradación de este aminoácido via glutaminasa, resulta en la producción de glutamato y amonio. Parte de este amonio, puede ser reasimilado por la GDH dependiente de NADP, obteniéndose glutamato. Al cultivar en glutamina como única fuente de nitrógeno a una mutante carente de actividad de glutaminasa, la obtención de glutamato por las vías arriba descritas es inoperante y, por lo tanto, esta mutante solamente podrá obtener glutamato a través del funcionamiento de la glutamato sintasa (GOGAT), enzima que cataliza la producción de dos moléculas de glutamato a partir de una molécula de 2-oxoglutarato y una molécula de glutamina:



Con el fin de evaluar el funcionamiento de esta vía y poder determinar si el fenotipo de crecimiento de la mutante CN10 se debía a un requerimiento por ácido glutámico, se midieron las pozas intracelulares de este aminoácido en extractos obtenidos de las cepas S288C y CN10 cultivadas en las diferentes condiciones.

En la tabla 2 se muestra que, en glutamina y en glutamina más amonio como fuentes de nitrógeno, la cepa CN10 presentó pozas intracelulares de glutamato quince y tres veces mayores, respectivamente, en relación a las encontradas en la cepa silvestre cultivada en las mismas condiciones. Estos datos sugieren que la cepa CN10, aún cuando no degrada glutamina via glutaminasa B, no está afectada en la producción de glutamato y proporciona los niveles suficientes como para no presentar auxotrofia por éste aminoácido.

TABLA 2.- Pozos de glutamato intracelular de las cepas S288C y CN10.

FUENTE DE NITROGENO	GLUTAMATO <sup>a</sup>	
	S288C	CN10
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.45	0.29
Gln <sup>b</sup>	0.06	0.90
Gln+NH <sub>4</sub> <sup>+b</sup>	0.27	0.77

Ambas cepas fueron cultivadas en glucosa como fuente de carbono hasta una densidad óptica de 0.5 medida a 600nm. En las condiciones donde la mutante CN10 no crece<sup>c</sup>, se incubó esta cepa durante 18 horas.

<sup>a</sup> Expresadas en  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína.

Por otro lado, resulta interesante notar que cuando estas cepas se cultivan en amonio como única fuente de nitrógeno, la mutante CN10 presenta una poza de glutamato menor a la de la cepa silvestre (Tabla 2). Este dato, podría indicar que la diferencia en tiempo de duplicación de la cepa CN10 cultivada en amonio, se pudiera deber a un requerimiento por ácido glutámico; sin embargo, este parece no ser el caso, ya que estas diferencias en crecimiento no se modifican si la cepa CN10 se cultiva en amonio más glutamato como fuentes de nitrógeno (datos no mostrados). El fenotipo arriba descrito, no se explica en términos de una deficiencia en la asimilación de amonio, ya que los donadores de éste (glutámico y glutamina), se encuentran presentes, o no modifican el crecimiento, al ser adicionados.

Los datos hasta ahora presentados, muestran que la mutante CN10, afectada en la actividad de glutaminasa B, es incapaz de crecer en medios adicionados con glutamina como única fuente de nitrógeno y que, en presencia de amonio como único fuente de nitrógeno, presenta una fase lag de doce horas, después de la cual crece con un tiempo de duplicación dos y media veces mayor al de la cepa silvestre cultivada en esta condición. Así mismo, nuestros datos indican que este fenotipo no es atribuible a un requerimiento por glutamato, presentándose así una paradoja: es decir, la cepa CN10 es incapaz de crecer a pesar de tener pozos intracelulares elevados de glutamato y glutamina, indicando que el fenotipo de crecimiento no se debe a una falta de nitrógeno.

Ante esto, decidimos evaluar el fenotipo de la mutante CN10 en cuanto a la utilización de la fuente de carbono.

## B) UTILIZACION DE FUENTES DE CARBONO.

Con el fin de evaluar la utilización de glucosa en la mutante CN10, se determinaron los pozos intracelulares de este metabolito de la cepa CN10 y la cepa silvestre cultivadas en los diferentes fuentes de nitrógeno. Como se observa en la tabla 3, la mutante CN10

acumula pozos intracelulares de glucosa que son veinticuatro veces mayores que las encontrados en la cepa silvestre, cuando ambas cepas se cultivan en glutamina como única fuente de nitrógeno. Cuando estas cepas se cultivan en amonio más glutamina como fuentes de nitrógeno, la mutante acumula pozos de glucosa intracelular que son seis y media veces mayores que las de la cepa silvestre. En amonio como única fuente de nitrógeno, estas cepas presentan una poza de glucosa intracelular similar.

TABLA 3.- Poza de glucosa intracelular<sup>a</sup>, poza de glutamina intracelular<sup>b</sup> y tiempo de duplicación<sup>c</sup> de las cepas S288C y CN10.

FUENTE DE NITROGENO	TIEMPO DE DUPLICACION		GLUCOSA		GLUTAMINA	
	S288C	CN10	S288C	CN10	S288C	CN10
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	3.0	7.0	2.91	4.52	0.07	0.32
Gln	3.0	N.D.	1.8	43.24	N.D.	0.95
Gln + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	5.0	N.D.	3.73	24.71	0.18	0.88

Ambas cepas fueron cultivadas en glucosa como fuente de carbono hasta una D.O. de 0.5 medida a 600nm. En aquellas condiciones en que la mutante CN10 no crece, se incubó a esto cepa durante 18 horas.

<sup>a</sup> ug de glucosa/mg de proteína.

<sup>b</sup> umol/mg de proteína.

<sup>c</sup> horas.

N.D.: no detectable.

En amonio como única fuente de nitrógeno, no se observó ninguna diferencia, debido a que en esta condición la mutante CN10 es capaz de crecer y las muestras para determinar la concentración de glucosa intracelular, se tomaron cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.5, es decir, una vez superada la fase lag (fig. 1C). En cambio, cuando cultivamos a la cepa CN10 durante 18 horas en presencia de amonio como único fuente de nitrógeno, es decir hasta una densidad óptica de 0.16 (determinada a 600nm), que es en donde empieza realmente el crecimiento, presentó una poza de glucosa intracelular de 37.10 ug/mg de proteína; es decir, la cepa CN10 acumula glucosa intracelularmente cuando no es capaz de crecer y disminuye esta poza al estar en condiciones de hacerlo.

Aquí se plantea una paradoja: ¿La cepa CN10 acumula glucosa dado que no está creciendo, o no crece porque no degrada eficientemente la glucosa y, por tanto, acumula este metabolito?. Con el fin de discernir esto último, se determinó la poza de glucosa intracelular de la cepa MC3, que presenta una auxotrofia por inositol, en ausencia de este requerimiento, de modo que, en esta condición, la cepa no es capaz de crecer. Se incubó la cepa MC3 en ausencia de inositol durante 18 horas y se encontró que presentaba una poza de glucosa intracelular de 7.715 ug/mg de proteína, mientras que al cultivarla en

presencia de inositol hasta una densidad óptica de 0.5, esta cepa presentó un contenido intracelular de glucosa de 2.44  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína. Estos resultados nos permiten afirmar que la acumulación de glucosa intracelular que presenta la cepa CN10 se debe a su imposibilidad para degradarla y no es consecuencia de no estar creciendo.

Con el fin de analizar si el fenotipo de no crecimiento de la mutante CN10 se debía a una deficiencia de esqueletos de carbono, dada la pobre utilización de glucosa que presenta esta cepa, decidimos suplementar el medio de cultivo con fuentes de carbono cuya utilización no dependiera del funcionamiento de la vía glucolítica. Se probaron diferentes sustratos y se encontró que la cepa mutante CN10 fué capaz de crecer al ser cultivada en medios conteniendo amonio + glutamino como fuentes de nitrógeno y glucosa + succinato como fuentes de carbono (fig. 2A). Este resultado indica que, efectivamente, la mutante CN10 es incapaz de catabolizar adecuadamente la glucosa, reestableciéndose así la deficiencia de esqueletos de carbono al añadir succinato al medio de cultivo. Las fuentes alternativas de carbono que se probaron fueron lactato, piruvato y succinato, encontrándose que la cepa silvestre S288C no es capaz de crecer cuando se cultiva en estos metabolitos como única fuente de carbono (datos no mostrados). Sin embargo, pese a que estos sustratos resultan insuficientes al adicionarse como única fuente de carbono en cultivos de una cepa silvestre, encontramos que el succinato es capaz de complementar, combinado con glucosa, la deficiencia de esqueletos de carbono presentada por la mutante CN10.

La figura 2B, muestra también que la cepa CN10 es incapaz de crecer en medios adicionados de glucosa + succinato + glutamino, es decir, en ausencia de amonio. Esto indica que, aún en presencia de una fuente de carbono utilizable (succinato), la mutante requiere amonio para crecer.

Existen solamente dos enzimas capaces de utilizar amonio: la deshidrogenasa glutámica (NADP) y la glutamino sintetasa. Los productos de las reacciones catalizadas por estas dos enzimas son glutamato y glutamino respectivamente. Un análisis del contenido de aminoácidos de la cepa CN10, mostró que cuando esta cepa se cultiva en glutamino + glucosa + succinico, tiene una poza elevado de glutámico y glutamino (datos no mostrados), por lo que resulta paradójico el hecho de que en esta condición se requiera amonio para que la mutante pueda crecer, puesto que los productos de la asimilación de amonio se encuentran presentes.

En *Neurospora crassa* se ha descrito el ciclo de la glutamino (34). Los autores proponen que la síntesis y degradación de este aminoácido, genera un ciclo mediante el cual se disipa energía vía glutamino sintetasa, dado que este enzima utiliza ATP. Considerando estos resultados, es factible pensar que la cepa CN10, al contener una poza elevada de glutamino, reprimo su actividad de glutamino sintetasa. Además, la actividad residual de GS no podría funcionar, ya que la mutante CN10 no es capaz de obtener amonio a partir

de glutamina. Esto podría resultar en un efecto tóxico al no consumirse el ATP que normalmente se consume por acción de la glutamino sintetasa. Así, cuando se añade amonio al medio de cultivo, la actividad residual de GS logra liberar el efecto al consumirse ATP. Una predicción que se desprende de esto, sería que la cepa CN10 debería recuperar el crecimiento en glucosa + succinato + glutamina, siempre y cuando tuviera una manera de disminuir su pozo de ATP.

Dado lo anterior, decidimos cultivar a la cepa CN10 en presencia de un desacoplante, con el fin de depletar drásticamente la pozo de ATP. En la figura 3A se puede observar que, cuando se cultiva a la cepa CN10 en un medio conteniendo glucosa + succinato + glutamina + FCCP (desacoplante), ésta recupera el crecimiento. El desacoplante se adicionó a una concentración tal que, como se observa en la figura 3B, no tiene efecto alguno en el crecimiento de una cepa silvestre al cultivarlo en las mismas condiciones. Estos datos sugieren que en nuestra mutante, la acumulación de glutamina puede resultar en una acumulación de ATP tal, que podría detener la glucólisis; al adicionarse el desacoplante, la concentración de ATP bajaría, la glucólisis se liberaría y la cepa puede entonces crecer. Por otro lado, cuando se adiciona amonio, se obliga el funcionamiento de la actividad residual de glutamino sintetasa y se consume ATP, lográndose un efecto similar al obtenido con FCCP.

Considerando lo anterior, es de esperarse que una vez liberada la glucólisis, la mutante no presentara un requerimiento por succinato; sin embargo, este no es el caso: la mutante CN10 no es capaz de crecer al cultivarse en glucosa + glutamina + FCCP (fig. 4). Este resultado indica que, aún cuando la presencia del desacoplante disminuiría la pozo de ATP a niveles en los cuales ya no resultaría en un efecto inhibitorio sobre la degradación de glucosa, la pozo intracelular de glutamina, que sigue siendo elevada, pudiera afectar de algún modo el metabolismo de la célula; de manera que, en ninguna condición en que se cultive a esta mutante, será capaz de recuperar un crecimiento tipo silvestre, puesto que siempre tendrá una pozo elevado de glutamina intracelular debido a que no puede degradarla.

Más adelante, se presentarán datos que demuestran que, en una cepa silvestre, la adición de glutamina al medio de cultivo resulta en una disminución del flujo glucolítico. También se presentarán datos que permiten proponer que la posible falta de carbono en esta condición, se ve compensado por una entrada del esqueleto de carbono de la glutamina al ciclo de Krebs, en forma de 2-oxoglutarato. En nuestro modelo, proponemos que la glutamina se degradaría hasta glutamato vía glutaminasa, para después dar 2-oxoglutarato. Dado que nuestra mutante tiene una elevada pozo de glutamina intracelular en cualquier condición en que sea cultivada, esto constituiría una señal metabólica tal, que sería obligatoria la entrada de glutamina al ciclo de Krebs vía glutaminasa, actividad enzimática de la que carece la mutante CN10. Esto último, explicaría el requerimiento por succinato que presenta la cepa CN10, aún cuando la presencia del desacoplante liberaría

el efecto negativo sobre la degradación de glucosa. Es importante enfatizar que, en el experimento mostrado en la figura 3A y B, estamos adicionando al medio de cultivo una sustancia tóxica, dada su actividad desacoplante y, si bien en la cepa silvestre no tiene efecto alguno debido a la baja concentración que utilizamos (4 $\mu$ M), resulta muy sorprendente que, un sistema que no está siendo capaz de crecer, recupere el crecimiento al cultivarse en condiciones desacopladas.

Considerando los resultados anteriores, se midió la poza intracelular de ATP de la cepa mutante CN10 y de la cepa silvestre.

### C) DETERMINACION DE LA CONCENTRACION INTRACELULAR DE ATP Y ADP.

Se midió el contenido intracelular de ATP y ADP de la mutante CN10 y la cepa silvestre, asimismo, se determinó el cociente ATP/ADP, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 4.- Pozas intracelulares de ATP y ADP de las cepas S288C y CN10.

FUENTE DE NITROGENO	ATP <sup>a</sup>		ADP <sup>a</sup>		ATP/ADP	
	S288C	CN10	S288C	CN10	S288C	CN10
AMONIO	20.67	31.30	15.63	7.16	1.32	4.37
GLUTAMINA	42.31	53.46	12.76	7.53	3.32	7.10

Ambas cepas fueron cultivadas en glucosa como fuente de carbono hasta una D.O. de 0.75 medida a 600nm. La mutante CN10 se incubó durante 18 horas en glutamina, donde no es capaz de crecer.

<sup>a</sup> Expresado en nmol/mg de proteína.

Como se puede observar en la tabla 4, la cepa mutante CN10 presenta un mayor contenido de ATP al cultivarse en amonio como única fuente de nitrógeno, respecto de la cepa silvestre cultivada en la misma condición. Este resultado, promedio de tres experimentos, muestra que la cepa mutante CN10 presenta una cantidad de ATP intracelular que excede en un 50% el contenido intracelular de la cepa silvestre cultivada en la misma condición, mientras que cuando el medio de cultivo contiene glutamina como única fuente de nitrógeno, el contenido intracelular de ATP de la mutante excede solamente en un 26% el contenido intracelular de ATP de la cepa silvestre cultivada en esta condición.

Existe un sistema de control que regula a la fosfofructocinasa, enzima de la vía glucolítica que cataliza la fosforilación de fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-difosfato. Este sistema, responde a nucleótidos de adenina y representa una manera en que el metabolismo responde a la carga energética. Cuando la carga energética es alta, la abundancia relativa de ATP constituye una señal que indica que la vía glucolítica debe disminuir en actividad (35). Esta señal, involucra una inhibición de la actividad de fosfofructocinasa. De manera similar, la piruvato cinasa, enzima que cataliza la producción de piruvato a partir de fosfoenol-piruvato, responde a este tipo de regulación; donde la

actividad enzimática de esta proteína se ve inhibido por una abundancia relativa de ATP. El término "abundancia relativa de ATP" se refiere, concretamente, a la concentración de ATP respecto de la concentración de ADP; es decir, el cociente ATP/ADP, representa el estado energético de la célula, de modo que si este cociente es alto (mayor que uno), la carga energética es alta y existe una abundancia relativa de ATP. Así, cuando la carga energética es alta, se inhibe la vía glucolítica y se estimula la gluconeogénesis; mientras que, cuando la carga energética es baja, la glucólisis se estimula.

Considerando este concepto, decidimos medir la pozo intracelular de ADP de la mutante CN10 y de la cepa silvestre, con el fin de determinar el estado energético de la célula y evaluar si la deficiente utilización de glucosa que presentó la mutante CN10 se debía a que se encuentra en un estado de carga energética alta, definido como se mencionó.

En la misma tabla 4, se muestran los contenidos intracelulares de ADP de ambas cepas cultivadas en las diferentes fuentes de nitrógeno, además de la relación ATP/ADP.

Los resultados presentados en la tabla 4 muestran que, cuando se cultiva a la cepa mutante CN10 ya sea en amonio que en glutamina como única fuente de nitrógeno, ésta presenta una abundancia relativa de ATP respecto de la cepa silvestre cultivada en las mismas condiciones. En la misma tabla, es posible observar que la cepa silvestre presenta mayor carga energética al ser cultivada en glutamina como fuente de nitrógeno, respecto de la carga energética que presenta al ser cultivada en amonio como fuente de nitrógeno. Este resultado se discutirá más adelante.

Considerando los resultados anteriores, se midió la actividad de piruvato cinasa de las cepas CN10 y S288C, encontrándose que esta actividad enzimática se encuentra disminuido en extractos obtenidos de la cepa CN10 (tabla 5).

Tabla 5.- Actividad específica de piruvato cinasa de las cepas CN10 y S288C.

FUENTE DE NITROGENO	ACTIVIDAD ESPECIFICA <sup>a</sup>	
	S288C	CN10
AMONIO	8.40	5.64
GLUTAMINA <sup>b</sup>	7.08	2.98
GLUTAMINA + AMONIO <sup>b</sup>	7.86	4.79

Ambas cepas fueron cultivadas en glucosa como fuente de carbono hasta una D.O. de 0.5 medida a 600nm. En las condiciones en que la mutante CN10 no crece<sup>c</sup>, se incubó esta cepa durante 18 horas.

<sup>a</sup> Expresado en nmol de piruvato formado/min/mg de proteína.

Este resultado (tabla 5), podría sugerir que la deficiente utilización de glucosa que presenta la mutante CN10, se debiera a una disminución en la actividad de piruvato cinasa. Es importante aclarar que, si bien es cierto que la baja actividad de piruvato cinasa correlaciona con una alta carga energética, esta disminución sin embargo, no debería observarse cuando se hacen determinaciones *in vitro* en extractos crudos, ni en extractos

dializados, dado que se trata de una inhibición reversible. Por lo tanto, la baja actividad de piruvato cinasa observada en extractos (dializados o no) obtenidos de la cepa CN10, puede ser el resultado de: a) la represión de la síntesis de piruvato cinasa, b) alguna modificación post-transcripcional de la proteína o c) inhibición irreversible de esta actividad. Por otra parte, extractos dializados obtenidos de la cepa silvestre, no se inhiben *in vitro* si se adicionan concentraciones crecientes de glutamina (dato no mostrado). Esto excluye la posibilidad de que la glutamina "per se" esté inhibiendo esta actividad. En *D. melanogaster*, se ha reportado que niveles de glutamina intracelular elevados, provocan en la célula una respuesta tipo *heat shock*, donde se activa la síntesis de ciertas proteínas específicas y se reprime la síntesis de muchas otras (36). Nosotros consideramos que el elevado contenido intracelular de glutamina que presenta la mutante CN10, resulta en un efecto tóxico generalizado sobre el metabolismo celular, que pudiera ser semejante al encontrado en *D. melanogaster*. Es decir, la elevada concentración de glutamina intracelular, podría considerarse una situación de *stress* para la célula.

Así, ya sea amonio, glutamina o la combinación de ambos metabolitos la(s) fuente(s) de nitrógeno, además de una inhibición competitiva de la actividad de piruvato cinasa, evidenciada por el cociente ATP/ADP (tabla 4), la poza de glutamina intracelular presente en estas condiciones (tabla 1), provoca un efecto adicional reflejado en un aumento en el tiempo de duplicación y una represión de la actividad de piruvato cinasa. Los valores detectados de piruvato cinasa (tabla 5), son directamente proporcionales a la capacidad de crecer (tiempo de duplicación) y a la concentración intracelular de glucosa, e inversamente proporcionales a la poza intracelular de glutamina (tabla 3). Esto es, el fenotipo de crecimiento de la mutante CN10 cultivada en las fuentes de nitrógeno mencionadas, puede ser el resultado de la suma de diferentes efectos (elevado cociente ATP/ADP y baja actividad de piruvato cinasa), provocados por la imposibilidad que tiene esta cepa de degradar glutamina y su consecuente acumulación.

En nuestro laboratorio, hemos demostrado que, en condiciones de microaerofilia, la actividad de glutaminasa está sujeta a regulación negativa por celodécidos (19); de modo que en esta condición, aumenta el contenido intracelular de estos metabolitos, la actividad de glutaminasa se inhibe y no participa en la degradación de glutamina. Esto significa que la mutante CN10, al ser cultivada en bajas concentraciones de oxígeno (microaerofilia), no presenta problemas en la degradación de glutamina, ya que la vía utilizada por el microorganismo en esta condición, no se encuentra afectada en esta cepa.

Una evidencia de que el fenotipo de la cepa mutante CN10 se debe a la acumulación de glutamina, es el experimento que se muestra en la figura 5. Se cultivó a la mutante CN10 durante 24 horas en glutamina como única fuente de nitrógeno y en presencia de oxígeno (cultivos agitados). En este punto, se evaluó la actividad de piruvato cinasa, la poza de glutamina intracelular y la poza de glucosa intracelular; encontrándose éstos dos



últimas elevadas y baja actividad específica de piruvato cinasa. Posteriormente, se transfirió el cultivo a una condición de microaerofilia y se evaluaron los parámetros mencionados 24 horas después; encontrándose que, al bajar la poza intracelular de glutamina, debido a que en esta condición la cepa CN10 es capaz de degradar este aminoácido, se recupera la actividad de piruvato cinasa y baja la poza de glucosa intracelular. Todo esto, correlaciona con una recuperación del crecimiento, ya que en agitación y con glutamina como única fuente de nitrógeno, esta cepa no estaba creciendo. Este experimento demuestra que, este aspecto del fenotipo de la mutante CN10, es debido fundamentalmente a la poza intracelular de glutamina alta, ya que al disminuir ésta, el fenotipo mutante revierte.

Los resultados hasta aquí mostrados, indican que una poza intracelular de glutamina elevada, resulta en una deficiente utilización de glucosa. Sin embargo, consideramos que niveles de glutamina intracelular como los que alcanza la mutante CN10, provocan un efecto tóxico generalizado a todo el metabolismo celular. De este modo, el análisis fenotípico de la mutante CN10 nos permitió evidenciar el efecto de la glutamina sobre la glucólisis, pero resulta muy difícil atribuir algún significado fisiológico a esto, dado que es parte de un fenotipo sumamente complejo.

En la siguiente sección, se analizarán los datos hasta ahora obtenidos con la cepa silvestre, y se propondrá un modelo que explique el efecto de la presencia de glutamina sobre la degradación de glucosa.

## EFFECTO DE LA PRESENCIA DE GLUTAMINA EN CULTIVOS DE UNA CEPA SILVESTRE.

Los resultados de la tabla 4 muestran que la cepa silvestre presenta un cociente ATP/ADP tres veces mayor cuando se cultiva en glutamina como única fuente de nitrógeno, respecto del cociente ATP/ADP encontrado al cultivar esta cepa en amonio como única fuente de nitrógeno. Este resultado muestra que, al cultivar a la cepa silvestre en glutamina como única fuente de nitrógeno, la consecuente represión de la actividad específica de glutamino sintetasa, pudiera estar provocando un aumento en el contenido intracelular de ATP, al dejar de consumirse durante la reacción catalizada por esta enzima. Al igual que lo descrito para la mutante CN10 (tabla 4), las diferencias en cociente ATP/ADP entre ambas condiciones, indican que, al cultivar a la cepa silvestre en glutamina como única fuente de nitrógeno, pudiera estar inhibida la glucólisis o nivel de piruvato cinasa, dada la respuesta que presenta esta actividad ante una abundancia relativa de ATP. Considerando lo anterior, decidimos evaluar el flujo glucolítico de la cepa silvestre en estas condiciones.

## A) EVALUACION DE LA DEGRADACION DE GLUCOSA HASTA CO<sub>2</sub>.

Se cultivó a la cepa silvestre en medios adicionados con glucosa <sup>14</sup>C y glutamino o amonio como fuentes de nitrógeno y se colectó el CO<sub>2</sub> proveniente del cultivo atrapándolo en NaOH 2.5N (ver material y métodos). Los resultados (tabla 6) muestran que, cuando la cepa silvestre se cultiva en amonio como única fuente de nitrógeno, se libera 2.5 veces más <sup>14</sup>C en forma de CO<sub>2</sub>, que cuando ésta se cultiva en glutamino como única fuente de nitrógeno. Este dato muestra que, en presencia de glutamino, la cepa silvestre presenta una disminución en el catabolismo de glucosa hasta CO<sub>2</sub>. Una vez más, la presencia de glutamino en el medio de cultivo reprime la actividad de GS, así, disminuye el consumo de ATP por esta reacción (lo cual se refleja en la poza intracelular de este metabolito) y la glucólisis disminuye. Esto último, es explicable en términos de una inhibición de la actividad de piruvato cinasa, debido a que la relación ATP/ADP es tres veces mayor que cuando se utiliza amonio como fuente de nitrógeno (tabla 4). Considerando estos resultados, es de esperarse que una mutante afectada en la actividad de GS, presente también un flujo glucolítico disminuido, lo cual se muestra en la tabla 6 (cepa CN1). Simultáneamente, se evaluó el flujo glucolítico de una cepa transformada con un vector que se expresa en multicopia y que contiene el gene que codifica para la actividad de glutamino sintetasa (cepa CN6). Esta cepa, cultivada en glutamino como única fuente de nitrógeno, tiene una actividad de GS alta y, en consecuencia, presenta un flujo glucolítico similar al de la cepa silvestre cultivada en amonio como única fuente de nitrógeno (tabla 6).

Tabla 6.- Porcentaje de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> obtenida de un cultivo en presencia de glucosa <sup>14</sup>C y actividad específica de glutamino sintetasa de las cepas S288C, CN1 y CN6.

FUENTE DE NITROGENO	ACTIVIDAD ESPECIFICA DE GS <sup>a</sup>			PORCENTAJE DE <sup>14</sup> CO <sub>2</sub>		
	S288C	CN1	CN6	S288C	CN1	CN6
AMONIO	0.150	n.d.	0.5	49.89	n.d.	n.d.
GLUTAMINA	0.022	N.D.	0.4	19.95	16.2	43.1

Todas las cepas fueron cultivadas hasta una D.O. de 0.5 medida a 600nm.

<sup>a</sup> Expresado en mol de  $\gamma$ -glutamilhidroxamato/min./mg de P.

N.D. actividad no detectable.

n.d. no determinada.

Estos resultados indican que el catabolismo de glucosa hasta CO<sub>2</sub> disminuye cuando la actividad de GS es baja, sugiriendo que, en virtud de que el funcionamiento de esta

enzima (GS) implica el consumo de ATP, una disminución en la actividad de GS podría alterar el cociente ATP/ADP, de modo que la carga energética aumentaría y, por tanto, el catabolismo de glucosa vía glucólisis-Krebs se vería alterado por la presencia de una abundancia relativa de ATP. Estos resultados también indican que la disminución del catabolismo de glucosa es el resultado de la baja actividad de GS y no de la presencia de glutamina "per se", dado que la cepa CN6 cultivada en presencia de este aminoácido, presenta un flujo glucolítico similar al de la cepa silvestre cultivada en amonio. La cepa CN6 conserva una actividad de GS alta, respecto de la actividad de la cepa silvestre cultivada en esta condición (tabla 6).

Concretamente, estos resultados muestran que, siempre que se vea disminuida la actividad de GS, ya sea por represión al cultivar las células en presencia de glutamina o por mutación (cepa CN1), el flujo glucolítico disminuye. Con el fin de correlacionar nuestra evaluación del flujo glucolítico con los niveles de ATP/ADP (carga energética), se determinaron las pozas intracelulares de estos metabolitos en las cepas pertinentes.

## B) DETERMINACION DE LAS POZAS INTRACELULARES DE ATP Y ADP.

Se determinó la concentración intracelular de ATP y ADP de las cepas CN1, CN6 y, en este caso, se utilizó como control a la cepa MC3, que es un auxótrofo de inositol del cual se derivaron la mutante CN1 y la cepa transformante CN6. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7.- Poza intracelular de ATP y ADP y cociente ATP/ADP de las cepas MC3, CN1, CN6 y S288C.

CEPA	ATP <sup>a</sup>		ADP <sup>a</sup>		ATP/ADP	
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Gln	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Gln	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Gln
MC3	11.5	24.0	8.85	7.63	1.3	3.15
CN1	n.d.	26.5	n.d.	9.5	n.d.	2.80
CN6	9.1	20.7	9.5	15.9	0.96	1.30
S288C	20.7	42.3	15.6	12.8	1.32	3.32

Todas las cepas fueron cultivadas en glucosa como fuente de carbono hasta una D.O. de 0.75 medida a 600nm.

<sup>a</sup> Expresadas en nmol/mg de proteína.

n.d.: no determinado.

Como se observa en la tabla 7, de igual manera que en el caso de la silvestre S288C, el auxótrofo de inositol, MC3, presenta el doble de ATP intracelular al cultivar esta cepa en glutamina, respecto del contenido al ser cultivada en amonio. Por otra parte, la cepa CN1 sólo es posible cultivarla en glutamina, ya que presenta auxotrofia por este aminoácido y, en esta condición, presenta una poza de ATP similar a la de la cepa silvestre. En lo referente a la relación ATP/ADP, una vez más, la cepa MC3 presenta un cociente ATP/ADP al cultivarse en amonio tres veces menor, respecto del cociente al cultivarse en glutamina.

Por su parte, el cociente ATP/ADP de la cepa mutante CN1 resulta alto respecto al cociente de la cepa padre de la cual se derivó, MC3, cultivada en amonio. Estos resultados indican que la disminución observada en el flujo glucolítico en condiciones donde la actividad de glutamino sintetasa está inhibida, podría resultar en un cambio en la concentración relativa de ATP, lo cual afectaría el funcionamiento de la glucólisis y del ciclo de Krebs. En cuanto a la cepa transformante CN6, el contenido intracelular de ATP y ADP y la relación ATP/ADP al ser cultivada en amonio como fuente de nitrógeno, son similares a los encontrados en la cepa MC3 cultivada en la misma condición, pero el contenido intracelular de ATP al cultivar a esta transformante en glutamino como fuente de nitrógeno es alto. Como se mencionó antes, en esta condición la actividad de GS de la transformante CN6 es alta y encontramos que la relación ATP/ADP es similar al cociente encontrado cuando la cepa padre (MC3) o la silvestre S288C se cultivaron en amonio como única fuente de nitrógeno, lo cual concilia con el hecho de que esta cepa no presente un flujo glucolítico disminuido al cultivarla en glutamino como única fuente de nitrógeno (tabla 6).

### C) UTILIZACION DE GLUTAMINA COMO FUENTE DE CARBONO.

Considerando lo anterior, es de esperarse que una cepa silvestre cultivada en glutamino como única fuente de nitrógeno, presente un tiempo de duplicación mayor que al ser cultivada en amonio, ya que en esta condición, el flujo glucolítico se encuentra disminuido. Sin embargo, como se observa en la tabla 3, el tiempo de duplicación de la cepa silvestre en glutamino como fuente de nitrógeno, es el mismo que cuando se cultiva esta cepa en amonio. Este resultado indica que, de alguna manera, la cepa silvestre es capaz de compensar la deficiencia en esqueletos de carbono, provocada por la disminución del flujo glucolítico, cuando se cultiva en glutamino como única fuente de nitrógeno.

En cultivos de células HeLa, se ha reportado que la glutamino es mejor fuente de carbono y energía que la glucosa (37). Dado que la cepa silvestre, pese a tener el flujo glucolítico disminuido en presencia de glutamino, no disminuye su tiempo de duplicación, decidimos evaluar la utilización de glutamino como fuente de carbono. Para esto, se cultivó a la cepa silvestre (S288C) en glucosa + glutamino  $^{14}\text{C}$  y se midió la liberación de radioactividad en forma de  $\text{CO}_2$ , encontrándose que un 50% de la marca que se adicionó en forma de glutamino, se recupera como carbonato al ser precipitado el  $\text{CO}_2$  producido durante el crecimiento. Este resultado, demuestra que cuando se cultiva una cepa silvestre en presencia de glutamino, una parte del carbono útil está siendo aportada por este aminoácido; incorporando su esqueleto de carbono al ciclo de Krebs en forma de 2-oxoglutarato.

En este trabajo, proponemos que la ruta de entrada de glutamino al ciclo de Krebs, se lleva a cabo a través de la glutaminasa B, que rompe la molécula de glutamino en amonio y glutamato. Posteriormente, el ácido glutámico daría 2-oxoglutarato por acción de la deshidrogenasa glutámica dependiente de NAD. Una evidencia de que es la glutaminasa

B quien lleva a cabo la primera parte de este catabolismo, es el hecho de que la mutante CN10, que carece de esta actividad, recupere el crecimiento cuando se cultiva en glucosa + succinato; como se mostró en la primera sección de resultados. Con el fin de demostrar lo anterior, se midió la actividad de GDH-NAD de la cepa silvestre en las diferentes fuentes de nitrógeno (tabla 8).

Tabla 8.- Actividad de glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup> de la cepa silvestre S288C.

FUENTE DE NITROGENO	FASE DE CRECIMIENTO		
	1	2	3
AMONIO	0.02	0.023	N.D.
GLUTAMINA	N.D.	0.016	N.D.
GLUTAMATO	0.25	0.22	0.01

Se cultivó esta cepa en glucosa como fuente de carbono a las densidades ópticas que se indican, medidas a 600nm.

<sup>a</sup> Expresada en unidades de actividad/min./mg de proteína.

1 Exponencial temprana: 0.25 D<sub>0.600nm</sub>

2 Exponencial media: 0.60 D<sub>0.600nm</sub>

3 Estacionaria: 4.5 D<sub>0.600nm</sub>

N.D.: no detectable.

Como resultado de este análisis, se puede concluir que esta enzima no está participando en la ruta mencionada, ya que sólo se detecta actividad enzimática cuando el crecimiento de la cepa silvestre, cultivada en glutamina como única fuente de nitrógeno, se encuentra en fase exponencial media (tabla 8) y no se detecta actividad en otros etapas del crecimiento. Otra opción, sería que el ácido glutámico diera 2-oxoglutarato por una reacción de transaminación. Con el fin de evaluar la participación de transaminasas en esta vía, decidimos cultivar a la cepa silvestre en medios adicionados con ácido aminoacético, que es un inhibidor de la actividad de transaminasa. El experimento se llevó a cabo en presencia de aspártico y alanina, aminoácidos que son los principales productos de la acción de transaminasas; con la finalidad de que, en este modelo, el efecto de la inhibición de la actividad de transaminasa por la adición del ácido aminoacético, sólo se reflejara en la falta del cetoácido producto de esta reacción.

En la figura 6, es posible observar que la inhibición de la actividad de transaminasa, en los términos mencionados; tiene un efecto más severo sobre el crecimiento cuando se cultiva a la cepa silvestre en glutamina como única fuente de nitrógeno (fig. 6B) que cuando se cultiva en amonio. (fig. 6A). Este resultado, puede evidenciar que la actividad de transaminasa como generadora de cetoácidos, tiene mayor importancia en cultivos en presencia de glutamina como única fuente de nitrógeno.

## PAPEL DE LA SINTESIS Y DEGRADACION DE GLUTAMINA EN LA UTILIZACION DE FUENTES DE CARBONO NO FERMENTABLES

Los resultados que hasta aquí se han presentado, demuestran que la síntesis de glutamino participa en la regulación del contenido intracelular de ATP y modula así la velocidad del flujo glucolítico. Con el fin de determinar el papel de esta vía en la utilización de fuentes de carbono no fermentables, se cuantificó el efecto de la presencia de glutamina en cultivos de la cepa silvestre adicionados de etanol como fuente de carbono. En la figura 7, es posible observar que, al igual que en el caso en que la fuente de carbono es glucosa, el tiempo de duplicación de la cepa silvestre no aumenta en cultivos adicionados de etanol + glutamino, y es, de hecho, menor que en cultivos adicionados de etanol + amonio. Este resultado nos condujo a pensar que también en presencia de etanol, la glutamino aporta esqueletos de carbono al ciclo de Krebs. Para demostrar esto último, se colectó el CO<sub>2</sub> proveniente de cultivos adicionados con etanol + glutamina <sup>14</sup>C y se encontró que un 75% de la marca adicionada en forma de glutamino, se libera como CO<sub>2</sub>. En este caso, proponemos que la vía de entrada del esqueleto de carbono de la glutamino al ciclo de Krebs, es glutaminasa B, en la que se refiere a la ruptura de la molécula de glutamino en glutamato y amonio; dado que una mutante sin actividad de glutaminasa B (cepa CN10), no puede crecer en cultivos adicionados de fuentes de carbono no fermentables, independientemente de la fuente de nitrógeno que se le adicione (figura 8). En lo referente a la segunda parte de la vía (ruptura de la molécula de glutamato en 2-oxoglutarato y amonio), se determinó la actividad de GDH-NAD y se encontró que, cultivos de la cepa silvestre en presencia de etanol como fuente de carbono, inducen su actividad de GDH-NAD al ser adicionados de glutamino como fuente de nitrógeno al mismo nivel en que se encuentra inducida esta actividad enzimática cuando se cultiva a la cepa silvestre en presencia de glutamato como única fuente de nitrógeno (tabla 9).

Tabla 9.- Actividad de GDH-NAD<sup>o</sup> de la cepa silvestre S288C.

FUENTE DE NITROGENO	ACTIVIDAD ESPECIFICA
AMONIO	0.03
GLUTAMATO	0.095
GLUTAMINA	0.105

Se cultivó en etanol como fuente de carbono hasta una D.O. de 0.75 medida a 600nm.

<sup>o</sup> Expresada en unidades de actividad/min./mg de P.

Este resultado indica que, en el caso de que la fuente de carbono es etanol, la cepa silvestre incorpora glutamina al ciclo de Krebs, via glutaminasa-GDH dependiente de NAD. Por otro parte, recientemente se ha reportado que células de *S. cerevisiae* cultivadas en fuentes de carbono no fermentables o cantidades limitantes de glucosa, presentan un elevado nivel de mensajero de GDH-NAD, independientemente de la presencia de glutamina en el medio (38).

En virtud de que la glutamina exógena es susceptible de ser utilizada como fuente de carbono en cultivos de la cepa silvestre adicionados de fuentes de carbono no fermentables, es de esperarse que la síntesis de este aminoácido, al igual que en el caso de la glucólisis, tenga algún efecto en el catabolismo de etanol. La isocitrato liasa, es una enzima anaplerótica que participa en el ciclo del glioxalato y cuya actividad se induce en cultivos de *S. cerevisiae* suplementados de fuentes de carbono no fermentables (39). Esta actividad enzimática, resulta indispensable para el crecimiento de células cultivadas en etanol como fuente de carbono, dado que cultivos de la cepa silvestre adicionados con etanol + amonio + 20mM de itaconato son incapaces de crecer, ya que el itaconato es un inhibidor específico de isocitrato liasa (fig. 9). Hemos encontrado que la actividad de isocitrato liasa es sensible, *in vitro*, a la adición de glutámico y glutamina (fig. 10); lo cual sugiere que la interconversión de estos dos aminoácidos pudiera, *in vivo*, modular la expresión de esta enzima. En este trabajo, no hemos determinado a qué nivel interaccionan la síntesis y degradación de glutamina con el metabolismo de etanol o de alguna otra fuente de carbono no fermentable y que pueda utilizar la levadura, pero los datos mostrados sugieren que este punto de regulación existe y debe responder a una lógica similar a la regulación en presencia de glucosa.

## DISCUSION FINAL Y CONCLUSIONES

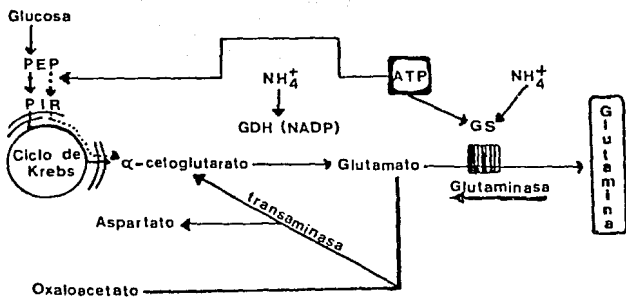
Los resultados presentados en este trabajo, nos permiten concluir que la actividad de glutamino sintetasa determina la carga energética, mediante el gasto de ATP, durante la síntesis de glutamina. Esto es, cuando se ve inhibida la actividad de glutamino sintetasa, deja de consumirse ATP por la reacción catalizada por esta enzima, provocándose un aumento de carga energética, reflejado en una abundancia relativa de ATP. Como consecuencia de esto, el flujo glucolítico se ve disminuido, dado la regulación intrínseca de esta vía, de modo que la actividad de GS resulta indispensable para un flujo de carbono óptimo. Por otra parte, hemos demostrado que la glutamina es capaz de aportar su esqueleto de carbono, al cultivar una cepa silvestre en presencia de este aminoácido. De manera que la síntesis y degradación de glutamino constituyen un ciclo que determina la disponibilidad adecuada de esqueletos de carbono y energía.

Así, la reacción catalizada por la glutamino sintetasa, que conduce a la biosíntesis de glutamina, constituye un punto de regulación coordinada de la asimilación de amonio y el metabolismo de carbono.

Por otra parte, la degradación de glutamino vía glutamínica, que resulta en la producción de glutamato más amonio, es parte indispensable del ciclo, dado que es el mecanismo por el cual se restablece una disponibilidad adecuada de esqueletos de carbono para la producción de energía, vía fosforilación oxidativa. Esto es, el ciclo de la glutamina, donde se sintetiza y degrada este aminoácido, permite mantener una carga energética adecuada: ya sea regulando el contenido relativo de ATP, al consumir este metabolito durante la reacción de síntesis, o aportando esqueletos de carbono para la producción de energía vía fosforilación oxidativa, al degradarse el aminoácido hasta 2-oxoglutarato, en condiciones en que la carga energética es tal, que el flujo glucolítico resulta ineficiente.

El modelo metabólico que estamos proponiendo en el presente estudio, se esquematiza de la siguiente manera:





Dentro de este contexto, además del ciclo de la glutamina descrito por Moro y colaboradores (34), es significativo el hecho de que mutantes de *B. subtilis* que carecen de actividad de GS, se encuentran parcialmente liberados en represión catabólica por glucosa. Un análisis de los metabolitos intracelulares de estas cepas, reveló que este efecto pudiera deberse a una pobre utilización de glucosa (56). Como se mencionó en la introducción, no existen más reportes acerca de la relación entre la síntesis y/o degradación de glutamina y el flujo glucolítico en microorganismos. Sin embargo, en células tumorales en cultivo, existe una discusión acerca del efecto mutuo de la degradación de glucosa (glucólisis) y la degradación de glutamina (glutaminólisis). Por una parte, estudios realizados en células L929 (57), demuestran que la glucólisis aeróbica depende de la utilización de glutamina, de modo que la producción de lactato a partir de glucosa, aumenta diez veces en presencia de glutamina. En este trabajo, publicado en 1986, los autores enfatizan que, si bien es cierto que se ha demostrado que la glutamina resulta una fuente importante de energía para células transformadas (37,58), el mecanismo que determina la preferencia de utilización de glutamina como sustrato no se ha estudiado. En adición, en estudios realizados en cultivos de células tumorales Ehrlich, se encontró que la presencia de glutamina disminuye el flujo glucolítico (59). En otros reportes, se muestran diferentes efectos: en cultivos de células Lettré, la glucosa disminuye la velocidad de utilización de glutamina, pero la glutaminólisis no inhibe la glucólisis (60); y en células como colonocitos, la glutamina afecta el metabolismo de glucosa, pero esto no influye en la degradación de glutamina (61). Por último, existe un reporte en que, al cultivar células Ehrlich en presencia de glucosa y glutamina, encuentran que ésta último incrementa

la incorporación de glucosa a ácidos nucleicos (62). Como resultado de estos estudios, los autores concluyen que es posible correlacionar el perfil bioquímico de utilización de glucosa y glutamina, con el grado de malignidad de las diferentes líneas tumorales; esto es, la línea menos maligna, muestra una mayor velocidad de glucólisis aerobia (59).

El estudio realizado en el presente trabajo, muestra dos cosas: por un lado, la existencia de una correlación entre la síntesis de glutamina y la velocidad del flujo glucolítico; es decir, a menor síntesis de glutamina, menor velocidad de la glucólisis aerobia; esto es, nuestros resultados muestran la existencia de un efecto mutuo del metabolismo de glucosa y el de glutamina. En nuestro sistema de estudio, no es fácil relacionar este perfil bioquímico con alguna propiedad del sistema, como ocurre en el caso de células en cultivo (59).

Por otra parte, en este trabajo hemos evidenciado el funcionamiento obligatorio de un ciclo de síntesis y degradación de glutamina. Este punto, es el resultado del efecto descrito en el párrafo anterior. Es decir, cuando la velocidad de síntesis de glutamina disminuye, de modo que provoca una disminución del flujo glucolítico, se hace indispensable la degradación de glutamina a fin de que aporte su esqueleto de carbono al ciclo de Krebs y suple la posible falta de carbono provocada por la disminución de la glucólisis. El amonio desprendido en la ruptura de la molécula de glutamina, es usado para resintetizar ésta, completándose el ciclo.

## REFERENCIAS

- 1.- SANWAL, B.D. and Lata, M. (1962). Arch. Biochem. Biophys. 97:582.
- 2.- PATEMAN, J.A. (1969). Biochem. J. 115:769.
- 3.- THOMULKA, K.W. and Mool, A.G. (1972). J. Bacteriol. 109:25.
- 4.- FOLKES, B.F. and Sims, A.P. (1974). J. Gen. Microbiol. 82:77.
- 5.- GOLDIN, B.R. and Frieden, C. (1971). Curr. Top. Cell Regul. 4:77.
- 6.- GONZALEZ, A., Rodriguez, L., Folch, J., Soberón, M. and Olivera, H. (1987). J. Gen. Microbiol. 133:2497-2510.
- 7.- DUBOIS, E., Vissers, S., Grenson, M. and Wiame, J.M. (1977). Biochem. Biophys. Res. Commun. 75:233-239.
- 8.- DUNN-COLEMAN, N.S. and Garret, R.H. (1980). Mol. Gen. Genet. 179:25-32.
- 9.- VAN DE POLL, K.W. (1973). FEBS Lett. 32:265-266.
- 10.- MARZLUFF, G.A. (1981). Microbiol. Rev. 45:437-461.
- 11.- DUNN-COLEMAN, N.S., Tomsett, A.B. and Garret, R.H. (1979). J. Bacteriol. 139:697-700.
- 12.- DAVILA, G., Lara, M., Guzmán, J. and Mora, J. (1980). Biochem. Biophys. Res. Commun. 92:134-140.
- 13.- DUBOIS, E.L. and Grenson, M. (1974). Biochem. Biophys. Res. Commun. 60:150.
- 14.- MITCHELL, A.P. and Magasanik, B. (1983). J. Biol. Chem. 258:119-124.
- 15.- LEGRAIN, C., Vissers, S., Dubois, E., Legrain, M. and Wiame, J.M. (1982). Eur. J. Biochem. 123:611-616.

- 16.- MITCHELL, A.P. (1984). *Mol. Cell. Biol.* 4:2758-2766.
- 17.- SOBERON, M. and González, A. (1987). *J. Gen. Microbiol.* 133:1-8.
- 18.- SOBERON, M., Olamendi, J., Rodriguez, L. and González, A. (1989). *J. Gen. Microbiol.* 135:2693-2697.
- 19.- SOBERON, M. and González, A. (1987). *J. Gen. Microbiol.* 133:9-14.
- 20.- WARD, P.F.V. and Crompton, D.W.T. (1969). *Proc. R. Series B.* 172:65-88.
- 21.- CIRILLO, V.P. (1961). *Ann. Rev. Microbiol.* 15:197-218.
- 22.- SOLS, A., De la Fuente, G., Villar-Palasi, C. and Asensio, C. (1958). *Biochem. Biophys. Acta.* 30:92-101.
- 23.- DE LA FUENTE, G. (1970). In "Metabolic Regulation and Enzyme Action". pp. 249-262. Academic Press, London.
- 24.- VIÑUELA, E., Salas, M.L. and Sols, A. (1963). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 12:140-145.
- 25.- GANCEDO, C. Salas, M.L., Giner, A. and Sols, A. (1965). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 20:15-20.
- 26.- GANCEDO, J.M., Gancedo, C. and Sols, A. (1967). *Biochem. J.* 102:230-250.
- 27.- HUNSLEY, J.R. and Sueller, C.H. (1969). *J. Biol. Chem.* 244:4819-4822.
- 28.- TORRONTGUI, G., De Palacián, E., Tresquerres, E.F. and Losado, M. (1968). *Arch. Microbiol.* 62:192-197.
- 29.- SPRAGUE, G.F. (1977). *J. Bacteriol.* 130:232-241.
- 30.- SCHIMPFESSEL, L. (1968). *Biochem. Biophys. Acta* 151:317-329.
- 31.- ROCHE, B. and Azoulay, E. (1969). *Eur. J. Biochem.* 8:426-434.
- 32.- OHNISHI, T., Sottocasa, G. and Ernster, L. (1966). *Bull. Soc. Chim. Biol.*

- 33.- CHANCE, B., Lee, C.P. and Melo, L. (1967). Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. exp. Biol. 26:1341-1354.
- 34.- MORA, J. (1990). Microbiol. Rev. 54:293-304.
- 35.- MATHEWS, K.C. and Van Holde, K.E. Biochemistry. 1st. edition, (1991). The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. pp. 452-453.
- 36.- HIGHTOWER, L.E. (1991). Cell 66:191-197.
- 37.- REITZER, J.L., Burton, M.W. and Kennell, D. (1979). J. Biol. Chem. 254:2669-2676.
- 38.- COSCHIGANO, P.W., Stephen. M.M. and Magasanik, B. (1991). Mol. Cell. Biol. 11:4455-4465.
- 39.- GONZALEZ, E. (1977). J. Bact. 129:1343-1348.
- 40.- GONZALEZ, A., Dávila, G. and Calva, E. (1985). Gene 36:123- 129.
- 41.- CULBERTSON, M.R. and Henry, S.A. (1975). Genetics 80:23-30.
- 42.- FERGUSON, A.R. and Sims, A.P. (1974). J. Gen. Microbiol. 80:159-171.
- 43.- GONZALEZ, A. Olivero, H., Rodriguez, L. and Soberón, M. (1985). J. Gen. Microbiol. 135: 2565.
- 44.- LAMPRECHT, W. and Trautschold, I. Methods of enzymatic analysis. Second Edition. (1965). Hans-Ulrich Bergmeyer ed. pp. 543-551.
- 45.- ADAM, Hans. Methods of enzymatic analysis. Second Edition. (1965). Hans-Ulrich Bergmeyer ed. pp. 573-577.
- 46.- LOWRY, O.H., Roseburg, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). J. Biol. Chem. 193: 285.
- 47.- HINNEN, A., Hicks, J.B. and Fink, G.R. (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929-1933.

- 48.- BONTEMPS, F., van den Berghe, G. and Hers, H.G. (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:2829-2833.
- 49.- BROOKS, B., Arch, J.R.S. and Newsholme, E.A. (1982). FEBS lett. 146:327-330.
- 50.- HAUSSINGER, D., Gerok, W. and Sies, H. (1983). Biochim. Biophys. Acta 755:272-278.
- 51.- NEWSHOLME, E.A., Challiss, R.A.J. and Crabtree, B. (1984). Trends Biochem. Sci. 9:277-280.
- 52.- STADTMAN, E.R., Mura, U., Chock, P.B. and Rhee, S.G. (1980). en Glutamine: metabolism, enzymology and regulation. J. Mora and R. Palacios (ed.). Academic Press, Inc., New York. pp.:41-68.
- 53.- KATZ, J. and Rognstad, R. (1978). Trends Biochem. Sci. 3:171-174.
- 54.- DALDAL, F. and Fraenkel, D.G. (1983). J. Bacteriol. 153:390-394.
- 55.- KIM, C. and Hollocher, T.C. (1982). J. Bacteriol. 151:358-366.
- 56.- FISHER, S.H. and Sonenshein A.L. (1984). J. Bacteriol. 157:612-621.
- 57.- LANKS, K.W. (1986). J. Cell. Physiol. 126:319-321.
- 58.- McKEEHAN, W.L. (1982). Cell Biol. Int. Rep. 6:635-650.
- 59.- LUOQUE, P., Paredes, S., Segura, J.A., Núñez de Castro, I. and Medina, M.A. (1990). Biochem. Int. 21:9-15.
- 60.- MEDINA, M.A., Sánchez, F.J., Márquez, F.J., Pérez, J.R., Quesada, A.R. and Núñez de Castro, I. (1988). Biochem. Int. 16:339-347.
- 61.- ARDAWI, M.S.M. and Newsholme, E.A. (1985). Biochem. J. 231:713-719.
- 62.- MEDINA, M.A., Carrascosa, J.M. and Núñez de Castro, I. (1990). Biochimie 72:291-293.

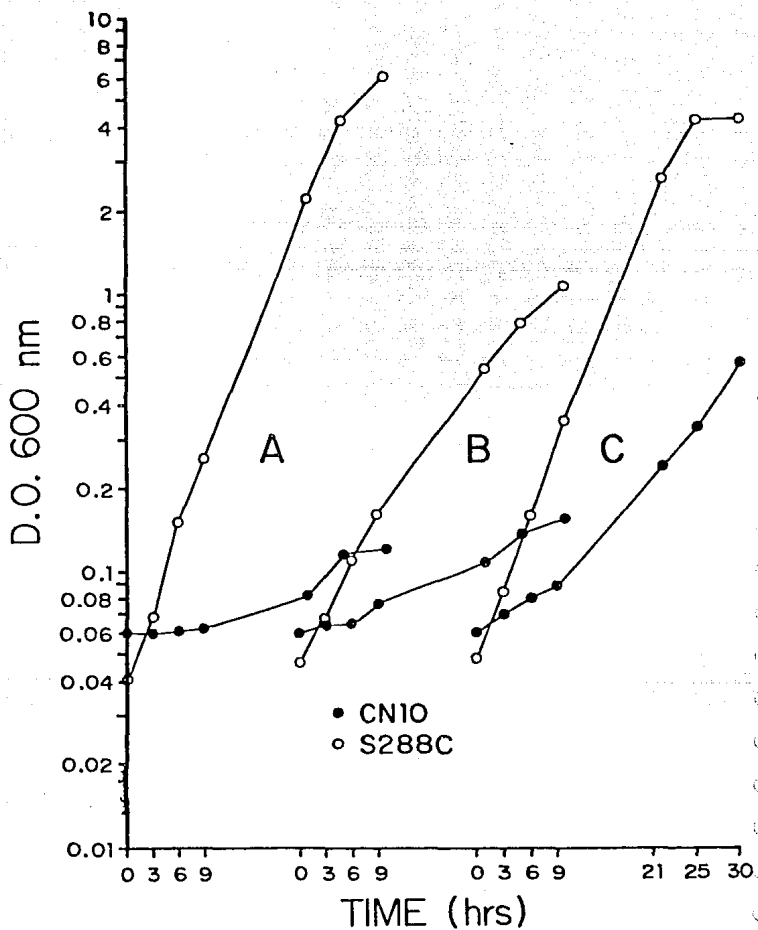


FIGURA 1.- Curva de crecimiento de las cepas S288C y CN10 cultivadas en glucosa como fuente de carbono y A) glutamina, B) glutamina + amoníaco o C) amoníaco como fuentes de nitrógeno.

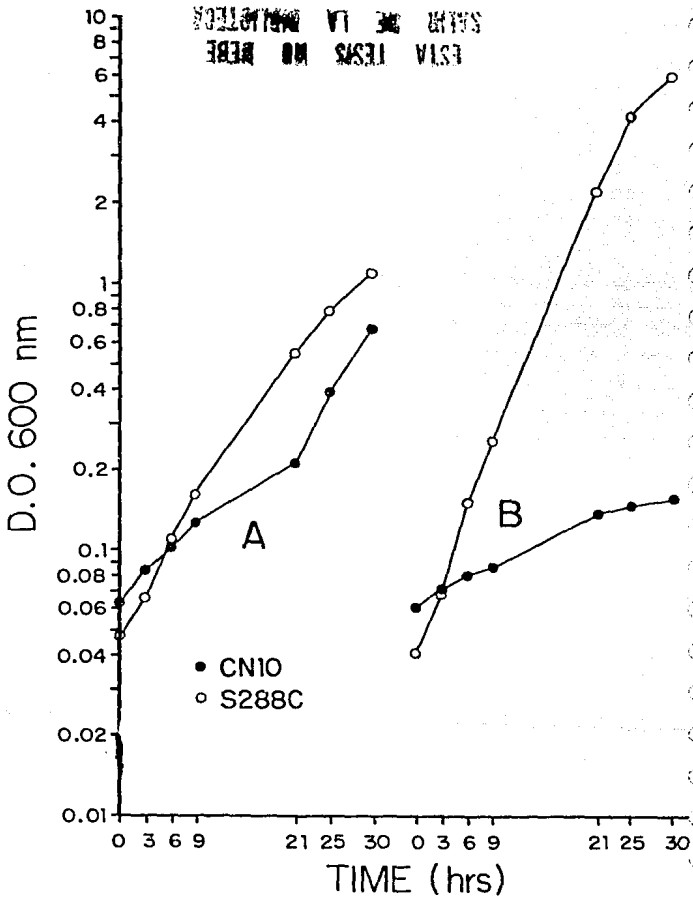


FIGURA 2.- Curva de crecimiento de las cepas S288C y CN10 cultivadas en glucosa + succinato como fuentes de carbono y A) glutamina + amonio o B) glutamina como fuentes de nitrógeno.



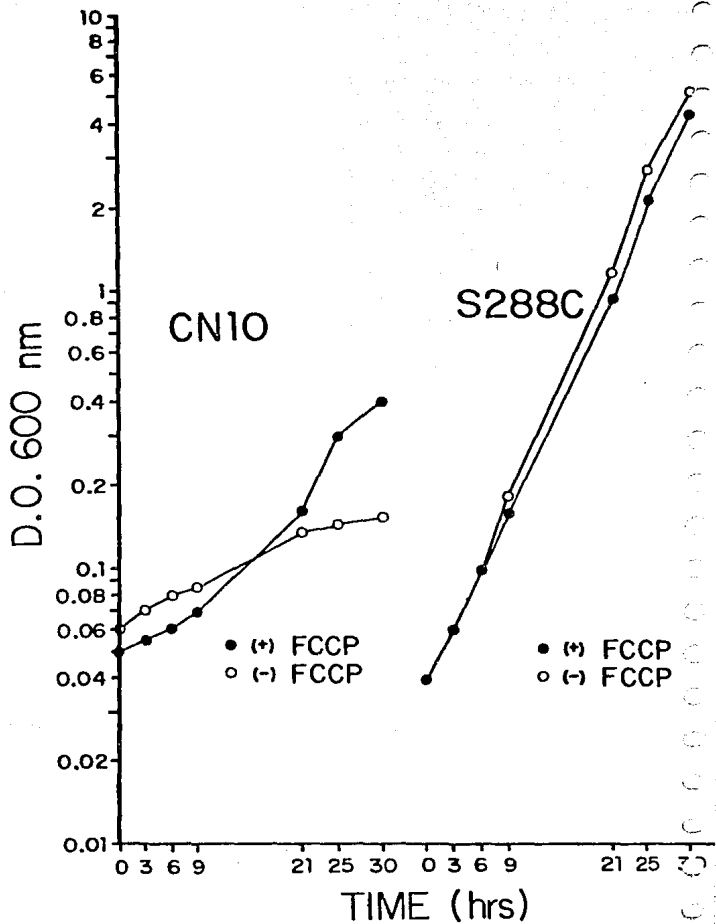


FIGURA 3.- Curva de crecimiento de los cepas S288C y CN10 cultivadas en glucosa + succinato como fuentes de carbono y glutamina como fuente de nitrógeno.

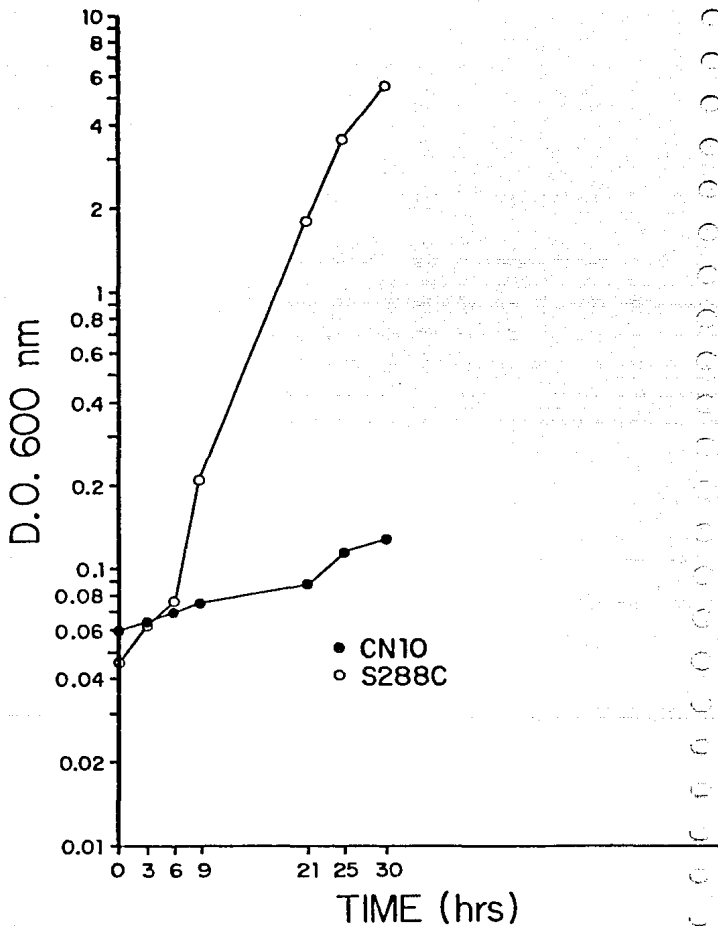


FIGURA 4.- Curva de crecimiento de las cepas S288C y CN10 cultivadas en glucosa como fuente de carbono y glutamino como fuente de nitrógeno. Ambas cepas se cultivaron en presencia de  $4\mu\text{M}$  de FCCP.

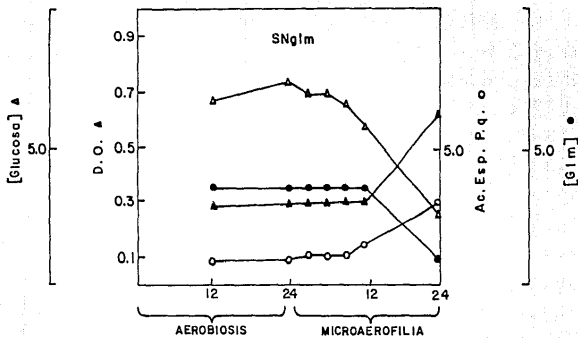


FIGURA 5.- Poca de glucosa intracelular (Δ), glutamina intracelular (●), curva de crecimiento (▲) y actividad específica de piruvato cinasa (○) de la cepa CN10 cultivada en glucosa como fuente de carbono y glutamina como fuente de nitrógeno.

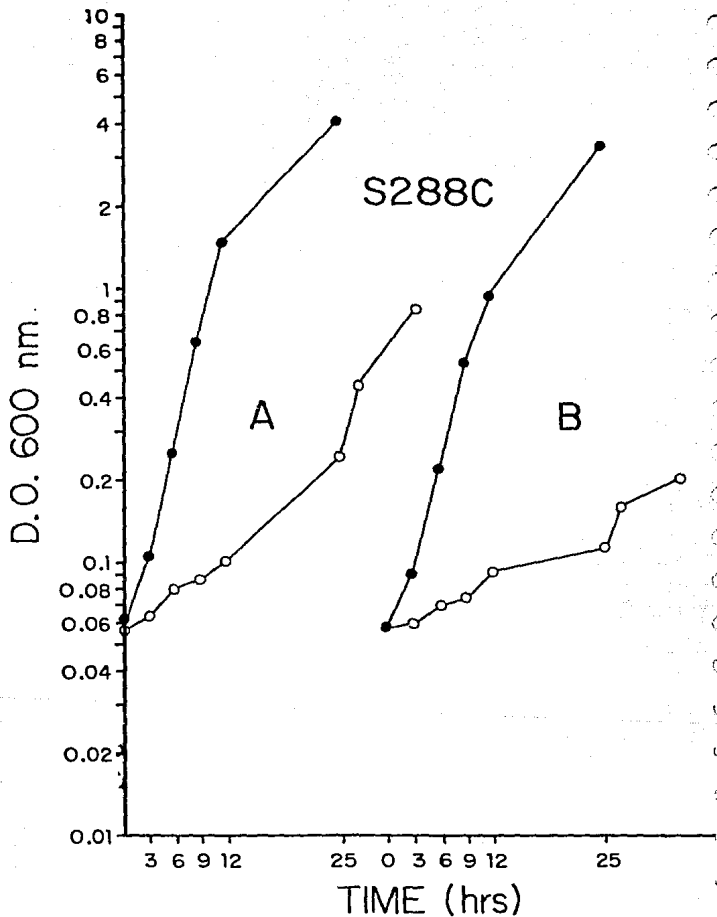


FIGURA 6.- Curva de crecimiento de la cepa S288C cultivada en presencia de 5mM de ácido aminoacético, 1 mg/ml de ácido aspártico, 1 mg/ml de alanina y A) amonio o B) glutamino como fuentes de nitrógeno.

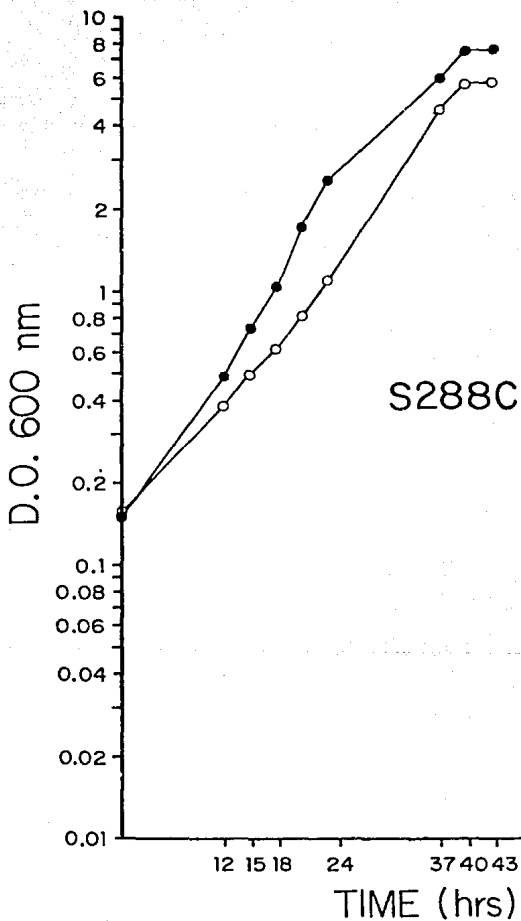


FIGURA 7.- Curva de crecimiento de la cepa S288C cultivada en etanol como fuente de carbono y (●) glutamina o (○) amoniac como fuentes de nitrógeno.

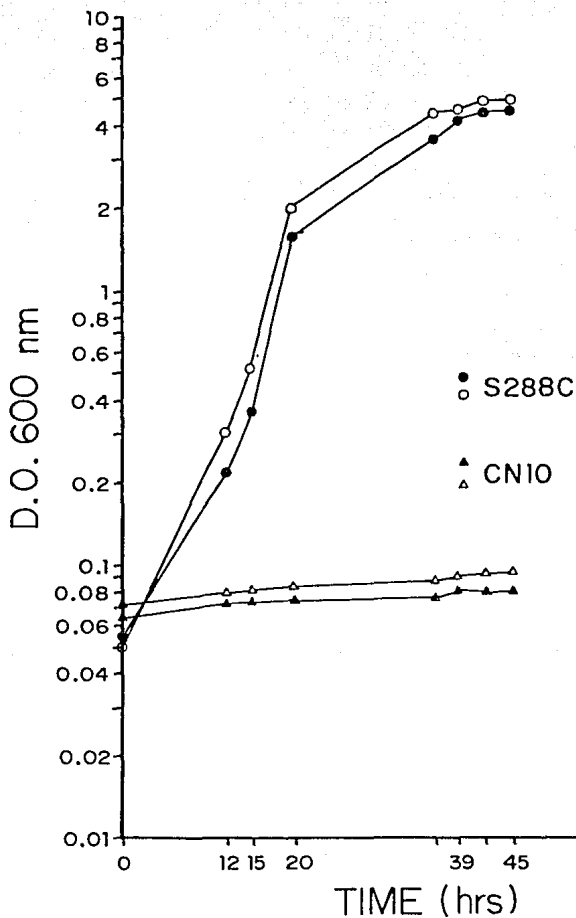


FIGURA 8.- Curva de crecimiento de las cepas S288C y CN10 cultivadas en etanol como fuente de carbono y (●, ▲) amoniac o (○, △) glutamina como fuentes de nitrógeno.

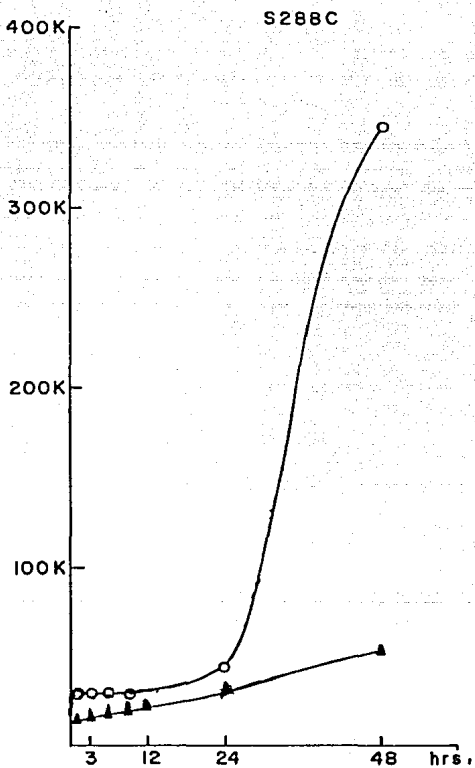


FIGURA 9.- Curva de crecimiento de la cepa S288C cultivada en etanol como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno en presencia (▲) o ausencia (○) de 20mM de itaconato.

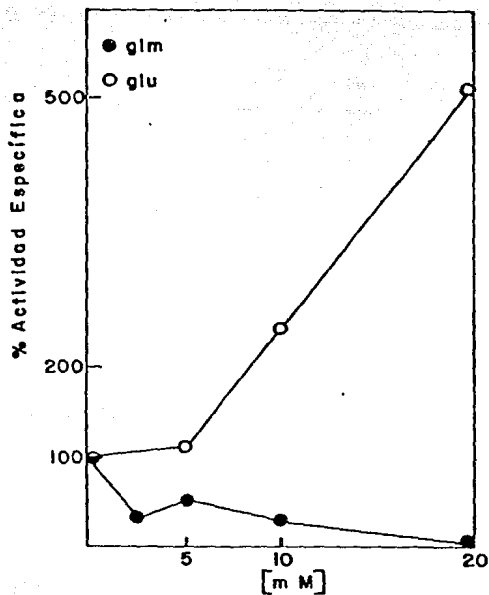


FIGURA 10.- Respuesta in vitro de la actividad de isocitrato liasa a concentraciones crecientes de glutamato y glutamina. Los extractos se obtuvieron de un cultivo de la cepa S288C en etanol como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno.